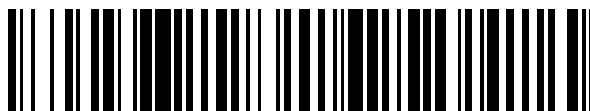


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 294**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 38/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015** **PCT/US2015/037962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015** **WO15200783**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015** **E 15812120 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3164146**

54 Título: **Lisinas de Acinetobacter**

30 Prioridad:

26.06.2014 US 201462017618 P

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

17.06.2020

73 Titular/es:

THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 York Avenue
New York, NY 10065, US

72 Inventor/es:

FISCHETTI, VINCENT;
SCHUCH, RAYMOND;
LOOD, ROLF y
WINER, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 767 294 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

Lisinas de *Acinetobacter*

5 Campo

Composiciones que comprenden una enzima lítica bacteriófaga específica para *Acinetobacter* y un método para tratar infecciones por *Acinetobacter*.

10 Antecedentes

El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* y otros miembros de esta especie frecuentemente colonizan la piel humana sin dañarla. Sin embargo, las lesiones en la piel causadas por raspaduras, heridas o cirugías, pueden dar como resultado una infección por *Acinetobacter* en la herida, sangre, tejidos blandos y sistema nervioso central. Dado que > 80 % de las especies de *Acinetobacter* también son resistentes a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés) (al menos a tres clases de antibióticos), estas infecciones pueden dar lugar a resultados clínicos adversos, que incluyen altas tasas de morbilidad y mortalidad, hospitalización prolongada y gastos sustanciales de atención médica. El personal militar y los atletas tienen un mayor riesgo de lesiones (desde abrasiones de la piel hasta heridas graves) que serían susceptibles a la infección por especies de *Acinetobacter*, por lo tanto, los métodos para eliminarlos rápida y eficazmente reducirían o eliminarían las complicaciones posteriores. Se han informado brotes causados por *Acinetobacter* MDR en hospitales de todo el mundo; más recientemente, se han convertido en un problema grave en las instalaciones médicas militares. Debido a su MDR, las infecciones por *Acinetobacter* son difíciles de tratar, por lo que las infecciones por estos organismos generalmente dan como resultado un mal desenlace. Por lo tanto, se necesitan nuevas y mejores formas de controlar este patógeno.

Se han informado cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a todos los antibióticos conocidos. Actuando en sinergia con este perfil de resistencia emergente es la asombrosa capacidad de *A. baumannii* para sobrevivir durante períodos prolongados en todo el entorno hospitalario, lo que potencia su capacidad de propagación nosocomial. El organismo comúnmente se dirige a sujetos hospitalizados, que están gravemente enfermos con roturas en la integridad de la piel y en la protección de las vías respiratorias. Como tales, la neumonía adquirida en el hospital sigue siendo la infección más común causada por *A. baumannii*. Sin embargo, recientemente, las infecciones implican el sistema nervioso central, la piel y los tejidos blandos, y los huesos han surgido como altamente problemáticos para determinadas instituciones. Debido a este problema de resistencia, se deben desarrollar nuevos métodos para controlar estos patógenos.

Se han identificado agentes antimicrobianos conocidos como lisinas codificadas por bacteriófagos. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y se estima que hay 10⁶ especies distintas de bacteriófagos. Las lisinas de bacteriófagos son generalmente específicas de género o especie, es decir, una lisina del fago de *Staphylococcus aureus* puede tener actividad solo contra *Staphylococcus aureus* proporcionando un enfoque terapéutico dirigido. En algunos casos, las lisinas pueden tener actividad contra varios géneros o especies.

Los bacteriófagos infectan a sus bacterias hospedadoras para producir más partículas víricas. Al final del ciclo reproductivo se enfrentan a un problema, cómo liberar el fago de la progenie atrapado dentro de la bacteria. Resuelven este problema produciendo una enzima llamada "lisina" que degrada la pared celular de las bacterias infectadas para liberar el fago de la progenie. El sistema lítico consiste en una holina y al menos un peptidoglucano hidrolasa, o lisina, capaz de degradar la pared celular bacteriana. Por lo general, la holina se expresa en las últimas etapas de la infección del fago formando un poro en la membrana celular, permitiendo que la(s) lisina(s) acceda(n) al peptidoglucano de la pared celular, dando como resultado la liberación del fago de la progenie. De forma significativa, la lisina añadida exógenamente, en ausencia de una holina, puede lisar la pared celular de las células sanas y no infectadas, produciendo un fenómeno conocido como "lisis desde afuera".

Lood et al., (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015 vol. 59, n.º 4, 1983-1991) describieron una nueva lisina de fagos capaz de destruir a la bacteria gramnegativa resistente a múltiples fármacos *Acinetobacter baumannii* en un modelo de bacteriemia en ratones.

