

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 568**

51 Int. Cl.:

C07K 14/37 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2006 PCT/EP2006/062884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2006 -WO06131504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2006 E 06763497 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 1891097**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

06.06.2005 DK 200500823

13.10.2005 DK 200501435

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

04.07.2017

73 Titular/es:

ADENIUM BIOTECH APS (100.0%)

Ole Maaløesvej 3

2200 Copenhagen N, DK

72 Inventor/es:

VIND, JESPER;

SEGURA, DOROTEA RAVENTOS;

HOEGENHAUG, HANS-HENRIK KRISTENSEN;

MYGIND, PER HOLSE y

TABOUREAU, OLIVIER

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 621 568 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana y polinucleótidos que codifican los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad antimicrobiana y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos, además de a métodos de producción y uso de los polipéptidos.

Antecedentes de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana mejorada. Los polipéptidos pueden presentar actividad hemolítica reducida y/o citotoxicidad reducida. Los polipéptidos también pueden presentar sensibilidad reducida hacia cationes, tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ . Los polipéptidos también pueden presentar un espectro antimicrobiano diferente en comparación con SEQ ID NO:1.

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

G-F-G-C-X₅-G-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-D-X₁₃-X₁₄-C-H-X₁₇-X₁₈-C-X₂₀-S-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-G-G-X₂₉-C-X₃₁-K-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-C-K-C-X₄₀;

en la que

X₅ = N, R, Q, V, G, S, A, K o Y;

X₇ = P, K o R;

X₈ = W o R;

X₉ = D, A, G, K, L, T, N, F, H, M, P, Q, S, V o Y;

X₁₀ = E, G o S;

X₁₁ = D, F, G, N, V, Y, H, K, L, P, S, T, W, I, M o R;

X₁₃ = M, R, S, V, G, Y, L, F, T, W o K;

X₁₄ = Q, R, L, F, G, H, S, K o Y;

X₁₇ = N, R, I, Y, V, K, T, S, Q o H;

X₁₈ = H o L;

X₂₀ = K o R;

X₂₂ = I, L o V;

X₂₃ = K o R;

X₂₄ = G, H, R, K o N;

X₂₅ = Y o R;

X₂₆ = K o R;

X₂₉ = Y, F, R o W;

X₃₁ = A, K, N, Q, T, S o Y;

X₃₃ = G, K, Q, A o R;

X₃₄ = G, K o R;

X₃₅ = F o L;

X₃₆ = V, L, M o T;

X₄₀ = Y o YR;

en la que el polipéptido tiene 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y tiene una actividad antimicrobiana más alta en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO:1.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad antimicrobiana, que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262.

La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, y a células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos.

La presente invención también se refiere a métodos de producción de tales polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana que comprenden (a) cultivar una célula huésped recombinante que comprende una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

La presente invención también se refiere a métodos de uso de los polipéptidos de la invención.

Definiciones

5 **Actividad antimicrobiana:** El término "actividad antimicrobiana" se define en el presente documento como una actividad que es capaz de aniquilar o inhibir el crecimiento de células microbianas. En el contexto de la presente invención, el término "antimicrobiano" pretende significar que hay un efecto bactericida y/o bacteriostático y/o fungicida y/o fungistático y/o un efecto virucida, en el que el término "bactericida" debe entenderse como capaz de aniquilar células bacterianas. El término "bacteriostático" debe entenderse como capaz de inhibir el crecimiento

10 bacteriano, es decir, inhibir el crecimiento de células bacterianas. El término "fungicida" debe entenderse como capaz de aniquilar células fúngicas. El término "fungistático" debe entenderse como capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir, inhibir el crecimiento de células fúngicas. El término "virucida" debe entenderse como capaz de inactivar virus. El término "células microbianas" indica células bacterianas o fúngicas (incluyendo levaduras).

15 En el contexto de la presente invención, el término "inhibir el crecimiento de células microbianas" pretende significar que las células están en el estado de no en crecimiento, es decir, que no son capaces de propagarse.

Para los fines de la presente invención, la actividad antimicrobiana puede determinarse según el procedimiento descrito por Lehrer et al., *Journal of Immunological Methods*, Vol. 137 (2) pp. 167-174 (1991). Alternativamente, la

20 actividad antimicrobiana puede determinarse según las directrices de NCCLS de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; anteriormente conocido como National Committee for Clinical and Laboratory Standards).

Los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Escherichia coli* (DSM 1576) a 1/100 después de 24 horas (preferentemente después de 12 horas, más preferentemente después de 8 horas, más preferentemente después de 4 horas, más preferentemente después de 2

25 horas, lo más preferentemente después de 1 hora, y en particular después de 30 minutos) de incubación a 20 °C en una solución acuosa de 25 % (peso/peso); preferentemente en una solución acuosa de 10 % (peso/peso); más preferentemente en una solución acuosa de 5 % (peso/peso); incluso más preferentemente en una solución acuosa de 1 % (peso/peso); lo más preferentemente en una solución acuosa de 0,5 % (peso/peso); y en particular en una

30 solución acuosa de 0,1 % (peso/peso) de los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana.

Los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana también pueden ser capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* (DSM 1576) durante 24 horas a 25 °C en un sustrato de crecimiento microbiano, cuando se añaden en una concentración de 1000 ppm; preferentemente cuando se añaden en una concentración de 500 ppm; más

35 preferentemente cuando se añaden en una concentración de 250 ppm; incluso más preferentemente cuando se añaden en una concentración de 100 ppm; lo más preferentemente cuando se añaden en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añaden en una concentración de 25 ppm.

Los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de

40 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 1/100 después de 24 horas (preferentemente después de 12 horas, más preferentemente después de 8 horas, más preferentemente después de 4 horas, más preferentemente después de 2 horas, lo más preferentemente después de 1 hora, y en particular después de 30 minutos) de incubación a 20 °C en una solución acuosa de 25 % (peso/peso); preferentemente en una solución acuosa de 10 % (peso/peso); más preferentemente en una solución acuosa de 5 % (peso/peso); incluso más preferentemente en una solución acuosa

45 de 1 % (peso/peso); lo más preferentemente en una solución acuosa de 0,5 % (peso/peso); y en particular en una solución acuosa de 0,1 % (peso/peso) de los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana.

Los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana también pueden ser capaces de inhibir el crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durante 24 horas a 25 °C en un sustrato de crecimiento microbiano, cuando se añaden en una concentración de 1000 ppm; preferentemente cuando se añaden en una concentración de 500 ppm; más

50 preferentemente cuando se añaden en una concentración de 250 ppm; incluso más preferentemente cuando se añaden en una concentración de 100 ppm; lo más preferentemente cuando se añaden en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añaden en una concentración de 25 ppm.

55 Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos el 20 %, preferentemente al menos el 40 %, más preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, lo más preferentemente al menos el 95 %, e incluso lo más preferentemente al menos el 100 % de la actividad antimicrobiana del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 40 de una cualquiera de SEQ ID

60 NO:3 a SEQ ID NO:225 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:274.

Defensina: El término "defensina" como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos reconocidos por un experto en la materia como que pertenecen a la clase defensina de péptidos antimicrobianos. Para determinar si

65 un polipéptido es una defensina según la invención, la secuencia de aminoácidos se compara preferentemente con

los perfiles del modelo oculto de Markov (perfiles HMM) de la base de datos PFAM usando el paquete de software HMMER libremente disponible (véase el Ejemplo 7).

Las familias de defensina de PFAM incluyen Defensina_1 o "Defensina de mamífero" (N.º de acceso PF00323),
 5 Defensina_2 o "Defensina de artrópodo " (N.º de acceso PF01097), Defensina_beta o "Defensina beta" (N.º de acceso PF00711), Defensina_propep o "Propéptido de defensina" (N.º de acceso PF00879) y Gamma-tionina o "Familia de gamma-tioninas " (N.º de acceso PF00304).

Las defensinas pueden pertenecer a la clase alfa-defensina, la clase beta-defensina, la clase theta-defensina, las
 10 clases de defensina de insecto o artrópodo, o la clase de defensina de planta.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de una defensina según la invención comprende 4, 5, 6, 7 u 8
 restos de cisteína, preferentemente 4, 5 o 6 restos de cisteína, más preferentemente 4 o 6 restos de cisteína, y lo
 más preferentemente 6 restos de cisteína.

15 Las defensinas también pueden ser defensinas sintéticas que comparten los rasgos característicos de cualquiera de las clases de defensina.

Ejemplos de tales defensinas incluyen, pero no se limitan a, α -defensina HNP-1 (péptido de neutrófilos humanos),
 20 HNP-2 y HNP-3; β -defensina-12, drosomicina, heliomicina y 1-purotionina, defensina A de insecto, y las defensinas desveladas en las solicitudes PCT WO 99/53053, WO 02/06324, WO 02/085934, WO 2006/050737, WO 2006/053565, WO 2006/097110 y WO 03/044049.

Polipéptido aislado: El término "polipéptido aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un
 25 polipéptido que es al menos el 20 % puro, preferentemente al menos el 40 % puro, más preferentemente al menos el 60 % puro, incluso más preferentemente al menos el 80 % puro, lo más preferentemente al menos el 90 % puro, e incluso lo más preferentemente al menos el 95 % puro, como se ha determinado por SDS-PAGE.

Polipéptido sustancialmente puro: El término "polipéptido sustancialmente puro" indica en el presente documento
 30 una preparación de polipéptido que contiene como máximo el 10 %, preferentemente como máximo el 8 %, más preferentemente como máximo el 6 %, más preferentemente como máximo el 5 %, más preferentemente como máximo el 4 %, como máximo el 3 %, incluso más preferentemente como máximo el 2 %, lo más preferentemente como máximo el 1 %, e incluso lo más preferentemente como máximo el 0,5 % en peso de otro material de polipéptido con el que está nativamente asociado. Por tanto, se prefiere que la polipéptido sustancialmente puro sea
 35 al menos el 92 % puro, preferentemente al menos el 94 % puro, más preferentemente al menos el 95 % puro, más preferentemente al menos el 96 % puro, más preferentemente al menos el 96 % puro, más preferentemente al menos el 97 % puro, más preferentemente al menos el 98 % puro, incluso más preferentemente al menos el 99 %, lo más preferentemente al menos el 99,5 % puro, e incluso lo más preferentemente el 100 % puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación.

40 Los polipéptidos de la presente invención están preferentemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otro material de polipéptido con el que está nativamente asociado. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, preparando el polipéptido por medio de métodos recombinantes muy conocidos o por métodos de
 45 purificación clásicos.

En el presente documento, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo con los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

50 **Variante:** El término "variante" se define en el presente documento como un polipéptido antimicrobiano que comprende una o más alteraciones, tales como sustituciones, inserciones, deleciones y/o truncaciones de uno o más restos de aminoácidos específicos en una o más posiciones específicas en el polipéptido.

Numeración de variantes: En la presente invención, se emplea una numeración específica de posiciones de restos
 55 de aminoácidos en las variantes de polipéptidos antimicrobianos. Por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de polipéptidos antimicrobianos conocidos, es posible designar un número de posición de aminoácido a cualquier resto de aminoácido en cualquier polipéptido antimicrobiano.

Usando el sistema de numeración que se origina de la secuencia de aminoácidos del polipéptido antimicrobiano
 60 desvelado en SEQ ID NO:1, alineado con la secuencia de aminoácidos de varios otros polipéptidos antimicrobianos, es posible indicar la posición de un resto de aminoácido en un polipéptido antimicrobiano en regiones de homología estructural.

Pueden hacerse múltiples alineamientos de secuencias de proteínas, por ejemplo, usando "ClustalW" (Thompson,
 65 J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence

alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680). Pueden hacerse múltiples alineamientos de secuencias de ADN usando el alineamiento de proteínas como molde, sustituyendo los aminoácidos con el codón correspondiente de la secuencia de ADN.

- 5 Los algoritmos de comparación de secuencias por pares de uso común son adecuados para detectar similitudes entre secuencias de proteínas que no han divergido más allá del punto de aproximadamente el 20-30 % de identidad de secuencia (Doolittle, 1992, *Protein Sci.* 1: 191-200; Brenner et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6073-6078). Sin embargo, proteínas verdaderamente homólogas con el mismo plegamiento y función biológica similar han divergido frecuentemente hasta el punto donde la comparación basada en secuencias tradicional deja de detectar su
- 10 relación (Lindahl y Elofsson, 2000, *J. Mol. Biol.*, 295: 613-615). Puede obtenerse mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de proteínas (perfiles) para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles mediante un proceso de búsqueda iterativo en bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402). Puede lograrse incluso mayor sensibilidad si la familia o superfamilia para
- 15 la proteína de interés tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteína. Programas tales como GenTHREADER (Jones 1999, *J. Mol. Biol.* 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, *Bioinformatics* 19: 874-881) utilizan la información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neural que predice el plegamiento estructural para una secuencia de búsqueda. Similarmente, puede usarse el método de Gough et al.,
- 20 2000, *J. Mol. Biol.* 313: 903-919, para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilias presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos pueden a su vez usarse para generar modelos de homología para la proteína de interés, y tales modelos pueden evaluarse para exactitud usando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.
- 25 Para proteínas de estructura conocida, están disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP han sido estructuralmente alineadas, y aquellos alineamientos están accesibles y pueden descargarse. Estos alineamientos pueden usarse para predecir restos de aminoácidos estructuralmente y funcionalmente correspondientes en proteínas dentro de la misma superfamilia estructural. Esta información, junto con información derivada del modelado de homología y búsquedas
- 30 de perfiles, puede usarse para predecir qué restos mutar cuando se mueven mutaciones de interés de una proteína a un homólogo cercano o remoto.

En la descripción de las diversas variantes de polipéptidos antimicrobianos de la presente invención, la nomenclatura descrita más adelante está adaptada para facilitar la referencia. En todos los casos, se emplea la

35 abreviatura de aminoácidos aceptada de una sola letra o de triple letra de la IUPAC.

Para una sustitución de aminoácidos, se usa la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, aminoácido(s) sustituido(s). Por consiguiente, la sustitución de treonina con alanina en la posición 226 se designa "T226A"; y la sustitución de tirosina con tirosina y arginina en la posición 40 (añadiendo eficazmente arginina después de la

40 tirosina) se designa "Y40YR". Se separan mutaciones múltiples mediante la adición de marcas ("+"), por ejemplo, "G205R + S411 F", que representa mutaciones en las posiciones 205 y 411 que sustituyen glicina (G) con arginina (R), y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

Polipéptido antimicrobiano original: El término polipéptido antimicrobiano "original", como se usa en el presente

45 documento, significa un polipéptido antimicrobiano al que se hacen modificaciones, por ejemplo, sustitución (sustituciones), inserción (inserciones), delección (delecciones) y/o truncación (truncaciones), para producir las variantes de polipéptidos antimicrobianos de la presente invención. Este término también se refiere al polipéptido con el que una variante se compara y alinea. El original puede ser un polipéptido que existe de forma natural (no mutante), o puede incluso ser una variante del mismo, preparada por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la

50 proteína original puede ser una variante de un polipéptido que existe de forma natural que se ha modificado o alterado en la secuencia de aminoácidos. Un original también puede ser una variante alélica que es un polipéptido codificado por cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico.

Identidad: La vinculación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe

55 por el parámetro "identidad".

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa FASTA incluido en la versión 2.0x del paquete de programas FASTA (véase W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", *PNAS* 85:2444-2448; y W. R. Pearson

60 (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", *Methods in Enzymology* 183:63-98). La matriz de puntuación usada fue BLOSUM50, la penalización por hueco fue -12 y la penalización por extensión de hueco fue -2.

El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el mismo algoritmo y el paquete de

65 software como se ha descrito anteriormente. La matriz de puntuación usada fue la matriz de identidad, la

penalización por hueco fue -16 y la penalización por extensión de hueco fue -4.

Alternativamente, se determina un alineamiento de dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización por apertura de hueco es 10 y la penalización por extensión de hueco es 0,5. El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención (tal como los aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO:1) y una secuencia de aminoácidos diferente se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido entre la longitud (número de restos de aminoácidos) de la secuencia de la presente invención; o alternativamente la salida de Needle marcada "identidad más larga" se usa como el porcentaje de identidad y se calcula del siguiente modo: $(\text{Restos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número de huecos en el alineamiento})$. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

Fragmento de polipéptido: El término "fragmento de polipéptido" se define en el presente documento como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos delecionados del extremo amino y/o carboxilo de SEQ ID NO:2 o una secuencia homóloga del mismo, en la que el fragmento tiene actividad antimicrobiana.

Subsecuencia: El término "subsecuencia" se define en el presente documento como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más nucleótidos delecionados del extremo 5' y/o 3' de SEQ ID NO:1 o una secuencia homóloga de la misma, en la que la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad antimicrobiana.

Variante alélica: El término "variante alélica" indica en el presente documento cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente mediante mutación, y puede producir polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

Polinucleótido sustancialmente puro: El término "polinucleótido sustancialmente puro", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos externos o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de los sistemas de producción de proteínas genéticamente manipuladas. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo el 10 %, preferentemente como máximo el 8 %, más preferentemente como máximo el 6 %, más preferentemente como máximo el 5 %, más preferentemente como máximo el 4 %, más preferentemente como máximo el 3 %, incluso más preferentemente como máximo el 2 %, lo más preferentemente como máximo el 1 %, e incluso lo más preferentemente como máximo el 0,5 % en peso de otro material de polinucleótido con el que está nativamente asociado. Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, sin embargo, regiones no traducidas de 5' y 3' que existen de forma natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos el 90 % puro, preferentemente al menos el 92 % puro, más preferentemente al menos el 94 % puro, más preferentemente al menos el 95 % puro, más preferentemente al menos el 96 % puro, más preferentemente al menos el 97 % puro, incluso más preferentemente al menos el 98 % puro, lo más preferentemente al menos el 99 %, e incluso lo más preferentemente al menos el 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferentemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos desvelados en el presente documento estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polinucleótido esté esencialmente libre de otro material de polinucleótido con el que está nativamente asociado. En el presente documento, el término "polinucleótido sustancialmente puro" se sinónimo con los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

ADNc: El término "ADNc" se define en el presente documento como una molécula de ADN que puede prepararse por transcripción inversa de una molécula de ARNm cortada y empalmada madura obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias intrónicas que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor para el ARNm que se procesa mediante una serie de etapas antes de aparecer como el ARNm cortado y empalmado maduro. Estas etapas incluyen la eliminación de secuencias intrónicas por un proceso llamado corte y empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por tanto, de cualquier secuencia intrónica.

Construcción de ácidos nucleicos: El término "construcción de ácidos nucleicos", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico, tanto mono como bicatenaria, que se aísla de un gen que existe de forma natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de un modo que no existiría de otro modo en la naturaleza. El término construcción de ácidos nucleicos se sinónimo del término "casete de expresión" cuando la construcción de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

Secuencia de control: El término "secuencias de control" se define en el presente documento para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido, que codifican un polipéptido

de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un conductor, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptidos, promotor, secuencia de péptidos señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de terminación transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Operativamente unidas: El término "operativamente unidas" indica en el presente documento una configuración en la que una secuencia de control se pone en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos de forma que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

Secuencia codificante: Cuando se usa en el presente documento, el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto de proteína. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza con el codón de iniciación ATG o codones de iniciación alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc, o secuencia de nucleótidos recombinante.

Expresión: El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traduccional y secreción.

Vector de expresión: El término "vector de expresión" se define en el presente documento como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente unido a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.

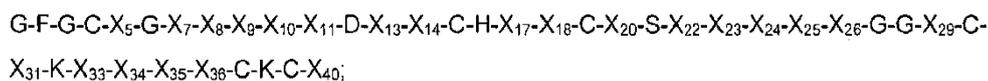
Célula huésped: El término "célula huésped", como se usa en el presente documento, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible a transformación, transfección, transducción, y similares, con una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido de la presente invención.

Modificación: El término "modificación" significa en el presente documento cualquier modificación química del polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 40 de una cualquiera de SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO: 225 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:274, además de la manipulación genética del ADN que codifica ese polipéptido. La(s) modificación (modificaciones) puede(n) ser sustitución (sustituciones), delección (delecciones) y/o inserción (inserciones) del (de los) aminoácido(s), además de sustitución (sustituciones) de cadena(s) lateral(es) de aminoácidos; o el uso de aminoácidos no naturales con características similares en la secuencia de aminoácidos. En particular, la(s) modificación (modificaciones) puede(n) ser amidaciones, tales como amidación del extremo C.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana

En una realización, el polipéptido de la invención es un polipéptido que tiene actividad antimicrobiana que comprende, preferentemente consiste en, los aminoácidos 1 a 40 de la secuencia de aminoácidos (II):



en la que

X₅ = N, R, Q, V, G, S, A, K o Y; preferentemente X₅ = N, R, S o G;

X₇ = P, K o R;

X₈ = W o R;

X₉ = D, A, G, K, L, T, N, F, H, M, P, Q, S, V o Y; preferentemente X₉ = D, S, A, G o N;

X₁₀ = E, G o S;

X₁₁ = D, F, G, N, V, Y, H, K, L, P, S, T, W, I, M o R; preferentemente X₁₁ = D, G o N;

X₁₃ = M, R, S, V, G, Y, L, F, T, W o K; preferentemente X₁₃ = M, L, G o V;

X₁₄ = Q, R, L, F, G, H, S, K o Y; preferentemente X₁₄ = Q, K, R o F;

X₁₇ = N, R, I, Y, V, K, T, S, Q o H; preferentemente X₁₇ = N, R, V o Q;

X₁₈ = H o L;

X₂₀ = K o R;

X₂₂ = I, L o V;

X₂₃ = K o R;
 X₂₄ = G, H, R, K o N; preferentemente X₂₄ = G o R;
 X₂₅ = Y o R;
 X₂₆ = K o R;

5 X₂₉ = Y, F, R o W;
 X₃₁ = A, K, N, Q, T, S o Y; preferentemente X₃₁ = A, S o T;
 X₃₃ = G, K, Q, A o R; preferentemente X₃₃ = G o A;
 X₃₄ = G, K o R;
 X₃₅ = F o L;
 10 X₃₆ = V, L, M o T; preferentemente X₃₆ = V o L;
 X₄₀ = Y o YR;

en la que el polipéptido tiene 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y tiene una actividad antimicrobiana más alta en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO:1

15 La secuencia de aminoácidos (II) puede tener 1, 2, 3 o 4, diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. Preferentemente, 1, 2 o 3; y lo más preferentemente 1 o 2 aminoácidos son diferentes en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

20 La secuencia de aminoácidos (II) puede tener al menos el 90 % de identidad, o al menos el 95 % de identidad con los aminoácidos 1 a 40 de SEQ ID NO:1.

La secuencia de aminoácidos (II) puede tener 0, 1, 2, 3 o 4 inserciones, preferentemente 0, 1, 2 o 3 inserciones, más preferentemente 0, 1 o 2 inserciones; y 0, 1, 2, 3 o 4 deleciones, preferentemente 0, 1, 2 o 3 deleciones, más
 25 preferentemente 0, 1 o 2 deleciones, en comparación con SEQ ID NO:1 o una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:225 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:274.

En otra realización, el polipéptido de la invención comprende, preferentemente consiste en, una secuencia de
 30 aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO: 117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262.

El término "una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO: 117" pretende significar SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 SEQ ID NO: 11, SEQ ID
 35 NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID
 40 NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID
 45 NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98, SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:102, SEQ ID NO:103, SEQ ID NO:104, SEQ ID NO:105, SEQ ID NO:106, SEQ ID NO:107, SEQ ID NO:108, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:113, SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:115, SEQ ID
 50 NO:116 o SEQ ID NO:117.

El término "una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251" pretende significar una cualquiera de SEQ ID NO:226, SEQ ID NO:227, SEQ ID NO:228, SEQ ID NO:229, SEQ ID NO:230, SEQ ID NO:231, SEQ ID NO:232, SEQ ID NO:233, SEQ ID NO:234, SEQ ID NO:235, SEQ ID NO:236, SEQ ID NO:237, SEQ ID NO:238, SEQ ID
 55 NO:239, SEQ ID NO:240, SEQ ID NO:241, SEQ ID NO:242, SEQ ID NO:243, SEQ ID NO:244, SEQ ID NO:245, SEQ ID NO:246, SEQ ID NO:247, SEQ ID NO:248, SEQ ID NO:249, SEQ ID NO:250 o SEQ ID NO:251.

El término "una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262" pretende significar una cualquiera de SEQ ID NO:252, SEQ ID NO:253, SEQ ID NO:254, SEQ ID NO:255, SEQ ID NO:256, SEQ ID NO:257, SEQ ID NO:258, SEQ ID NO:259, SEQ ID NO:260, SEQ ID NO:261 o SEQ ID NO:262.

Los aminoácidos que constituyen los polipéptidos de la invención pueden seleccionarse independientemente de las formas D o L. Preferentemente, el polipéptido de la invención es un polipéptido defensina; más preferentemente una alfa defensina, una beta-defensina, o una defensina de insecto (artrópodo).

65

Los polipéptidos de la invención pueden presentar actividad antimicrobiana más alta o al menos igual, preferentemente más alta, en comparación con el polipéptido de SEQ ID NO:1, determinada como la concentración mínima inhibitoria (CMI), contra *Staphylococcus carnosus* ATCC51365, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 o *Staphylococcus aureus* ATCC25923 según las directrices de NCCLS / CLSI, protocolo M7-A6, vol. 20, N.º 2:
 5 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.

En una realización, la presente invención se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución conservativa, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID
 10 NO:262. Preferentemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácidos conservativas o inserciones que no afectan significativamente el plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 10 aminoácidos; pequeñas extensiones del extremo amino o carboxilo, tales como un resto de metionina del extremo amino; un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 restos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga
 15 neta u otra función, tal como una extensión de poli-histidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

Ejemplos de sustituciones conservativas están dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y
 20 aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los intercambios que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxi-prolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil-serina) pueden sustituir a restos de aminoácidos de un polipéptido no mutante. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales, pueden sustituir a restos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" se
 30 han modificado después de la síntesis de proteínas, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente de la de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse químicamente, y preferentemente, están comercialmente disponibles, e incluyen ácido piperídico, ácido tiazolidincarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos puede mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad por sustrato, cambiar el óptimo de pH, y similares.

Pueden identificarse aminoácidos esenciales en el polipéptido original según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones de alanina individuales en cada resto en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para la actividad biológica (es decir, actividad antimicrobiana) para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase, por tanto, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. La interacción biológica también puede determinarse por
 45 análisis físico de la estructura, como se ha determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcado por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de supuestos aminoácidos de sitios de contacto. Véanse, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309:59-64. También pueden deducirse identidades de aminoácidos esenciales del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un
 50 polipéptido según la invención.

Pueden hacerse y probarse sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguido de un procedimiento de cribado relevante, tal como los desvelados por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
 55 86: 2152-2156; documentos WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden usarse incluyen PCR propensa a error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; patente de EE.UU. N.º 5.223.409; documento WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46:145; Ner et al., 1988, *ADN* 7:127).

Pueden combinarse métodos de mutagénesis/barajado con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped. Pueden recuperarse moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos convencionales en la materia. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de restos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden
 65 aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones de los aminoácidos 1 a 40 de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262 es 10, preferentemente 9, más preferentemente 8, más preferentemente 7, más preferentemente como máximo 6, más preferentemente como máximo 5, más preferentemente 4, incluso más preferentemente 3, lo más preferentemente 2, e incluso lo más preferentemente 1.

Extensión del extremo N

Una extensión del extremo N de los polipéptidos de la invención puede consistir adecuadamente en de 1 a 50 aminoácidos, preferentemente 2-20 aminoácidos, especialmente 3-15 aminoácidos. En una realización, la extensión de péptidos del extremo N no contiene una Arg (R). En otra realización, la extensión del extremo N comprende un sitio de escisión kex2 o similar a kex2 como se definirá adicionalmente más adelante. En una realización preferida, la extensión del extremo N es un péptido, que comprende al menos dos restos de aminoácidos Glu (E) y/o Asp (D), tales como una extensión del extremo N que comprende una de las siguientes secuencias: EAE, EE, DE y DD.

Sitios Kex2

Los sitios kex2 (véase, por ejemplo, *Methods in Enzymology* Vol 185, ed. D. Goeddel, Academic Press Inc. (1990), San Diego, CA, "Gene Expression Technology") y los sitios similares a kex2 son sitios de reconocimiento di-básico (es decir, sitios de escisión) encontrados entre la región que codifica el pro-péptido y la región madura de algunas proteínas.

Se ha mostrado en ciertos casos que la inserción de un sitio kex2 o un sitio similar a kex2 mejora el correcto procesamiento de endopeptidasas en el sitio de escisión del pro-péptido produciendo niveles elevados de secreción de proteína.

En el contexto de la invención, la inserción de un sitio kex2 o similar a kex2 produce la posibilidad de obtener la escisión en una cierta posición en la extensión del extremo N, produciendo un polipéptido antimicrobiano que se extiende en comparación con los aminoácidos 1 a 40 de una cualquiera de SEQ ID NO:2 a SEQ ID NO:225 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:274.

Polipéptidos fusionados

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión escindibles en los que el otro polipéptido está fusionado en el extremo N o el extremo C del polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen unir las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del (de los) mismo(s) promotor(es) y terminator(es).

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana

Un polipéptido de la presente invención puede obtenerse de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido de", como se usa en el presente documento a propósito de una fuente dada, debe significar que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos se produce por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado la secuencia de nucleótidos de la fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretado extracelularmente.

Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano Gram-positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, por ejemplo, un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano Gram-negativo, por ejemplo, un polipéptido de *E. coli* o de *Pseudomonas sp.*

Un polipéptido de la presente invención también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferentemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o más preferentemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium* o *Trichoderma*.

En un aspecto preferido, el polipéptido en un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* que tiene actividad antimicrobiana.

En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Se entenderá que para las especies anteriormente mencionadas, la invención engloba tanto los estados perfectos como imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conocen. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

Las cepas de estas especies están fácilmente accesibles para el público en varias colecciones de cultivos, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión escindibles en los que otro polipéptido está fusionado en el extremo N o el extremo C del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen unir las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del (de los) mismo(s) promotor(es) y terminador.

Polinucleótidos

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. En particular, la presente invención se refiere a polinucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Debido a la degeneración del código genético, el experto reconocerá fácilmente que pueden prepararse varias secuencias de nucleótidos que codifican cada uno de los polipéptidos de la invención. Es muy conocido en la técnica que los nucleótidos constituyen codones que codifican los aminoácidos de los polipéptidos de la invención.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican fragmentos de la secuencia de aminoácidos mostrada como una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO: 117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262 que tienen actividad antimicrobiana. Una subsecuencia de los polinucleótidos es una secuencia de nucleótidos en la que se ha delecionado uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

La secuencia de nucleótidos puede obtenerse por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para reubicar la secuencia de nucleótidos de una localización a un sitio diferente donde se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, deleción y/o inserción en comparación con los aminoácidos 1 a 40 de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262. Estas variantes artificiales pueden diferenciarse en alguna forma manipulada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que se diferencian en la actividad específica, termoestabilidad, óptimo de pH, o similares.

Será evidente para aquellos expertos en la materia que tales sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y todavía producir un polipéptido activo. Pueden identificarse restos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y por tanto preferentemente no sometidos a sustitución, según procedimientos conocidos en la técnica, tales como

mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada resto positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para actividad antimicrobiana para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. También pueden determinarse sitios de interacción

- 5 por análisis de la estructura tridimensional como se ha determinado por técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).
- 10 Además, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede modificarse por la introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que se corresponden con el uso de codones del organismo huésped previsto para la producción del polipéptido antimicrobiano.

15 Construcciones de ácidos nucleicos

La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención puede manipularse en una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido. Puede ser deseable o necesaria la manipulación de la secuencia de polinucleótido antes de su inserción en un vector dependiendo del vector de expresión. Son muy conocidos en la técnica las técnicas para modificar las secuencias de polinucleótidos que utilizan métodos de ADN recombinante.

La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control de la transcripción que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección que incluye promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón *lac* de *E. coli*, gen de agarosa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, y gen beta-lactamasa procariota (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), además del promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Promotores adicionales se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, arriba.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amilogucosidasa de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasas I de *Trichoderma reesei*, xilanasas II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, además del promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotionina de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, Yeast

8: 423-488.

La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente unida en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, arriba.

La secuencia de control también puede ser una secuencia conductora adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia conductora está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia conductora que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Conductores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

Conductores adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir restos de poliadenosina a ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener inherentemente una región codificante de péptido señal naturalmente unida en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido secretado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que es externa a la secuencia codificante. La región codificante de péptido señal externa puede ser requerida donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región codificante de péptido señal. Alternativamente, la región codificante de péptido señal externa puede simplemente sustituir la región codificante de péptido señal natural con el fin de potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier región codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Regiones codificantes de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Péptidos señal adicionales se describen por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

Regiones codificantes de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para el factor alfa de

Saccharomyces cerevisiae e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes de péptido señal útiles se describen por Romanos et al., 1992, arriba.

La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos dispuesta en el extremo amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante de propéptido puede obtenerse de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (documento WO 95/33836).

Donde estén presentes tanto las regiones de péptido señal como de propéptido en el extremo amino de un polipéptido, la región de propéptido está dispuesta a continuación del extremo amino de un polipéptido y la región de péptido señal está dispuesta a continuación del extremo amino de la región de propéptido.

También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que se encienda o apague la expresión del gen en respuesta a un estímulo químico o físico, que incluye la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariontes incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac* y *trp*. En levadura, puede usarse el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, pueden usarse el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucariotes, éstos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente unida con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de terminación transcripcional y traduccional. Los diversos ácidos nucleicos y secuencias de control descritos anteriormente pueden unirse juntos para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, puede expresarse una secuencia de nucleótidos de la presente invención insertando la secuencia de nucleótidos o una construcción de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de manera que la secuencia codificante se una operativamente a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector normalmente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector va a introducirse. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

El vector puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la auto-replicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el (los) que se ha integrado. Además, puede usarse un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que va a introducirse en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

Los vectores de la presente invención contienen preferentemente uno o más marcadores de selección que permiten la fácil selección de células transformadas. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

Ejemplos de marcadores de selección bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores de selección para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), además de equivalentes de los mismos. Preferidos para su uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

Los vectores de la presente invención contienen preferentemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una localización(s) precisa(s) en el (los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una localización precisa, los elementos de integración deben contener preferentemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como 100 a 10.000 pares de bases, preferentemente 400 a 10.000 pares de bases, y lo más preferentemente 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para potenciar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" se define en el presente documento como una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

Ejemplos de orígenes de replicación bacteriano son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98:61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; documento WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen puede llevarse a cabo según los métodos desvelados en el documento WO 00/24883.

Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención puede insertarse en la célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Puede obtenerse un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador de selección amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador de selección, y así pueden seleccionarse copias adicionales del polinucleótido para cultivar las células en presencia del agente de selección apropiado.

Los procedimientos usados para unir los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son muy conocidos para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, arriba).

Células huésped

La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se usa ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de manera que el vector se mantenga como integrante cromosómico o como vector extracromosómico auto-replicante como se describe anteriormente. El término "célula huésped" engloba cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

Microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias Gram-positivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias Gram-negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un

Bacillus alcalófilo.

La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede efectuarse, por ejemplo, por transformación por protoplastos (véase, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando 5 células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

10 La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos", como se usa en el presente documento, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como se define por Hawksworth et al., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, 15 RU), además de los Oomycota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, arriba, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, arriba).

En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se usa en el presente documento, incluye levadura ascospórigena (Endomycetales), levadura basidiospórigena y levadura que 20 pertenece a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Como la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de la presente invención, la levadura debe definirse como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

25 En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, 30 *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" 35 incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth et al., 1995, arriba). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el metabolismo del carbono es aerobio estricto. A diferencia, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono 40 puede ser fermentativo.

En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, 45 *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o 50 *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped 55 fúngica filamentosa es una célula de la cepa de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes* 60 *versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas pueden transformarse por un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de un modo en sí conocido. Procedimientos adecuados para la 65 transformación de las células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238 023 y

Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y el documento WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker and Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 5 Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

10 La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma no mutante es capaz de producir el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que 15 comprenden (a) cultivar una célula huésped en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse 20 por cultivo en matraz oscilante, y fermentación a pequeña a escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, de lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y en condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o aisle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y de nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o 25 pueden prepararse según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo). Si el polipéptido es secretado en el medio nutritivo, el polipéptido puede recuperarse directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, puede recuperarse de lisados celulares.

Los polipéptidos pueden detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los 30 polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de actividad antimicrobiana para determinar la actividad del polipéptido como se describe en el presente documento.

El polipéptido resultante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido 35 puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

Los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófobo, 40 cromatoenfoco y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

Plantas

45 La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta o célula de planta que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad antimicrobiana de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido puede recuperarse de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido 50 recombinante puede usarse como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorar el valor nutritivo, palatabilidad y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son pastos, tales como pasto de pradera (pasto azul, Poa), pasto para 55 forraje tal como Festuca, Lolium, pasto de clima templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz (grano).

Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo 60 modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, además de los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de células de planta específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, 65 vacuolas, peroxisomas y citoplasma, también se considera que son una parte de planta. Además, cualquier célula de

planta, sea cual sea el origen del tejido, se considera que es una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos y células específicos aislados para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermos, aleurona y envueltas de semillas.

5 También están incluidos dentro del alcance de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

La planta transgénica o célula de planta que expresa un polipéptido de la presente invención puede construirse según métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula de planta se construye incorporando una o
10 más construcciones de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la planta modificada resultante o célula de planta en una planta transgénica o célula de planta.

La construcción de expresión es convenientemente una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente unido con secuencias
15 reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta de elección. Además, la construcción de expresión puede comprender un marcador de selección útil para identificar células huésped en las que la construcción de expresión se ha integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción de la construcción en la planta en cuestión (lo último depende del método de introducción de ADN que va a usarse).

20 La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, etapa o tejido, y el producto génico puede ser dirigido
25 a un tejido o parte de planta específico tal como semillas u hojas. Secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, por Tague et al., 1988, Plant Physiology 86: 506.

Para la expresión constitutiva, pueden usarse 35S-CaMV, la ubiquitina 1 de maíz y el promotor de actina 1 de arroz (Franck et al., 1980, Cell 21: 285-294, Christensen et al., 1992, Plant Mo. Biol. 18: 675-689; Zhang et al., 1991, Plant
30 Cell 3: 1155-1165). Promotores específicos de órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos de demanda de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos de demanda metabólica tales como meristemos (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o albúmina de arroz (Wu et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legumina B4 y el gen de
35 proteína de semilla desconocido de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de la semilla (Chen et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 935-941), el promotor napa de proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en el documento WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcS* de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, Plant
40 Physiology 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus Chlorella (Mitra y Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93), o el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor *pin2* de patata (Xu et al., 1993, Plant Molecular Biology 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducido por sustancias exógenamente aplicadas
45 que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

También puede usarse un elemento potenciador promotor para lograr mayor expresión de un polipéptido de la presente invención en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador promotor puede ser un intrón que se pone
50 entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, arriba, desvelan el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para potenciar la expresión.

El gen marcador de selección y cualquier otra parte de la construcción de expresión pueden elegirse de aquellos disponibles en la materia.

55 La construcción de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, que incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

60 Actualmente, la transferencia génica mediada por *Agrobacterium* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hoojkas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38) y también puede usarse para transformar monocotiledóneas, aunque frecuentemente se usan otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas
65 es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o tungsteno recubiertas con el ADN transformante)

de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe por Omirulleh et al., 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

5

Tras la transformación, los transformantes que tienen incorporada la construcción de expresión se seleccionan y regeneran en plantas completas según métodos muy conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección tanto durante la regeneración como en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, co-transformación con dos construcciones de T-ADN separadas o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

10

La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) cultivar una planta transgénica o una célula de planta que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad antimicrobiana de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

15

Composiciones

La presente invención también se refiere a composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferentemente, las composiciones están enriquecidas en un polipéptido tal. El término "enriquecidas" indica que la actividad antimicrobiana de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de 1,1.

20

Las composiciones pueden comprender además otro agente farmacéuticamente activo, tal como un agente biocida o biostático adicional, tal como otro polipéptido antimicrobiano que presenta actividad antimicrobiana como se ha definido anteriormente. El agente biocida puede ser un antibiótico, como se conoce en la técnica. Clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.; penicilinas en combinación con inhibidores de beta-lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactam, etc.; carbapenémicos; monobactámicos; aminoglucósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloranfenicol; metronidazol; espectinomina; trimetoprim; vancomicina; etc. El agente biocida también puede ser un agente antimicótico, que incluye polienos, por ejemplo anfotericina B, nistatina; 5-flucosina; y azoles, por ejemplo miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

25

30

En una realización, el agente biocida es un agente químico no enzimático. En otra realización, el agente biocida es un agente químico no de polipéptido.

35

Las composiciones pueden comprender un material de vehículo adecuado. Las composiciones también pueden comprender un vehículo de administración adecuado capaz de administrar los polipéptidos antimicrobianos de la invención al locus deseado cuando las composiciones se usan como un medicamento.

40

Las composiciones de polipéptido pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que va a incluirse en la composición puede estabilizarse según métodos conocidos en la técnica.

45

Se dan más adelante ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones en las que se usa la composición pueden determinarse basándose en métodos conocidos en la técnica.

50 Métodos y usos

La presente invención también se refiere a métodos de uso de los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana. Los polipéptidos antimicrobianos normalmente son útiles en cualquier sitio sometido a contaminación por bacterias, hongos, levadura o algas. Normalmente, los sitios están en sistemas acuosos tales como sistemas de agua de refrigeración, agua de aclarado de la colada, sistemas de aceite tales como aceites de corte, lubricantes, campos del aceite y similares, donde los microorganismos necesitan ser aniquilados o donde su crecimiento necesita controlarse. Sin embargo, la presente invención también puede usarse en todas las aplicaciones para las que son útiles las composiciones antimicrobianas conocidas, tales como protección de madera, látex, adhesivo, pegamento, papel, cartón, textil, cuero, plásticos, sellado y pienso.

60

Otros usos incluyen conservación de alimentos, bebidas, cosméticos tales como lociones, cremas, geles, pomadas, jabones, champús, acondicionadores, antitranspirantes, desodorantes, enjuague bucal, productos de lentes de contacto, formulaciones de enzima, o componentes alimenticios.

65 Así, los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden ser útiles como desinfectante, por ejemplo, en el

tratamiento de infecciones en el ojo o la boca, infecciones de la piel; en antitranspirantes o desodorantes; para la limpieza y desinfección de lentes de contacto y dientes (cuidado bucal).

En general, se contempla que los polipéptidos antimicrobianos de la presente invención son útiles para la limpieza, desinfección o inhibición del crecimiento microbiano sobre cualquier superficie. Ejemplos de superficies, que pueden ponerse ventajosamente en contacto con los polipéptidos antimicrobianos de la invención, son superficies de equipo de proceso usado, por ejemplo, en lecherías, plantas de procesos químicos o farmacéuticos, sistemas sanitarios de agua, plantas de procesamiento de aceite, plantas de procesamiento de pulpa de papel, plantas de tratamiento de aguas y torres de refrigeración. Los polipéptidos antimicrobianos de la invención deben usarse en una cantidad, que es eficaz para la limpieza, desinfección o inhibición del crecimiento microbiano sobre la superficie en cuestión.

Los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden usarse además para la limpieza de superficies y utensilios de cocina en plantas de procesamiento de alimentos y en cualquier área en la que se prepara comida o se sirve tal como hospitales, residencias de ancianos y restaurantes.

También puede usarse como agente de conservación o un agente de desinfección en pinturas a base de agua.

La invención también se refiere al uso de un polipéptido antimicrobiano o composición de la invención como un medicamento. Además, también puede usarse un polipéptido antimicrobiano o composición de la invención para la fabricación de un medicamento para controlar o combatir microorganismos, tales como organismos fúngicos o bacterias, preferentemente bacterias Gram-positivas.

La composición y el polipéptido antimicrobiano de la invención pueden usarse como agente terapéutico o profiláctico veterinario o humano antimicrobiano. Así, la composición y polipéptido antimicrobiano de la invención pueden usarse en la preparación de agentes terapéuticos o agentes profilácticos veterinarios o humanos para el tratamiento de infecciones microbianas, tales como infecciones bacterianas o fúngicas, preferentemente infecciones por bacterias Gram-positivas. En particular, las infecciones microbianas pueden asociarse a enfermedades de pulmón que incluyen, pero no se limitan a, tuberculosis, neumonía y fibrosis quística; y enfermedades de transmisión sexual que incluyen, pero no se limitan a, gonorrea y clamidia.

La composición de la invención comprende una cantidad eficaz del polipéptido antimicrobiano de la invención.

El término "cantidad eficaz", cuando se usa en el presente documento, pretende significar una cantidad de los polipéptidos antimicrobianos de la invención, que es suficiente para inhibir el crecimiento de los microorganismos en cuestión.

La invención también se refiere a composiciones o productos de cicatrización tales como vendas, dispositivos médicos tales como, por ejemplo, catéteres y además a productos capilares anticaspa, tales como champús.

Las formulaciones de los polipéptidos antimicrobianos de la invención se administran a un huésped que padece o tiene predisposición a una infección microbiana. La administración puede ser tópica, localizada o sistémica, dependiendo del microorganismo específico, preferentemente será localizada. Generalmente, la dosis de los polipéptidos antimicrobianos de la invención será suficiente para reducir la población microbiana al menos aproximadamente el 50 %, normalmente a al menos 1 log, y puede ser 2 o más logaritmos de aniquilación. Los compuestos de la presente invención se administran a una dosificación que reduce la población microbiana mientras que minimiza cualquier efecto secundario. Se contempla que la composición se obtendrá y usará bajo la orientación de un médico para uso *in vivo*. Los polipéptidos antimicrobianos de la invención son particularmente útiles para aniquilar bacterias Gram-negativas, que incluyen *Pseudomonas aeruginosa* y *Chlamydia trachomatis*; y bacterias Gram-positivas, que incluyen estreptococos tales como *Streptococcus pneumoniae*, *S. uberis*, *S. hyointestinalis*, *S. pyogenes* y *S. agalactiae*; y estafilococos tales como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus* y *S. carnosus*.

Las formulaciones de los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden administrarse a un huésped que padece o tiene predisposición a una infección pulmonar microbiana, tal como neumonía; o a una infección de herida microbiana, tal como una infección de herida bacteriana.

Las formulaciones de los polipéptidos antimicrobianos de la invención también pueden administrarse a un huésped que padece o tiene predisposición a una infección de la piel, tal como acné, dermatitis atópica o dermatitis seborreica; preferentemente la infección de la piel es una infección de la piel bacteriana, por ejemplo, producida por *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Pityrosporum ovale* o *Malassezia furfur*.

Los polipéptidos antimicrobianos de la invención también son útiles para formulaciones *in vitro* para aniquilar microbios, particularmente donde uno no desea introducir cantidades de antibióticos convencionales. Por ejemplo, los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden añadirse a las preparaciones de alimentos animales y/o

humanos; o pueden incluirse como aditivo para cultivos *in vitro* de células, para prevenir el crecimiento de microbios en cultivo de tejido.

La susceptibilidad de un microbio particular para aniquilar los polipéptidos antimicrobianos de la invención puede determinarse por pruebas *in vitro*, como se detalla en la sección experimental. Normalmente, un cultivo del microbio se combina con el polipéptido antimicrobiano a concentraciones variables durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la proteína actúe, normalmente entre aproximadamente una hora y un día. Entonces se cuentan los microbios viables, y se determina el nivel de aniquilación.

10 Microbios de interés incluyen, pero no se limitan a, bacterias Gram-negativas, por ejemplo: *Citrobacter sp.*; *Enterobacter sp.*; *Escherichia sp.*, por ejemplo, *E. coli*; *Klebsiella sp.*; *Morganella sp.*; *Proteus sp.*; *Providencia sp.*; *Salmonella sp.*, por ejemplo, *S. typhi*, *S. typhimurium*; *Serratia sp.*; *Shigella sp.*; *Pseudomonas sp.*, por ejemplo, *P. aeruginosa*; *Yersinia sp.*, por ejemplo, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*; *Francisella sp.*; *Pasturella sp.*; *Vibrio sp.*, por ejemplo, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*; *Campylobacter sp.*, por ejemplo, *C. jejuni*; *Haemophilus sp.*, por ejemplo, *H. influenzae*, *H. ducreyi*; *Bordetella sp.*, por ejemplo, *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*; *Brucella sp.*, *Neisseria sp.*, por ejemplo, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, etc. Otras bacterias de interés incluyen *Legionella sp.*, por ejemplo, *L. pneumophila*; *Listeria sp.*, por ejemplo, *L. monocytogenes*; *Mycoplasma sp.*, por ejemplo, *M. hominis*, *M. pneumoniae*; *Mycobacterium sp.*, por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Treponema sp.*, por ejemplo, *T. pallidum*; *Borrelia sp.*, por ejemplo, *B. burgdorferi*; *Leptospirae sp.*; *Rickettsia sp.*, por ejemplo, *R. rickettsii*, *R. typhi*; *Chlamydia sp.*, por ejemplo, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Helicobacter sp.*, por ejemplo, *H. pylori*, etc.

Patógenos no bacterianos de interés incluyen patógenos fúngicos y protozoarios, por ejemplo, *Plasmodia sp.*, por ejemplo, *P. falciparum*, *Trypanosoma sp.*, por ejemplo, *T. brucei*; esquistosomas; *Entamoeba sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.*, por ejemplo, *C. albicans*; etc.

Pueden emplearse diversos métodos para la administración. La formulación de polipéptido puede administrarse por vía oral, o puede inyectarse por vía intravascular, subcutánea, peritoneal, por aerosol, oftálmicamente, intravesical, por vía tópica, etc. Por ejemplo, los métodos de administración por inhalación son muy conocidos en la técnica. La dosificación de la formulación terapéutica variará ampliamente, dependiendo del polipéptido antimicrobiano específico que va a administrarse, la naturaleza de la enfermedad, la frecuencia de administración, el modo de administración, la eliminación del agente del huésped, y similares. La dosis inicial puede ser más grande, seguida de dosis de mantenimiento más pequeñas. La dosis puede administrarse tan poco frecuentemente como semanalmente o cada dos semanas, o fraccionarse en dosis más pequeñas y administrarse una vez o varias veces al día, dos veces a la semana, etc., para mantener un nivel de dosificación eficaz. En muchos casos, la administración por vía oral requerirá una mayor dosis que si se administra por vía intravenosa. Los enlaces amida, además de los extremos amino y carboxi, pueden modificarse para mayor estabilidad en la administración por vía oral. Por ejemplo, el extremo carboxi puede estar amidado.

40 Formulaciones

Los compuestos de la presente invención pueden incorporarse en una variedad de formulaciones para administración terapéutica. Más particularmente, los compuestos de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas por combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables apropiados, y pueden formularse en preparaciones en formas sólidas, semi-sólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, cremas, espumas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, lociones y aerosoles. Como tal, la administración de los compuestos puede lograrse de diversas formas, que incluyen administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, intratraqueal, etc. Los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden ser sistémicos después de la administración o pueden ser localizados por el uso de un implante u otra formulación que actúe reteniendo la dosis activa en el sitio de implantación.

En una realización, una formulación para uso tópico comprende un agente quelante que disminuye la concentración eficaz de cationes divalentes, particularmente calcio y magnesio. Por ejemplo, pueden incluirse agentes tales como citrato, EGTA o EDTA, donde se prefiere citrato. La concentración de citrato será normalmente de aproximadamente 1 a 10 mM.

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos, en combinación entre sí, o pueden usarse en combinación con otros compuestos conocidos (por ejemplo, perforina, agentes antiinflamatorios, antibióticos, etc.). En formas de dosificación farmacéuticas, los compuestos pueden administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente a modo de ejemplo y de ninguna forma son limitantes.

Para preparaciones orales, los compuestos pueden usarse solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa,

manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes humidificantes, conservantes y aromatizantes.

5

Los compuestos pueden formularse en preparaciones para inyecciones disolviéndolas, suspendiéndolas o emulsionándolas en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes,

10

estabilizadores y conservantes.

Los compuestos pueden utilizarse en formulación en aerosol para administrarse mediante inhalación. Los compuestos de la presente invención pueden formularse en propulsores aceptables presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

15

Los compuestos pueden usarse como lociones, por ejemplo, para prevenir la infección de quemaduras, por formulación con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

20

Además, los compuestos pueden prepararse en supositorios mezclando con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, Carbowax y polietilenglicoles, que funden a temperatura corporal, pero están solidificados a temperatura ambiente.

25

Pueden proporcionarse formas de dosificación unitaria para administración oral o rectal tales como jarabes, elixires y suspensiones en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharilla de café, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición que contiene uno o más compuestos de la presente invención. Similarmente, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el compuesto de la presente invención en una composición como una solución en agua estéril,

30

solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los implantes para las formulaciones de liberación sostenida son muy conocidos en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, planchas, etc., con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que es bien tolerado por el huésped. El implante que contiene los polipéptidos antimicrobianos de la invención se pone en proximidad al sitio de infección, de manera que la concentración local de agente activo aumenta con respecto al resto del cuerpo.

35

El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuestos de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y el efecto que va a lograrse, y la farmacodinámica asociada al compuesto en el huésped.

40

Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, soportes o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares, están fácilmente disponibles para el público.

45

Dosificaciones típicas para administración sistémica oscilan de 0,1 pg a 100 miligramos por kg de peso de sujeto por administración. Una dosificación típica puede ser un comprimido tomado de dos a seis veces al día, o una cápsula o comprimido de liberación con el tiempo tomado una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente más alto de principio activo. El efecto de liberación con el tiempo puede obtenerse por materiales de cápsula que se disuelven a diferentes valores de pH, por cápsulas que liberan lentamente por presión osmótica, o por cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

50

Aquellos expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del compuesto específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Algunos de los compuestos específicos son más potentes que otros. Dosificaciones preferidas para un compuesto dado son fácilmente determinables por aquellos expertos en la materia mediante una variedad de medios. Un medio preferido es medir la potencia fisiológica de un compuesto dado.

60

El uso de liposomas como vehículo de administración es un método de interés. Los liposomas se fusionan con las células del sitio diana y administran el contenido de la luz intracelularmente. Los liposomas se mantienen en contacto con las células durante el tiempo suficiente para la fusión, usando diversos medios para mantener el

65

contacto, tales como aislamiento, agentes de unión, y similares. En un aspecto de la invención, los liposomas se diseñan para ser aerosolizados para administración pulmonar. Los liposomas pueden prepararse con proteínas purificadas o péptidos que median en la fusión de membranas, tales como virus de Sendai o virus de la gripe, etc.

Los lípidos pueden ser cualquier combinación útil de lípidos formadores de proteosoma conocidos, que incluyen
5 lípidos catiónicos o de ión bipolar, tales como fosfatidilcolina. El lípido restante será normalmente lípidos neutros o ácidos, tales como colesterol, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, y similares.

Para preparar los liposomas, puede usarse el procedimiento descrito por Kato et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:3361. Brevemente, los lípidos y los péptidos que contienen la composición de luz se combinan en un medio acuoso
10 apropiado, convenientemente un medio de solución salina donde los sólidos totales estarán en el intervalo de aproximadamente el 1-10 por ciento en peso. Después de agitación intensa durante cortos periodos de tiempo, de aproximadamente 5-60 s, el tubo se coloca en un baño de agua templada de aproximadamente 25-40 °C y este ciclo se repitió aproximadamente 5-10 veces. La composición se sónica entonces durante un periodo de tiempo conveniente, generalmente de aproximadamente 1-10 s, y puede agitarse además por vórtex. El volumen se
15 expande entonces añadiendo medio acuoso, generalmente aumentando el volumen aproximadamente 1-2 veces, seguido de agitación y enfriamiento. Este método permite la incorporación en la luz de moléculas de alto peso molecular.

Formulaciones con otros agentes activos

20 Para su uso en los métodos objeto, los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden formularse con otros agentes farmacéuticamente activos, particularmente otros agentes antimicrobianos. Otros agentes de interés incluyen una amplia variedad de antibióticos, como se conoce en la técnica. Clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.;
25 penicilinas en combinación con inhibidores de beta-lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactam, etc.; carbapenémicos; monobactámicos; aminoglucósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloranfenicol; metronidazol; espectinomicina; trimetoprim; vancomicina; etc.

30 También son útiles agentes antimicóticos, que incluyen polienos, por ejemplo anfotericina B, nistatina; 5-flucosina; y azoles, por ejemplo miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Fármacos antituberculóticos incluyen isoniazida, etambutol, estreptomycinina y rifampina. También pueden incluirse citocinas en una formulación de los polipéptidos antimicrobianos de la invención, por ejemplo interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 12, etc.

Síntesis *in vitro*

Los péptidos antimicrobianos de la invención pueden prepararse por síntesis *in vitro*, usando métodos convencionales como se conoce en la técnica. Están disponibles diversos aparatos sintéticos comerciales, por
40 ejemplo, sintetizadores automatizados por Applied Biosystems Inc., Beckman, etc. Usando sintetizadores, los aminoácidos que existen de forma natural pueden sustituirse con aminoácidos no naturales, particularmente D-isómeros (o formas D), por ejemplo, D-alanina y D-isoleucina, diaestereoisómeros, cadenas laterales que tienen diferentes longitudes o funcionalidades, y similares. La secuencia particular y el modo de preparación se determinarán por conveniencia, economía, pureza requerida, y similares.

45 Puede proporcionarse enlace químico a diversos péptidos o proteínas que comprenden funcionalidades convenientes para la unión, tales como grupos amino para la formación de amida o amina sustituida, por ejemplo aminación reductora, grupos tiol para la formación de tioéter o disulfuro, grupos carboxilo para la formación de amida, y similares.

50 Si se desea, pueden introducirse diversos grupos en el péptido durante la síntesis o durante la expresión, que permiten el enlace con otras moléculas o con una superficie. Así, pueden usarse cisteínas para preparar tioéteres, histidinas para unir con un complejo de ión metálico, grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, grupos amino para formar amidas, y similares.

55 Los polipéptidos también pueden aislarse y purificarse según métodos convencionales de síntesis recombinante. Un lisado puede prepararse a partir de la expresión huésped y el lisado purificarse usando HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, u otra técnica de purificación. En general, las composiciones que se usan comprenderán al menos el 20 % en peso del producto deseado, más normalmente al
60 menos aproximadamente el 75 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 95 % en peso, y para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente el 99,5 % en peso, en relación con los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, el porcentaje se basará en la proteína total

65

Pienso para animales

La presente invención también se refiere a métodos de uso de los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana en pienso para animales, además de a composiciones de pienso y aditivos para pienso que comprenden los 5 polipéptidos antimicrobianos de la invención.

El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes, tales como vacas, ovejas y caballos. En una realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales mono-gástricos, por ejemplo cerdos o puercos (que incluyen, pero no 10 se limitan a, cochinitos, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos y pollo (que incluyen, pero no se limitan a, pollos de engorde, ponedoras); terneros jóvenes; y peces (que incluyen, pero no se limitan a, salmón).

El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición 15 adecuada para, o prevista para, ingesta por un animal.

En el uso según la invención, el polipéptido antimicrobiano puede ser alimentado al animal antes, después o simultáneamente con la dieta. Se prefiere lo último.

20 En una realización particular, el polipéptido antimicrobiano, en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, está bien definido. Bien definido significa que la preparación de polipéptido antimicrobiano es al menos el 50 % pura como se ha determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (véase el Ejemplo 12 del documento WO 01/58275). En otras realizaciones particulares, la preparación de polipéptido antimicrobiano es al menos el 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos el 95 % pura como se ha 25 determinado por este método.

Una preparación de polipéptido antimicrobiano bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil de dosificar correctamente al pienso un polipéptido antimicrobiano que esté esencialmente libre de interferencia o contaminación de otros polipéptidos antimicrobianos. El término dosificar correctamente se refiere en particular al 30 objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.

Para el uso en pienso para animales, sin embargo, el polipéptido antimicrobiano no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otras enzimas, en cuyo caso podría llamarse una preparación de polipéptido antimicrobiano. 35

La preparación de polipéptido antimicrobiano puede (a) añadirse directamente al pienso (o usarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas vegetales), o (b) puede usarse en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos para pienso o premezclas que posteriormente se añaden al pienso (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza de la 40 preparación de polipéptido antimicrobiano original, tanto si se usa como si no según (a) o (b) anteriores.

Las preparaciones de polipéptido antimicrobiano con purezas de este orden de magnitud son en particular obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtengan tan fácilmente y también se sometan a una variación lote a lote mucho más grande cuando el polipéptido antimicrobiano se produce por métodos de 45 fermentación tradicionales.

Tal preparación de polipéptido antimicrobiano puede, por supuesto, mezclarse con otras enzimas.

El término proteínas vegetales, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto, 50 composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de o que se origina de un vegetal, que incluye proteínas modificadas y derivados de proteína. En realizaciones particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos el 10, 20, 30, 40, 50 o el 60 % (peso/peso).

Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes de proteína vegetal, tales como legumbres y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, 55 tales como harina de soja, harina de altramuz y harina de semilla de colza.

En una realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo soja, altramuz, guisante o judía. 60

En otra realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de las fuentes de proteína vegetal es material son semilla de colza y col.

65

La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (grano), arroz y sorgo.

5

El polipéptido antimicrobiano puede añadirse al pienso en cualquier forma, sea como un polipéptido antimicrobiano relativamente puro, como en mezcla con otros componentes previstos para adición a pienso para animales, es decir, en forma de aditivos para pienso para animales, tales como las llamadas premezclas para pienso para animales.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones para su uso en pienso para animales, tal como pienso para animales, y aditivos para pienso para animales, por ejemplo premezclas.

Aparte del polipéptido antimicrobiano de la invención, los aditivos para pienso para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un

15 oligoelemento, y/o al menos un macroelemento.

Además, componentes de aditivos para pienso opcionales son agentes colorantes, compuestos de aroma, estabilizadores y/o al menos otra enzima seleccionada de entre fitasas EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26; xilanasas EC 3.2.1.8; galactanasas EC 3.2.1.89; y/o beta-glucanasas EC 3.2.1.4.

20

En una realización particular, estas otras enzimas están bien definidas (como se ha definido anteriormente para las preparaciones de polipéptido antimicrobiano).

Ejemplos de otros péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), y variantes, o fragmentos de los mismos que

25

retienen la actividad antimicrobiana.

Ejemplos de otros polipéptidos antifúngicos (AFP) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, además de variantes y fragmentos de los mismos que retienen la actividad antifúngica, como se desvela en los

30

documentos WO 94/01459 y WO 02/090384.

Normalmente, las vitaminas liposolubles y solubles en agua, además de los oligoelementos, forman parte de una llamada premezcla prevista para adición al pienso, mientras que los macroelementos se añaden normalmente por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido

35

antimicrobiano de la invención, es un aditivo para pienso para animales de la invención.

En una realización particular, el aditivo para pienso para animales de la invención está previsto para ser incluido (o prescrito como que tiene que incluirse) en dietas animales o pienso a niveles del 0,01 al 10,0 %; más particularmente 0,05 al 5,0 %; o 0,2 al 1,0 % (% que significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en

40

particular para premezclas.

Lo siguiente son listas no excluyentes de los ejemplos de estos componentes:

45

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas solubles en agua son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo D-pantotenato de Ca.

Ejemplos de oligoelementos son manganeso, cinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

Ejemplos de macroelementos son calcio, fósforo y sodio.

50

Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y cochinitos/cerdos) se enumeran en la Tabla A del documento WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deben proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

55 Alternativamente, el aditivo para pienso para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A del documento WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro, etc., hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en una cantidad tal como para proporcionar una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o

60

columna cinco, o columna seis de la Tabla A.

La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales. Las composiciones de pienso para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves de corral y cerdos pueden caracterizarse como se indica en la Tabla B del documento WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para

65

peces pueden caracterizarse como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, tales dietas para peces

normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido de proteína cruda de 50-800 g/kg, y además comprende al menos un polipéptido antimicrobiano como se reivindica en el presente documento.

5

Además, o alternativamente (al contenido de proteína cruda indicada anteriormente), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

10

En realizaciones particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de uno cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 en la Tabla B del documento WO 01/58275 (R. 2-5).

15 La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, Proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

20 La energía metabolizable puede calcularse basándose en la publicación de NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y the European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Los Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

25 El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula basándose en las tablas para piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

30 En una realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal o fuente de proteína como se ha definido anteriormente.

35 En todavía otras realizaciones particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80 % de maíz; y/o 0-80 % de sorgo; y/o 0-70 % de trigo; y/o 0-70 % de cebada; y/o 0-30 % de avena; y/o 0-40 % de harina de soja; y/o 0-10 % de harina de pescado; y/o 0-20 % de suero de leche. Las dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como pienso en puré (no en gránulos) o pienso en gránulos. Normalmente, los piensos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales según las especificaciones para las especies en cuestión. Pueden añadirse enzimas como formulaciones de enzima sólida o líquida. Por ejemplo, una formulación de enzima sólida se añade normalmente antes o durante la etapa de mezcla; y una preparación de 40 enzima líquida se añade normalmente después de la etapa de granulación. La enzima también puede incorporarse en un aditivo para pienso o premezcla.

La concentración de enzima final en la dieta está dentro del intervalo de 0,01-200 mg de proteína de enzima por kg de dieta, por ejemplo en el intervalo de 5-30 mg de proteína de enzima por kg de dieta animal.

45

El polipéptido antimicrobiano puede administrarse en una o más de las siguientes cantidades (intervalos de dosificación): 0,01-200; o 0,01-100; o 0,05-100; o 0,05-50; o 0,10-10 – siendo todos estos intervalos en mg de proteína de polipéptido antimicrobiano por kg de pienso (ppm).

50 Para determinar los mg de proteína de polipéptido antimicrobiano por kg de pienso, el polipéptido antimicrobiano se purifica de la composición de pienso, y se determina la actividad específica del polipéptido antimicrobiano purificado usando un ensayo relevante (véase en actividad antimicrobiana, sustratos y ensayos). La actividad antimicrobiana de la composición de pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína de polipéptido antimicrobiano por kg de pienso.

55

Los mismos principios se aplican para determinar mg de proteína de polipéptido antimicrobiano en aditivos de pienso. Por supuesto, si está disponible una muestra del polipéptido antimicrobiano usada para preparar el aditivo de pienso o el pienso, la actividad específica se determina a partir de muestra (no se necesita purificar el polipéptido antimicrobiano de la composición de pienso o el aditivo).

60

La presente invención se describe además por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

65 Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad para

reactivo.

Ejemplo 1

5 Evaluación de la concentración eficaz mínima

Se probaron tres polipéptidos antimicrobianos, que son variantes de SEQ ID NO:1, para la actividad antimicrobiana. Se realizó un ensayo Concentración Eficaz Mínima (CEM, expresada como µg/ml) contra diferentes microorganismos usando los tres mutantes de plectasina, Y40YR, N17R y Y25R siguiendo el protocolo descrito en el libro de Methods in Molecular Biology, vol 78, Antibacterial peptide protocol William M. Shafer, Human Press.

El mutante de plectasina "Y40YR" se construyó añadiendo un resto de arginina al final de la secuencia de aminoácidos de plectasina.

15 Los resultados mostraron actividad mejorada de los tres péptidos antimicrobianos en comparación con plectasina no mutante (SEQ ID NO:1) contra las bacterias *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 1. Valores de CEM; todos los valores son µg/ml.

Mutación	SEQ ID NO:	CEM contra <i>B. subtilis</i>	CEM contra <i>M. luteus</i>	CEM contra <i>S. epidermidis</i>
Tipo salvaje	1	0.09	1.89	0.98
Y40YR	99	0.05	0.18	0.31
N17R	95	0.07	0.32	0.59
Y25R	117	0.04	1.40	ND

20

Ejemplo 2

Evaluación de la actividad antimicrobiana

25

Se probaron una variedad de polipéptidos antimicrobianos, que son variantes de SEQ ID NO:1 (plectasina), para actividad antimicrobiana expresándolos en *S. cerevisiae* y cribando el sobrenadante de los transformantes de levadura para actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus carnosus* ATCC51365.

30 Se prepararon medios de crecimiento y soluciones como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis (1989), Molecular cloning, Cold Spring Harbour, Laboratory Press, New York.

Se llevó a cabo el ensayo de difusión radial como se describe en Methods in Molecular Biology, vol 78, Antibacterial peptide protocol, William M. Shafer, Human Press.

35

Se sembraron 200-300 colonias transformantes de levadura en placas redondas de 14 cm que contenían 25 ml de medio de crecimiento SC complementado con 1,5 % de galactosa, 0,5 % de glucosa y 1,5 % de agarosa. Las placas se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente, se extendieron con 25 ml del mismo medio de crecimiento y se dejaron crecer durante tres días a 30 grados Celsius.

40

Entonces, las placas se extendieron con 25 ml de medio de crecimiento de LB que contenía 1,5 % de agarosa y 10^5 células de la cepa indicadora *Staphylococcus carnosus* y se incubaron a 30 grados Celsius durante la noche para permitir el crecimiento de las células bacterianas. Al día siguiente, las placas se tiñeron con MTT 1,5 mM para facilitar la visualización de las zonas despejadas.

45

Se transfirieron las colonias de levadura que crearon las zonas despejadas a placas de microtítulo que contenían 200 µl de medio de crecimiento SC complementado con 2 % de glucosa y ampicilina (100 mg/l). Tales placas designadas las "placas madre" se incubaron durante 2 días a 30 grados Celsius con agitación a 450 rpm para permitir el crecimiento de levadura.

50

Se transfirieron 10 µl de medio de crecimiento SC de cada pocillo de las placas madre a nuevas placas de microtítulo que contenían 200 µl de medio de crecimiento SC con 1,5 % de galactosa y 0,5 % glucosa. Estas placas se llamaron las placas hija y se incubaron durante 3 días a 30 grados Celsius con 450 rpm de agitación para permitir el crecimiento de levadura y la síntesis de péptidos.

55

Finalmente se realizó un ensayo de difusión radial (RDA) siguiendo el protocolo descrito en Methods in Molecular Biology para analizar y cuantificar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de levadura contra *S. carnosus*.

Brevemente, se vertieron 30 ml de medio de sustrato mínimo que contenía 1 % de agarosa y 5×10^5 ufc/ml de *S. carnosus* en una placa OmniTray (Nunc, 242811). Se insertó una placa TSP de Nunc (N.º 445497) inmediatamente sobre la placa para permitir una formación de patrón de 96 pocillos. Una vez los medios habían solidificado, se retiró la placa TSP y se aplicaron 10 µl de muestras de sobrenadante de levadura sobre los orificios. Las placas se incubaron 3 horas a 37 grados Celsius y se extendieron con 15 ml de medio de crecimiento de agar de LB. Finalmente, las placas se incubaron durante la noche a 37 grados Celsius y se colorearon con MTT 1,5 mM para visualizar las zonas despejadas.

Se realizó la inspección y las mediciones de las zonas despejadas sobre las placas. Se recogieron los clones de levadura correspondientes que produjeron zonas despejadas de tamaño similar o mayor que los clones que codificaban plectasina no mutante de las placas madre y se transfirieron a placas de agar que contenían medio de crecimiento SC con 2 % de glucosa y ampicilina (100 mg/l). Tales placas se incubaron durante 2 días más a 30 grados Celsius para permitir el crecimiento de levadura. Posteriormente, se realizó PCR de la colonia, seguido de análisis de secuencias para identificar cambios de aminoácidos en la secuencia de plectasina.

Las mutaciones y actividades antimicrobianas correspondientes, con respecto a la actividad de plectasina, se muestran en la Tabla 2. Una actividad de 2 se corresponde con la actividad de plectasina. Una actividad de 3 es mejor que la plectasina, y 1 es peor que la plectasina.

Tabla 2. Datos de actividad antimicrobiana del ensayo de cribado de levadura.

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Tipo salvaje	1	2
GFGCRGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5R	3	3
GFGCQGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5Q	4	3
GFGCVGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5V	5	3
GFGCGGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5G	6	3
GFGCSGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5S	7	3
GFGCAGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5A	8	3
GFGCNGKWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	P7K	9	3
GFGCNGRWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	P7R	10	3
GFGCNGPRDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	W8R	11	3
GFGCNGPWAEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9A	12	3
GFGCNGPWGEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9G	13	3
GFGCNGPWKEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9K	14	3
GFGCNGPWLEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9L	15	3

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWTEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9T	16	3
GFGCNGPWYEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9Y	17	3
GFGCNGPWFEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9F	18	3
GFGCNGPWHEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9H	19	3
GFGCNGPWMEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9M	20	3
GFGCNGPWNEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9N	21	3
GFGCNGPWPEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9P	22	3
GFGCNGPWQEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9Q	23	3
GFGCNGPWSEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9S	24	3
GFGCNGPWWEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9V	25	3
GFGCNGPWDGDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10G	26	3
GFGCNGPWSDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10S	27	3
GFGCNGPWDEFDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11F	28	3
GFGCNGPWDEGDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11G	29	3
GFGCNGPWDEHDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11H	30	3
GFGCNGPWDEKDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11K	31	3
GFGCNGPWDELDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11L	32	3
GFGCNGPWDEPDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11P	33	3
GFGCNGPWDESDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11S	34	3
GFGCNGPWDEETDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11T	35	3
GFGCNGPWDEVDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11V	36	3
GFGCNGPWDEWDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11W	37	3
GFGCNGPWDEIDMQCHNHCKSIKGYKGGY	D11I	38	3

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
CAKGGFVCKCY			
GFGCNGPWDEMDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11M	39	3
GFGCNGPWDENDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11N	40	3
GFGCNGPWDERDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11R	41	3
GFGCNGPWDEYDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11Y	42	3
GFGCNGPWDEDDRQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13R	43	3
GFGCNGPWDEDDSQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13S	44	3
GFGCNGPWDEDDVQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13V	45	3
GFGCNGPWDEDDMFCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14F	46	3
GFGCNGPWDEDDMGCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14G	47	3
GFGCNGPWDEDDMHCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14H	48	3
GFGCNGPWDEDDMSCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14S	49	3
GFGCNGPWDEDDMYCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14Y	50	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNLCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	H18L	51	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSLKGYKGG GYCAKGGFVCKCY	I22L	52	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSVKGYKGG GYCAKGGFVCKCY	122V	53	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKHYKGG YCAKGGFVCKCY	G24H	54	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKKYKGG YCAKGGFVCKCY	G24K	55	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKNYKGG YCAKGGFVCKCY	G24N	56	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG FCAKGGFVCKCY	Y29F	57	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG RCAKGGFVCKCY	Y29R	58	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG WCAKGGFVCKCY	Y29W	59	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCKKGGFVCKCY	A31K	60	3

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCNKGGFVCKCY	A31N	61	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCQKGGFVCKCY	A31Q	62	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCTKGGFVCKCY	A31T	63	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCYKGGFVCKCY	A31Y	64	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	G33K	65	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKQGFVCKCY	G33Q	66	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKRGFVCKCY	G33R	67	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGFVCKCY	G34K	68	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGRFVCKCY	G34R	69	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFLVCKCY	F35L	70	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFLCKCY	V36L	71	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFMCKCY	V36M	72	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFTCKCY	V36T	73	3
GFGCKGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	N5K+K26R	74	3
GFGCKGPWDEGDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5K+D11G	75	3
GFGCSGPWDEDDMRCHNHCKAIRGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5S+Q14R+S21A+ K23R	76	3
GFGCSGPWDEDDMRCHSHCKSIRGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5S+Q14R+N17S+ K23R	77	3
GFGCNGPRDEDDRQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	W8R+M13R	78	3
GFGCNGPWGEDDMRCHNHCKSIRGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9G+Q14R+K23R	79	3
GFGCNGPWDGDDMRCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10G+Q14R	80	3
GFGCNGPWDEGDMQCHNHCKSIKGYKGG YCARGGFVCKCY	D11G+K32R	81	3
GFGCNGPWDEGDMQCHSHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11G+N17S	82	3
GFGCNGPWDEGDMQCHNHCKSVKGYKG	D11G+I22V	83	3

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GYCAKGGFVCKCY			
GFGCNGPWDENDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFICKCY	D11N+V36I	84	3
GFGCNGPWDERDIQCHNHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	D11R+M13I	85	3
GFGCNGPWDEDDMVCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	Q14V+K26R	86	3
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCRCY	Q14R+K26R+K38R	87	3
GLGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	F2L	118	2
GWGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKG GYCAKGGFVCKCY	F2W	119	2
GIGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	F2I	120	2
GFGCLGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5L	121	2
GFGCMGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5M	122	2
GFGCNRPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	G6R	123	2
GFGCNAPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	G6A	124	2
GFGCNKPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	G6K	125	2
GFGCNGAWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	P7A	126	2
GFGCNGLWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	P7L	127	2
GFGCNGVWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	P7V	128	2
GFGCNGPWCEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9C	129	2
GFGCNGPWIEDDMQCHNHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	D9I	130	2
GFGCNGPWREDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9R	131	2
GFGCNGPWWEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D9W	132	2
GFGCNGPWDADDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10A	133	2
GFGCNGPWLDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10L	134	2
GFGCNGPWCDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10C	135	2

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	E10Q	136	2
GFGCNGPWDEADMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11A	137	2
GFGCNGPWDECDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11C	138	2
GFGCNGPWDEDDPMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D12P	139	2
GFGCNGPWDEDDAQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13A	140	2
GFGCNGPWDEDDFQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13F	141	2
GFGCNGPWDEDDGQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13G	142	2
GFGCNGPWDEDDLQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13L	143	2
GFGCNGPWDEDDTQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13T	144	2
GFGCNGPWDEDDYQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13Y	145	2
GFGCNGPWDEDDMACHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14A	146	2
GFGCNGPWDEDDMCCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14C	147	2
GFGCNGPWDEDDMICHNHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	Q14I	148	2
GFGCNGPWDEDDMKCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14K	149	2
GFGCNGPWDEDDMMCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14M	150	2
GFGCNGPWDEDDMPCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14P	151	2
GFGCNGPWDEDDMTCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14T	152	2
GFGCNGPWDEDDMVCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14V	153	2
GFGCNGPWDEDDMWCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14W	154	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNACKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	H18A	155	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNFCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	H18F	156	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNQCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	H18Q	157	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNTCKSIKGYKGG	H18T	158	2

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
YCAKGGFVCKCY			
GFGCNGPWDEDDMQCHNVCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	H18V	159	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCQSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	K20Q	160	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSMKGYKG GYCAKGGFVCKCY	I22M	161	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSTKGYKG GYCAKGGFVCKCY	I22T	162	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSWKGYKG GYCAKGGFVCKCY	I22W	163	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKAYKGG YCAKGGFVCKCY	G24A	164	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKPYKGG YCAKGGFVCKCY	G24P	165	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKFKYKGG YCAKGGFVCKCY	G24F	166	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKIYKGGY CAKGGFVCKCY	G24I	167	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKQYKGG YCAKGGFVCKCY	G24Q	168	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKRYKGG YCAKGGFVCKCY	G24R	169	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKSYKGG YCAKGGFVCKCY	G24S	170	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKTYKGG YCAKGGFVCKCY	G24T	171	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKYKGG YCAKGGFVCKCY	G24Y	172	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGHKGG YCAKGGFVCKCY	Y25H	173	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGGKGG YCAKGGFVCKCY	Y25K	174	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGLKGG YCAKGGFVCKCY	Y25L	175	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGMKGG YCAKGGFVCKCY	Y25M	176	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGNKGG YCAKGGFVCKCY	Y25N	177	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGQKGG YCAKGGFVCKCY	Y25Q	178	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGSKGG YCAKGGFVCKCY	Y25S	179	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGVKGG YCAKGGFVCKCY	Y25V	180	2

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYFGG YCAKGGFVCKCY	K26F	181	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYHGG YCAKGGFVCKCY	K26H	182	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYTGG YCAKGGFVCKCY	K26T	183	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG ACAKGGFVCKCY	Y29A	184	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG HCAKGGFVCKCY	Y29H	185	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG LCAKGGFVCKCY	Y2 9L	186	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG MCAKGGFVCKCY	Y2 9M	187	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG SCAKGGFVCKCY	Y2 9S	188	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCEKGGFVCKCY	A31E	189	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCHKGGFVCKCY	A31H	190	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCIKGGFVCKCY	A31I	191	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCRKGGFVCKCY	A31R	192	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCSKGGFVCKCY	A31S	193	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCVKGGFVCKCY	A31V	194	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCARGGFVCKCY	K32R	195	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCATGGFVCKCY	K32T	196	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKEGFVCKCY	G33E	197	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKNGFVCKCY	G33N	198	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKSGFVCKCY	G33S	199	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKTGFVCKCY	G33T	200	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGHFVCKCY	G34H	201	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGWFVCKCY	G34W	202	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG	F35A	203	2

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
YCAKGGAVCKCY			
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGHVCKCY	F35H	204	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGIVCKCY	F35I	205	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGMVCKCY	F35M	206	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGVVCKCY	F35V	207	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGWVCKCY	F35W	208	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFICKCY	V36I	209	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFKCKCY	V36K	210	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFQCKCY	V36Q	211	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFRCKCY	V36R	212	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCHCY	K38H	213	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCNRY	K38N	214	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCRCY	K38R	215	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCI	Y40I	216	2
GFGCNGPWLEDDMQCHNHCKSIKGYNGG YCAKGGFVCKCY	D9L+K26N	217	2
GFGCNGPWDELDIQCHNHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	D11L+M13I	218	2
GFGCNGPWDEDDRQCHNHCKSIKGYKGG FCAKGGFVCKCY	M13R+Y29F	219	2
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIRGYRGG YCAKGGFVCKCY	Q14R+K23R+K26R	220	2
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCRSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14R+K20R	221	2
GFGCNGPWDEDDMSCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCRCY	Q14S+K38R	222	2
GFGCNGPWDEDDMQCHSHCKSIRGYKGG YCAKGGFVCKCY	N17S+K23R	223	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG FCARGGFVCKCY	Y29F+K32R	224	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCARGKFVCKCY	K32R+G34K	225	2

Ejemplo 3

Identificación de péptidos antimicrobianos con actividad antimicrobiana mejorada

- 5 Se probaron una variedad de polipéptidos antimicrobianos, que son variantes de SEQ ID NO:1, en el ensayo de TAPS. Puede usarse TAPS para identificar genes nuevos o mejorados que codifican péptidos que pueden aniquilar o inhibir el crecimiento de células diana (véase la solicitud PCT WO 2004/033715). El ensayo TAPS, un acrónimo de Trans Acting Peptide System, se basa en tener un huésped sensible que produce un péptido seguido de cribado de su actividad en *trans* contra una cepa indicadora. La ventaja de este sistema se basa en que el péptido antimicrobiano se expresa en la bacteria Gram-negativa *E. coli* y su actividad antimicrobiana puede monitorizarse en diferentes microbios que incluyen Gram-negativas, positivas u hongos. Adicionalmente, TAPS ofrece la posibilidad de producir AMP correctamente plegadas que contienen enlaces disulfuro en las células huésped, reteniendo así sus actividades antimicrobianas.
- 10
- 15 El enfoque de TAPS requiere primero que la expresión del péptido esté bajo el control de un promotor inducible con estrecha regulación, debido a que las células huésped son sensibles al péptido cuando lo producen. En segundo lugar, el péptido producido tiene que ser liberado a los medios de manera que pueda interactuar con el organismo diana.
- 20 El cribado TAPS puede llevarse a cabo tanto en medios sólidos como líquidos. En medios sólidos, una biblioteca de plásmidos se introduce inicialmente en células huésped de *E. coli*. Es importante que los transformantes se cultiven sobre la superficie de un filtro de acetato de celulosa dispuesto en medio de crecimiento de LB sin inductor (arabinosa) para evitar la expresión del péptido antimicrobiano y de ahí la inhibición del crecimiento. En la siguiente etapa, el filtro que contenía las colonias se transfiere a medio de crecimiento de LB que contiene inductor (0,1 % de arabinosa) para permitir la síntesis de péptidos. Posteriormente, la cepa objetivo, por ejemplo *S. carnosus*, se extiende sobre la placa y se deja crecer durante 12-16 horas a 37 grados Celsius. Finalmente, se realiza la inspección visual de las células huésped capaces de reducir la proliferación de las células diana y se recupera la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido antimicrobiano de las células huésped. Se obtiene análisis de secuencias de ADN de las variantes para esclarecer la naturaleza del péptido.
- 25
- 30 Como se ha mencionado anteriormente, el cribado TAPS también puede realizarse usando medio líquido. Este procedimiento requiere el uso de robótica para analizar grandes número de clones. En este sistema, se transforman células origami de *E. coli* huésped con la biblioteca de plásmidos y se siembran en medio de LB + 0,2 % de glucosa + ampicilina (200 mg/l). Entonces se inoculan colonias independientes en placas de 96 o 384 pocillos que contienen 200 µl de medio TB + ampicilina (200 mg/l) y se cultivan durante la noche a 37 grados Celsius. Estos cultivos se replican entonces robóticamente y se cultivan a fase exponencial hasta que se añade inductor (0,1 % de arabinosa) para desencadenar la síntesis de péptidos. La siguiente etapa consiste en hidrolizar las células de forma que el péptido se libere a los medios por hidrólisis en ácido caliente. Este tratamiento consiste en añadir tampón fosfato de sodio 1 M a pH 2,3 para obtener un pH final de aproximadamente 2,3 e incubar los cultivos durante la noche a 80
- 35
- 40 grados Celsius. Al día siguiente, se usa una alícuota de 25 µl de los cultivos hidrolizados para realizar una prueba de actividad contra los organismos diana deseados. La prueba de actividad realizada fue un ensayo de difusión radial (RDA) donde una alícuota de los cultivos hidrolizados se añadió a los medios de agarosa inoculados con la cepa objetivo, *S. carnosus*. Se identificaron fácilmente RDA obtenidos de las placas de cribado que contenían zonas despejadas correspondientes a los clones que presentan actividad antimicrobiana. Se realizaron mediciones del diámetro de las zonas despejadas para cuantificar la potencia de la actividad antimicrobiana de los péptidos.
- 45

La actividad antimicrobiana (contra *Staphylococcus carnosus*) de las variantes de plectasina probadas, que se midió usando el ensayo TAPS, se muestra en la Tabla 3. La actividad antimicrobiana se corresponde con el tamaño de la zona despejada y se ha clasificado como 4 > 3 > 2 > 1; mientras que 4 es mejor que 1, y la actividad de no mutante se corresponde con 1.

50

Tabla J. Datos de actividad antimicrobiana del ensayo TAPS.

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
	control		0
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Tipo de salvaje	1	1
GFGCKGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5K	88	2
GFGCYGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5Y	89	2

ES 2 621 568 T3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
GFGCNGPWDEDDKQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13K	90	3
GFGCNGPWDEDDMLCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14L	91	4
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	Q14R	92	4
GFGCNGPWDEDDMQCHHHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N17H	93	4
GFGCNGPWDEDDMQCHIHCKSIKGYKGGY CAKGGFVCKCY	N17I	94	2
GFGCNGPWDEDDMQCHRHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N17R	95	2
GFGCNGPWDEDDMQCHYHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N17Y	96	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCRSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	K20R	97	2
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	K2 6R	98	3
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCYR	Y40YR	99	2
GFGCYGPWDEDDMLCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	N5Y+Q14L	100	2
GFGCNGPWDEGDMQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	D11G+K26R	101	2
GFGCNGPWDEGDKQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	D11G+M13K+K26 R	102	3
GFGCNGPWDEDDKQCHRHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCYR	M13K+N17R+Y40 YR	103	3
GFGCNGPWDEDDMQCHRHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCYR	N17R+Y40YR	104	3
GFGCNGPWDENDMQCHNHCKFIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	D11N+S21F	105	4
GFGCNGPWDEDDKQCHRHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCY	M13K+N17R	106	3
GFGCNGPWDEDDKQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCKCYR	M13K+Y40YR	107	4
GFGCNGPWDEDDKQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	M13K+K26R	108	4
GFGCNGPWDEDDKQCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFVCRCY	M13K+K38R	109	4
GFGCNGPWDEGDMQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCYR	D11G+K26R+Y40 YR	110	4
GFGCNGPWDEGDKQCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCYR	D11G+M13K+K26 R+ Y40YR	111	4
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIKGYKGG	Q14R+Y40YR	112	3

Secuencia	Mutación(es)	SEQ ID NO:	Actividad
YCAKGGFVCKCYR			
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIKGYKGG YCAKGGFICKCY	Q14R+V36I	113	4
GFGCNGPWDEDDMRCHNHCKSIKGYRGG YCAKGGFVCKCY	Q14R+K26R	114	4
GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKFIKGYKGG YCTKGGFVCKCY	S21F+A31T	115	2

Ejemplo 4

5 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se expresaron y purificaron plectasina no mutante (SEQ ID NO:1) y cinco variantes de plectasina, que mostraron actividad mejorada en el método TAPS y/o en el sistema de levadura. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM, µg/ml) para probar su actividad antimicrobiana siguiendo las directrices de NCCLS (Clinical and Laboratory Standards Institute; antiguamente conocido como National Committee for Clinical and Laboratory Standards).

10

Los resultados mostraron que todas las variantes de plectasina tuvieron actividad mejorada, en comparación con la plectasina no mutante, contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*.

15

Tabla 4. Valores de CIM; todos los valores son µg/ml.

Mutación(es)	SEQ ID NO:	CIM contra <i>S. aureus</i>	CIM contra <i>M. luteus</i>	CIM contra <i>B. subtilis</i>
tipo salvaje	1	8	32	1
M13K+Y40YR	107	2	2	0.25
D11G+K26R	101	2	8	0.50
Q14K+K26R	116	2	1	0.13
D11G+K26R+Y40YR	110	0.50	0.25	0.06
D11G+M13K+K26R+ Y40YR	111	0.50	0.50	<0.03

20 Ejemplo 5

Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se expresaron y purificaron plectasina no mutante (SEQ ID NO:1) y varias variantes de plectasina. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para probar su actividad antimicrobiana siguiendo las pautas de NCCLS de CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; antiguamente conocido como National Committee for Clinical and Laboratory Standards).

25

Los péptidos se probaron contra las siguientes cepas:

30

A: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29213;

B: *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923;

C: *Staphylococcus aureus*, ATCC 29737;

D: *Staphylococcus aureus*, MRSA ST5 (2001), cepa clínica humana multirresistente de Statens Serum Institut, Dinamarca;

35

E: *Staphylococcus aureus*, MRSA ST80 (2003), cepa clínica humana multirresistente de Statens Serum Institut, Dinamarca.

Todos los valores de CIM representan un promedio de dos experimentos independientes; y todos los resultados en la Tabla 5 se expresan con respecto a plectasina no mutante:

- 5 **0:** > 100 % de CIM de plectasina no mutante;
1: 80-100 % de CIM de plectasina no mutante;
2: 50-80 % de CIM de plectasina no mutante;
3: < 50 % de CIM de plectasina no mutante.

10 Tabla 5. Valores de CIM relativa; nd = no determinado.

Mutación(es)	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E
tipo salvaje	1	1 (8 µg/mL)	1 (22 µg/mL)	1 (4 µg/mL)	1 (15 µg/mL)	1 (22 µg/mL)
N5R+M13Y+N17R	226	3	3	3	3	3
D9S+Q14K+V36L	227	3	3	3	3	3
N5S+M13W+N17R	228	3	nd	3	3	3
Q14R+K26R+K38R	87	3	3	3	3	3
D9G+Q14R+K23R	79	3	3	3	3	3
M13G+N17R+G33A	229	3	3	3	3	3
N5S+D9S+M13L+Q14R+N17V+A31S	230	3	3	3	3	3
D9S+Q14L+K26R	231	3	3	3	3	3
N5S+D9A+K26R	232	3	3	3	3	3
Q14R+K20R	221	3	3	3	3	3
N5G+M13L	233	2	3	3	3	3
D9A+K38R	234	3	3	3	3	3
D11G+K32R	81	1	3	3	2	3
Q14F	46	1	nd	3	2	3
N5R+M13V	235	3	nd	3	2	3
N5G+M13Y+N17K	236	3	3	3	3	2
Q14K+K26R	116	3	2	3	3	3
M13F+Q14K+K26R	237	3	nd	3	3	3
M13K+K38R	109	1	3	3	2	3
N5A+D9S+M13L+N17T	238	0	3	3	2	3
N17Y	96	1	3	3	2	2
M13T+Q14K+K26R	239	1	3	3	2	0
D9S	24	2	3	3	2	nd
N17R	95	nd	3	3	3	2
Q14R	92	2	3	3	3	0
N5S+Q14R+N17S+K23R	77	1	3	3	3	nd
N5R	3	1	2	2	2	2
D11G+K26R+Y40YR	110	3	3	3	3	nd

Mutación(es)	SEQ ID NO:	A	B	C	D	E
N5S+Q14R+S21A+K23R	76	1	3	2	2	0
M13L+Q14K+K26R	240	3	nd	3	3	nd
D9N+M13L+Q14R	241	3	3	3	3	3
D9A+Q14H+K26R+V36L	242	3	3	3	3	3
Q14R+K23R+K26R	220	3	3	3	3	3
N5S+D9S+M13V+N17R	243	3	3	3	3	3
N5G+D9S+M13L+ N17Q+A31T	244	3	3	3	3	3
M13V+N17T	245	nd	3	3	3	3
D9S+M13L+Q14H	246	3	3	3	3	3
D9S+Q14L	247	3	nd	3	3	3
D9N+Q14H+K38R	248	3	3	3	3	2
M13Y+Q14K+K26R	249	2	3	3	3	3
D11N	40	2	3	2	2	3
N5S+D9S	250	0	3	3	2	3
G24R	169	1	2	nd	2	2
N5G+Q14K	251	2	2	3	0	2
N5K+K26R	74	1	2	3	2	2

Ejemplo 6

5 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se probaron un gran número de péptidos antimicrobianos de la invención contra un panel de 6 cepas diferentes de *Staphylococcus aureus* enumeradas a continuación:

<i>Staphylococcus aureus</i> ,	ATCC29213,	MSSA,	Cepa de referencia de NCCLS;
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	ATCC25923,	MSSA,	Cepa de referencia de NCCLS;
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	ATCC29737,	MSSA;	
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	E33235,	MSSA;	
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	698-01,	MRSA ST5,	Str, Kan, Oxa;
<i>Staphylococcus aureus</i> ,	566-03,	MRSA ST80,	Oxa, Tet, Fus, Kan.

10

S. aureus E33235, *S. aureus* 698-01 y *S. aureus* 566-03 están disponibles de Statens Serum Institut, Dinamarca.

Los estafilococos se expusieron a las siguientes concentraciones de péptido: 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,13; 0,6; y 0,03 µg/ml. Todos los péptidos se purificaron, se cuantificaron por HPLC y los péptidos concentrados (>160 µg/ml) se diluyeron a 160 µg/ml en tampón de dilución de péptido (0,1 % de BSA, 0,01 % de ácido acético).

15

La determinación de CIM se hizo esencialmente como se describe por las directrices de NCCLS / CLSI usando caMHB. Las CIM se leyeron después de 18-24 horas de incubaciones a 37 °C y se registraron junto con las UFC en la siguiente tabla.

20

Se evaluaron un número total de 95 péptidos antimicrobianos por duplicado contra las 6 cepas bacterianas descritas anteriormente.

En la mayoría de las determinaciones dobles (93 %), la CIM varió < 2 veces. Se tabulo una CIM promedio a continuación. Si la CIM fue superior a 32 µg/ml, se usó un valor de 64 para calcular el promedio.

25

Tabla 6. Valores de CIM promedio.

Mutación(es)	SEQ ID NO:	CIM promedio (µg/mL)
N5R+M13Y+N17R	226	1
D9N+M13L+Q14R	241	1
D9S+Q14K+V36L	227	1
D9A+Q14H+K26R+V36L	242	1
D9G+Q14R+K23R	79	2
Q14R+K23R+K26R	220	2
M13G+N17R+G33A	229	2
N5S+D9S+M13V+N17R	243	2
N5S+M13W+N17R	228	2
Q14R+K26R+K38R	87	2
N5S+D9S+M13L+Q14R+N17V+ A31S	230	2
D9S+Q14L+K26R	231	3
N5S+D9A+K26R	232	3
N5G+D9S+M13L+N17Q+A31T	244	3
M13V+N17T	245	3
D9S+M13L+Q14H	246	3
D9S+Q14L	247	3
Q14R+K20R	221	3
N5G+M13L	233	4
D9A+K38R	234	4
D9N+Q14H+K38R	248	4
N17R	95	4
M13R+Q14K+K26R	252	5
M13Y+Q14K+K26R	249	5
D11G+K32R	81	5
Q14F	46	5
N5R+M13V	235	5
Q14R	92	5
N5G+M13Y+N17K	236	5
Q14R+K26R	114	5
M13F+Q14K+K26R	237	6
M13K+K38R	109	6
D11N	40	6
N5S+D9S	250	6
Q14K+K26R	116	6

ES 2 621 568 T3

Mutación(es)	SEQ ID NO:	CIM promedio (µg/mL)
N5A+D9S+M13L+N17T	238	6
N17Y	96	6
N17K+K32R	253	7
M13T+Q14K+K26R	239	7
D9K	14	7
D9S	24	7
M13K+N17R+Y40YR	103	8
N5S+Q14R+N17S+K23R	77	8
N5R	3	8
G24R	169	8
D11G+K26R+Y40YR	110	9
N5S+Q14R+S21A+K23R	76	9
N5G+M13W	254	9
N5G+Q14K	251	9
M13A+Q14K+K26R	255	9
M13L+Q14K+K26R	240	9
N5K+K26R	74	9
A31N	61	9
M13R	43	9
N5K+M13L	256	9
M13K+K26R	108	10
N5G+M13W+N17S	257	10
N17K	258	11
S21N	259	11
D11G+K26R	101	11
K26C+Y40YRCG	260	11
Q14V+K26R	86	12
M13K+Y40YR	107	12
M13K	90	12
N5H+M13E+N17E	261	12
N5K	88	12
N17F	262	12
D11G+M13K+K26R+Y40YR	111	12
Q14L	91	13
Wildtype	1	14
N17I	94	14
N17S	263	14

Mutación(es)	SEQ ID NO:	CIM promedio (µg/mL)
N17S+K23R	223	14
N5G+D9A+Q14S+K23T+A31T	264	14
N17A	265	15
K2 6R	98	15
M13S+Q14K+K26R	266	15
D11G+N17I	267	16
N5S+M13V+N17T	268	16
N5D+D9S+Q14R	269	16
D11G+I22V	83	17
S21A	270	17
N17R+Y25R	271	18
N5S+M13V+N17A	272	18
Q14G	47	18
D9G	13	21
N17T	273	21
Q14S	49	21
N5G	6	24
N5S	7	24
M13S	44	24
S21V	274	26
M13T	144	26
V36L	71	26
N5A	8	29
D9V	25	30

Ejemplo 7

5 Uso de archivos de HMM de la base de datos PFAM para identificar una defensina

Puede llevarse a cabo análisis de secuencias usando perfiles de modelo oculto de Markov (perfiles HMM) tanto en línea en internet como localmente en un ordenador usando el paquete de software libremente disponible muy conocido HMMER. La versión actual es HMMER 2.3.2 de octubre de 2003.

10

Los perfiles de HMM pueden obtenerse de la base de datos PFAM muy conocida. La versión actual es PFAM 16.0 de noviembre de 2004. Tanto HMMER como PFAM están disponibles para todas las plataformas informáticas de, por ejemplo, la Universidad de Washington en San Luis (EE.UU.), Escuela de Medicina (<http://pfam.wustl.edu> y <http://hmmer.wustl.edu>).

15

Si una secuencia de aminoácidos de búsqueda, o un fragmento de la misma, pertenece a una de las cinco siguientes familias de PFAM, la secuencia de aminoácidos es una defensina según la presente invención:

- Defensina_beta o "Defensina beta", número de acceso: PF00711;
- 20 • Defensina_propep o "Propéptido de defensina", número de acceso: PF00879;
- Defensina_1 o "Defensina de mamífero ", número de acceso: PF00323;
- Defensina_2 o "Defensina de artrópodo ", número de acceso: PF01097;

- Gamma-tionina o "Familia de gamma-tioninas", número de acceso: PF00304.

Una secuencia de aminoácidos pertenece a una familia PFAM, según la presente invención, si genera un valor de E que es mayor de 0,1, y una puntuación que es mayor o igual a cero, cuando la base de datos PFAM se usa en línea, o cuando se usa localmente el programa hmmpfam (del paquete de software HMMER).

Cuando el análisis de secuencias se lleva a cabo localmente usando el programa hmmpfam, es necesario obtener (descargar) los perfiles de HMM de la base de datos PFAM. Existen dos perfiles para cada familia; **xxx_ls.hmm** para búsquedas globales y **xxx_fs.hmm** para búsquedas locales ("xxx" es el nombre de la familia). Eso hace un total de diez perfiles para las cinco familias mencionadas anteriormente.

Estos diez perfiles pueden usarse individualmente, o unirse (adjuntarse) en un único perfil (usando un editor de texto - los perfiles son archivos ASCII) que podrían llamarse, por ejemplo, defensin.hmm. Entonces puede evaluarse una secuencia de aminoácidos de búsqueda usando la siguiente línea de comandos:

```
hmmpfam -E 0.1 defensin.hmm sequence_file
```

- en la que "sequence_file" es un archivo con la secuencia de aminoácidos de búsqueda en cualquiera de los formatos reconocidos por el paquete de software HMMER.

Si la puntuación es más larga o igual a cero (0,0) y el valor de E es mayor de 0,1, la secuencia de aminoácidos de búsqueda es una defensina según la presente invención.

La base de datos PFAM se describe además en Bateman et al. (2004) "The Pfam Protein Families Database", Nucleic Acids Research, Vol. 32 (Database Issue) pp. D138-D141.

Listado de secuencias

<110> Novozymes A/S

<120> Polipéptidos antimicrobianos

<130> 10425.209-WO

<160> 274

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 40

<212> PRT

<213> Pseudoplectania nigrella

<400> 1

45

```
Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1           5           10           15
```

```
Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
          20           25           30
```

```
Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
          35           40
```

50 <210> 2

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

- <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Phe, Leu, Trp o Ile
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa = Asn, Arg, Gln, Val, Gly, Ser, Ala, Lys, Tyr, Leu, Asp, His o Met
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Gly, Arg, Ala o Lys
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa = Pro, Lys, Arg, Ala, Leu o Val
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa = Trp o Arg
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(9)
<223> Xaa = Asp, Ala, Gly, Lys, Leu, Thr, Asn, Phe, His, Met, Pro, Gln, Ser, Val, Tyr, Cys, Ile o Arg
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa = Glu, Gly, Ser, Ala, Leu, Cys o Gln
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa = Asp, Ala, Gly, Lys, Leu, Thr, Asn, Phe, His, Met, Pro, Gln, Ser, Val, Tyr, Ile, Cys, Arg, Trp o Met
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12)..(12)
<223> Xaa = Asp o Pro
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Met, Arg, Ser, Val, Lys, Ala, Phe, Gly, Leu, Thr, Trp, Glu o Tyr
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Gln, Arg, Leu, Phe, Gly, His, Leu, Arg, Ser, Tyr, Ala, Cys, Ile, Lys, Met, Pro, Thr, Val o Trp
- 55 <220>
- 60 <221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa = Gln, Arg, Leu, Phe, Gly, His, Leu, Arg, Ser, Tyr, Ala, Cys, Ile, Lys, Met, Pro, Thr, Val o Trp
- 65 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa = Asn, Arg, Ile, Tyr, Val, Lys, Thr, Ser, Gln, Phe, Ala,
 Trp, Glu o His
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (18)..(18)
 <223> Xaa = His, Leu, Ala, Phe, Gln, Thr o Val
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(20)
 <223> Xaa = Lys, Arg o Gln
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa = Ser, Ala, Val, Asn o Phe
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa = Ile, Leu, Val, Met, Thr o Trp
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa = Lys, Thr o Arg
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa = Gly, His, Lys, Asn, Ala, Pro, Phe, Ile, Gln, Arg, Ser,
 35 Thr o Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 40 <223> Xaa = Tyr, Arg, His, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Ser o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (26)..(26)
 45 <223> Xaa = Lys, Arg, Phe, His, Cys o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 50 <223> Xaa = Tyr, Phe, Arg, Trp, Ala, His, Leu, Met o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (31)..(31)
 55 <223> Xaa = Ala, Lys, Asn, Gln, Thr, Tyr, Glu, His, Ile, Arg, Ser,
 Gly o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (32)..(32)
 <223> Xaa = Lys, Arg o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (33)..(33)

<223> Xaa = Gly, Lys, Gln, Arg, Glu, Asn, Ser, Ala o Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (34)..(34)

<223> Xaa = Gly, Lys, Arg, His, o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <222> (35)..(35)

<223> Xaa = Phe, Leu, Ala, His, Ile, Met, Val, Arg o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

15 <222> (36)..(36)

<223> Xaa = Val, Leu, Met, Thr, Ile, Lys, Gln o Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <222> (38)..(38)

<223> Xaa = Lys, His, Asn o Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <222> (40)..(40)

<223> Xaa = Tyr, Ile, Tyr+Arg+Cys+Gly o Tyr+Arg

<400> 2

30

Gly Xaa Gly Cys Xaa Cys His
1 5 10 15

Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa Cys Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Cys Xaa
35 40

<210> 3

35 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 3

Gly Phe Gly Cys Arg Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

45 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 4
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 4

10

Gly Phe Gly Cys Gln Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 5
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 5

25

Gly Phe Gly Cys Val Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 6
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 6

40 Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His

<210> 9
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 9

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Lys Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 10
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Arg Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

25 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

<210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

35

<400> 11

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Arg Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 12
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 12

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ala Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 13
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 13

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Gly Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 14
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 14

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Lys Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 15
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 15

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Leu Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 16
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 16

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Thr Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 17

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 17

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Tyr Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
15 35 40

<210> 18

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 18

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Phe Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 19
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 19

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp His Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15

<210> 20
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 20

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Met Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

<210> 21
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 21

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asn Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

5

<210> 22
 <211> 40
 <212> PRT

10

<213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

15

<400> 22

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Pro Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20

<210> 23
 <211> 40
 <212> PRT

25

<213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

30

<400> 23

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Gln Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 24
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 24

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 25
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 25

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Val Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 26
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 26

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Gly Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 27

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 27

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Ser Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
15 35 40

<210> 28

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 28

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Phe Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 29
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 29

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 30
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 30

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu His Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 31
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 31

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Lys Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 32

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 32

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Leu Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 33

20 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 33

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Pro Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

ES 2 621 568 T3

<210> 34
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 34

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Ser Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

15 <210> 35
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 35

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Thr Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 36
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 36

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Val Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 37

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 37

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Trp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 38

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 38

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Ile Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 39
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 39

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Met Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 40
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 40

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asn Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 41
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 41

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Arg Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 42

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 42

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Tyr Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 43

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 43

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Arg Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 44
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 44

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Ser Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 45
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 45

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

35 <210> 46
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

40

<400> 46

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Phe Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 47
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 47

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gly Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 48
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 48

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met His Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 49
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 49

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Ser Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 50
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 50

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Tyr Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 51
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 51

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn Leu Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 52

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 52

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Leu Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 53

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 53

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Val Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 54
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 54

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His

1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys His Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15

<210> 55
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 55

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Lys Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

<210> 56
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 56

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Asn Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

5 <210> 57
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 57

15
 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Phe Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 58
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 58

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Arg Cys Ala Lys
 20 25 30

30 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

ES 2 621 568 T3

<210> 59
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 59

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Trp Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 60
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 60

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Lys Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 61
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 61

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Asn Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 62

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 62

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Gln Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
15 35 40

<210> 63

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 63

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 64
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 64

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Tyr Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 65
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 65

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Lys Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 25 35 40

25

<210> 66
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 66

35

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gln Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 67

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 67

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 15 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Arg Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20

<210> 68

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 68

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Lys Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 69
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 69

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15

Gly Arg Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

20 <210> 70
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 70

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Leu Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

35 <210> 71
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 71

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Leu Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 72

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 72

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Met Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 73

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 73

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

30 Gly Gly Phe Thr Cys Lys Cys Tyr
35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 74
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 74

10

Gly Phe Gly Cys Lys Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 75
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 75

25

Gly Phe Gly Cys Lys Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 76
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 76

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ala Ile Arg Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 77
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 77

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Ser His Cys Lys Ser Ile Arg Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 78
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 78

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Arg Asp Glu Asp Asp Arg Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 79
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 79

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Gly Glu Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Arg Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 80
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 80

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Gly Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 81
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 81

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 82

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 82

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Ser His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

<210> 83

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 83

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Val Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

<210> 84

ES 2 621 568 T3

<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 84

10 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asn Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15
Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30
Gly Gly Phe Ile Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 85

15 <211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

20 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 85

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Arg Asp Ile Gln Cys His
1 5 10 15
Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30
Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
25 35 40

<210> 86

30 <211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

35

<400> 86

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Val Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 87

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 87

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
15 35 40

<210> 88

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 88

Gly Phe Gly Cys Lys Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

ES 2 621 568 T3

<210> 89
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 89

10

Gly Phe Gly Cys Tyr Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 90
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 90

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 91
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 91

40 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Leu Cys His
1 5 10 15

ES 2 621 568 T3

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

5 <210> 92
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 92

15 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 93
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 93

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

30 His His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

35 <210> 94
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 94

5

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Ile His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

10 <210> 95

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 95

20

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 96

25 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 96

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Tyr His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 97

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 97

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Arg Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 98

20 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 98

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

30 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 99
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 99

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
 35 40

15 <210> 100
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 100

25

Gly Phe Gly Cys Tyr Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Leu Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 101
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 101

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 102

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 102

15 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Lys Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 103

20 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 103

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
 30 35 40

<210> 104
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 104

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
 35 40

15

<210> 105
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 105

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asn Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Phe Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 106
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 106

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

<210> 107

5 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 107

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
15 35 40

<210> 108

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 108

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 109
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 109

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Lys Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
 35 40

15 <210> 110
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 110

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
 35 40

30 <210> 111
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 111

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Lys Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
35 40

<210> 112

5 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 112

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg
35 40

<210> 113

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 113

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Ile Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

ES 2 621 568 T3

<210> 114
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 114

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 115
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 115

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Phe Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 116
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 116.

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 117

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 117

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Arg Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20

<210> 118

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 118

30

Gly Leu Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 119
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 119

10

Gly Trp Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 120
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 120

25

Gly Ile Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 121
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 121

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Leu Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 122
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 122

Gly Phe Gly Cys Met Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 123
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 123

Gly Phe Gly Cys Asn Arg Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 124
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 124

10

Gly Phe Gly Cys Asn Ala Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 125
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 125

25

Gly Phe Gly Cys Asn Lys Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 126
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 126

40 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Ala Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His

ES 2 621 568 T3

<210> 129
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 129

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Cys Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 130
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 130

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ile Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

30 <210> 131
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

35

<400> 131

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Arg Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 132

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 132

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Trp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15

<210> 133

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 133

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Ala Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

ES 2 621 568 T3

<210> 134
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 134

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Leu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 135
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 135

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Cys Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 136
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 136

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Gln Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 137

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 137

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Ala Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 138

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 138

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Cys Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

30 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 139
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 139

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Pro Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

20 <210> 140
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 140

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Ala Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

35 <210> 141
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

40 <400> 141

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Phe Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

5

<210> 142

<211> 40

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

15 <400> 142

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Gly Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20

<210> 143

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 143

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Leu Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 144
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 144

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Thr Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 145
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 145

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Tyr Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 146
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 146

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Ala Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 147

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 147

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Cys Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
15 35 40

<210> 148

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 148

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Ile Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

<210> 149
 <211> 40
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 149

Gly	Phe	Gly	Cys	Asn	Gly	Pro	Trp	Asp	Glu	Asp	Asp	Met	Lys	Cys	His
1				5					10					15	
Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25					30		
Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr								
		35					40								

15
 <210> 150
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 150

25

Gly	Phe	Gly	Cys	Asn	Gly	Pro	Trp	Asp	Glu	Asp	Asp	Met	Met	Cys	His
1				5					10					15	
Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Gly	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25					30		
Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr								
		35					40								

30
 <210> 151
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 151

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Pro Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

5 <210> 152
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 152

15 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Thr Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

20 <210> 153
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 153

30

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Val Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 154

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 154

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Trp Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

<210> 155

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 155

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn Ala Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 156
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 156

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn Phe Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 157
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 157

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn Gln Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 158
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 158

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn Thr Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 159

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 159

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn Val Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 160

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 160

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Gln Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 161
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 161

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Met Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 162
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 162

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Thr Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 163
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 163

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

40

ES 2 621 568 T3

Asn His Cys Lys Ser Trp Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 164
5 <211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 164

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Ala Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 165
20 <211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 165

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

30 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Pro Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

35 <210> 166
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 621 568 T3

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 166

5

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Phe Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

10 <210> 167

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 167

20

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Ile Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 168

25 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 168

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gln Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 169
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 169

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Arg Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 170
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 170

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Ser Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 171
 <211> 40
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 171

Gly	Phe	Gly	Cys	Asn	Gly	Pro	Trp	Asp	Glu	Asp	Asp	Met	Gln	Cys	His
1				5					10					15	
Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Thr	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25					30		
Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr								
		35					40								

15 <210> 172
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 172

25

Gly	Phe	Gly	Cys	Asn	Gly	Pro	Trp	Asp	Glu	Asp	Asp	Met	Gln	Cys	His
1				5					10					15	
Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys
			20					25					30		
Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr								
		35					40								

<210> 173
 30 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 173

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly His Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 174

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 174

15 Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Lys Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 175

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 175

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Leu Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 176
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 176

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Met Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 177
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial.

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 177

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Asn Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 178
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 178

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Gln Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

<210> 179

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 179

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Ser Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
15 35 40

<210> 180

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25

<400> 180

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Val Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 181
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 181

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Phe Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 182
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 182

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr His Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 183
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 183

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Thr Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 184
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 184

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Ala Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 185
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 185

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly His Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 186
 <211> 40
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 186

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15
 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Leu Cys Ala Lys
 20 25 30
 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15
 <210> 187
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 187

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15
 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Met Cys Ala Lys
 20 25 30
 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

35
 <210> 188
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 188

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Ser Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 189

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 189

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Glu Lys
 20 25 30

20 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 190

<211> 40

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 190

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys His Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 191
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 191

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ile Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 192
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 192

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Arg Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 193
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 193

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 194

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 194

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Val Lys
 20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 195

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 195

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 196
 <211> 40
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 196

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Thr
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 197
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 197

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Glu Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 198
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 198

40

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His

<210> 201
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 201

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly His Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 202
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 202

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Trp Phe Val Cys Lys Cys Tyr

30 <210> 203
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 203

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Ala Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 204

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 204

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

15 Gly Gly His Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 205

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 205

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

30 Gly Gly Ile Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 206
 <211> 40
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10 <400> 206

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Met Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 207
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 207

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Val Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 208
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 208

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Trp Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 209

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 209

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Ile Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 210

<211> 40

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25 <400> 210

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Lys Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 211
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 211

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Gln Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 212
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 212

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Arg Cys Lys Cys Tyr
 35 40

35 <210> 213
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 213

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys His Cys Tyr
 35 40

5

<210> 214

<211> 40

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

15

<400> 214

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Asn Cys Tyr
 35 40

20

<210> 215

<211> 40

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

30 <400> 215

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 216
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 216

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Ile
 35 40

15 <210> 217
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 217

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Leu Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Asn Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 218
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 218

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Leu Asp Ile Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 219

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 219

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Arg Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Phe Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15

<210> 220

<211> 40

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25 <400> 220

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Arg Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30

<210> 221
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 221

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Arg Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 222
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 222

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Ser Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
 35 40

30 <210> 223
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 223

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Ser His Cys Lys Ser Ile Arg Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 224

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 224

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15 Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Phe Cys Ala Arg
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 225

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 225

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

Gly Lys Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 226
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 226

10

Gly Phe Gly Cys Arg Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Tyr Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 227
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 227

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Leu Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 228
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 228

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Trp Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 229

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 229

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Gly Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Ala Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 230

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 230

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Leu Arg Cys His
 1 5 10 15

Val His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ser Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 231
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 231

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Leu Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 232
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 232

25

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Ala Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 233
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 233

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Leu Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 234.

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 234

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ala Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
 35 40

<210> 235

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 235

30 Gly Phe Gly Cys Arg Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 236
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 236

10

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Tyr Gln Cys His
 1 5 10 15

Lys His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 237
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 237

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Phe Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 238
 35 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 238

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Ala Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Leu Gln Cys His
 1 5 10 15

Thr His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 239
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 239

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Thr Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 240
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 240

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Leu Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 241
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 241

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asn Glu Asp Asp Leu Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 242
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 242

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ala Glu Asp Asp Met His Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Leu Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 243
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 243

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 244

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 244

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Leu Gln Cys His
 1 5 10 15

Gln His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 245

<211> 40

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 245

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Thr His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 246
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 246

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Leu His Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15

<210> 247
 <211> 40
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

25 <400> 247

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Leu Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 248
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 248

40

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asn Glu Asp Asp Met His Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Arg Cys Tyr
 35 40

5

<210> 249
 <211> 40
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

15 <400> 249

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Tyr Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20

<210> 250
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 250

30

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr

ES 2 621 568 T3

<210> 251
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 251

10

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 252
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 252

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Arg Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 253
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 253

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Lys His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 254
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 254

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Trp Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

15 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 255
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 255

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Ala Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

30 Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 256
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 256

10

Gly Phe Gly Cys Lys Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Leu Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15 <210> 257
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 257

25

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Trp Gln Cys His
1 5 10 15

Ser His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

30 <210> 258
<211> 40
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 258

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Lys His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 259

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 259

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

15

Asn His Cys Lys Asn Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

20 <210> 260

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 260

30

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Cys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr Arg Cys Gly
 35 40

<210> 261

<211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 261

10 Gly Phe Gly Cys His Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Glu Gln Cys His
 1 5 10 15

Glu His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 262
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 262

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Phe His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 263
 <211> 40
 <212> PRT
 35 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético .
 40 <400> 263

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Ser His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 264
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 264

Gly Phe Gly Cys Gly Gly Pro Trp Ala Glu Asp Asp Met Ser Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Thr Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Thr Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 265
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 265

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Ala His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 621 568 T3

<210> 266
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 266

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Sér Lys Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Arg Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 267
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 267

25

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Gly Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Ile His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30 <210> 268
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

35 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 268

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Thr His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

<210> 269
 5 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 <400> 269

Gly Phe Gly Cys Asp Gly Pro Trp Ser Glu Asp Asp Met Arg Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 15 35 40

<210> 270
 <211> 40
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético
 25 <400> 270

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Asn His Cys Lys Ala Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

<210> 271
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 271

10

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
 1 5 10 15

Arg His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Arg Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

15 <210> 272
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

<400> 272

25

Gly Phe Gly Cys Ser Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Val Gln Cys His
 1 5 10 15

Ala His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
 20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 35 40

30

<210> 273
 <211> 40
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Polipéptido antimicrobiano sintético

40

<400> 273

ES 2 621 568 T3

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Thr His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

<210> 274

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Polipéptido antimicrobiano sintético

10

<400> 274

Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys His
1 5 10 15

Asn His Cys Lys Val Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys
20 25 30

Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
35 40

15

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

5 G-F-G-C-X₅-G-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-D-X₁₃-X₁₄-C-H-X₁₇-X₁₈-C-X₂₀-S-X₂₂-X₂₃-X₂₄-X₂₅-X₂₆-G-G-X₂₉-C-X₃₁-
K-X₃₃-X₃₄-X₃₅-X₃₆-C-K-C-X₄₀;

en la que

10 X₅ = N, R, Q, V, G, S, A, K o Y;

X₇ = P, K o R;

X₈ = W o R;

X₉ = D, A, G, K, L, T, N, F, H, M, P, Q, S, V o Y;

X₁₀ = E, G o S;

15 X₁₁ = D, F, G, N, V, Y, H, K, L, P, S, T, W, I, M o R;

X₁₃ = M, R, S, V, G, Y, L, F, T, W o K;

X₁₄ = Q, R, L, F, G, H, S, K o Y;

X₁₇ = N, R, I, Y, V, K, T, S, Q o H;

X₁₈ = H o L;

20 X₂₀ = K o R;

X₂₂ = I, L o V;

X₂₃ = K o R;

X₂₄ = G, H, R, K o N;

X₂₅ = Y o R;

25 X₂₆ = K o R;

X₂₉ = Y, F, R o W;

X₃₁ = A, K, N, Q, T, S o Y;

X₃₃ = G, K, Q, A o R;

X₃₄ = G, K o R;

30 X₃₅ = F o L;

X₃₆ = V, L, M o T;

X₄₀ = Y o YR;

en la que el polipéptido tiene 1, 2, 3 o 4 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y tiene una actividad antimicrobiana más alta en comparación con el polipéptido de

35 SEQ ID NO:1.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, que tiene 1, 2 o 3 diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

40 3. Un polipéptido que tiene actividad antimicrobiana, que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251.

45

5. El polipéptido de la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251 o una cualquiera de SEQ ID NO:252 a SEQ ID NO:262.

50 6. El polipéptido de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:117 o una cualquiera de SEQ ID NO:226 a SEQ ID NO:251.

7. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

55

8. Una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7 unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedador de expresión.

9. Un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 8.

60

10. Una célula hospedadora recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 8.

11. Un método de producción del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende (a) cultivar la célula hospedadora recombinante de la reivindicación 10 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

65

12. Un método *in vitro* para matar o inhibir el crecimiento de células microbianas que comprende poner en contacto las células microbianas con un polipéptido antimicrobiano como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

5 13. Un polipéptido antimicrobiano como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso como medicamento, o un agente terapéutico o profiláctico veterinario o humano antimicrobiano.

14. Uso de un polipéptido antimicrobiano como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la preparación de un agente terapéutico veterinario o humano para el tratamiento de una infección microbiana o para uso
10 profiláctico.

15. Uso de al menos un polipéptido antimicrobiano como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en pienso para animales.