55 Sumario

Recientemente se han identificado, purificado y caracterizado varias lisinas de fagos que atacan específicamente a la bacteria *Acinetobacter*. Este es un gran avance ya que la mayoría de las lisinas tienen actividad antibacteriana solo contra las bacterias grampositivas. Las lisinas de fagos purificadas de la presente invención son muy adecuadas para una variedad de aplicaciones tales como el tratamiento de infecciones bacterianas y desinfección.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana. La presente invención también proporciona un polipéptido conjugado que comprende: un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del polipéptido; y un péptido antimicrobiano conjugado con el polipéptido o el fragmento del

polipéptido, en el que el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende uno o más polipéptidos de acuerdo con las reivindicaciones. La presente invención proporciona una composición de acuerdo con las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una infección bacteriana. La presente invención también proporciona una composición según las reivindicaciones que comprende un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una herida quirúrgica irrigando la herida quirúrgica con la composición.

La presente invención proporciona además una composición de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en la inhibición de la formación de o en la alteración de una biopelícula bacteriana en una cantidad eficaz para destruir bacterias en la biopelícula.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A. Micrografía electrónica de tinción negativa que muestra el fago inducido por la cepa 1790 de *A. baumannii*.

Figura 1B. Micrografía electrónica de tinción negativa que muestra el fago inducido por la cepa 1794 de *A. baumannii*.

Figura 1C. Micrografía electrónica de tinción negativa que muestra el fago inducido por la cepa 1796 de *A. baumannii*.

Figura 2. Una imagen representativa de la actividad del clon de lisina en el aclaramiento de *A. baumannii* vivo embebido en el agar.

Figura 3. Esquema de secuencias de aminoácidos de lisinas clonadas que muestran cuatro clases de actividad lítica: i) familia de glucosil hidrolasa, ii) lisozimas de la placa de base de fagos, iii) lisozima autolisinas y iv) lisinas.

Figura 4. Alineación de secuencias de nucleótidos para lisinas clonadas.

Figura 5. Alineación de secuencias de aminoácidos para lisinas clonadas.

Figura 6. Es un gráfico que muestra la actividad lítica de 21 construcciones clonadas contra trece aislados clínicos de *A. baumannii* diferentes.

Figura 7A y 7B. Se observan ampollas en la membrana citoplasmática que contienen contenidos citosólicos de células de *A. baumannii* después del tratamiento con F307 (flechas).

Figura 8. Micrografía electrónica de barrido de biopelículas de 3 días de la cepa 1791 de *A. baumannii* antes y después del tratamiento con el polipéptido F307.

Figura 9. Es un gráfico que muestra la reducción en el recuento bacteriano en piezas de catéter completas con biopelícula *Acinetobacter* después del tratamiento con el polipéptido F307.

Figura 10. Es un gráfico que muestra la supervivencia de ratones infectados con *A. baumannii* tratados con el polipéptido F307 frente al control.

Figura 11. Secuencia de F307, polipéptido P307 sin y con extensión corta (P307Ex).

Figura 12. La Figura 12A es un gráfico que compara las actividades bactericidas *in vitro* de P307, P307SQ-8C y P307_{AE_8} contra las cepas número 1791, S5 y ATCC17978 de *A. baumannii*. La Figura 12B muestra la actividad bactericida comparativa *in vivo* de P307, P307SQ-8C y P307CS-8 contra las cepas número 1791 y S5 de *A. baumannii*. La Figura 12C muestra una comparación de la actividad bactericida comparativa *in vivo* de P307SQ-8C y P307CS-8 contra las cepas número 1791, S5 y ATCC17978 de *A. baumannii*.

Figura 13. Las actividades bactericidas *in vitro* de P307 y P307SQ-8C contra la cepa número 1791 de *A. baumannii* para investigar el pH óptimo (13A) y NaCl óptimo (13B). Se usaron las mismas condiciones, excepto las variables, con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 para determinar la concentración óptima (13C) y la cinética de destrucción (13D). Las barras de error muestran la desviación estándar y la línea horizontal negra marca el límite de detección.

Figura 14. Es un gráfico que muestra la sensibilidad de diferentes especies bacterianas a P307 y P307SQ-8C. Las barras de error muestran la desviación estándar y la línea horizontal negra marca el límite de detección.

Figura 15. Las Figuras 15A y 15B son gráficos que muestran las actividades bactericidas de P307 y P307SQ-8C contra la fase logarítmica y la fase estacionaria de la cepa número 1791 de *A. baumannii* (15A) y la fase de biopelícula (15B).

Figura 16. La Figura 16 muestra los efectos citotóxicos de P307 y P307SQ-8C medidos por la supervivencia de los linfocitos B (16A) y la hemólisis (16B).

Figura 17. La Figura 17A muestra el efecto de DTT a 0, 0,1 y 1 mM sobre la actividad de P307 y P307SQ-8C. La Figura 17B muestra el efecto de la sustitución del resto de cisteína terminal de P307SQ-8C con alanina (P307SQ-8A).

Figura 18. Es un gel de desplazamiento de ADN que muestra el desplazamiento para el péptido control y P307.

Figura 19. Las Figuras 7A-C muestran imágenes representativas de microscopía electrónica de transmisión de la cepa número 1791 de *A. baumannii*: control no tratada (19A), tratada con 300 µg / ml de P307SQ-8C durante 5 minutos (19B) y durante 2 horas (19C). Aumento, X2600 (izquierda, barra de escala = 2 µm) y X5000 (derecha arriba y abajo, barra de escala = 0,5 µm). La Figura 7D muestra la actividad bactericida de P307SQ-8C sobre bacterias gramnegativas *K. pneumoniae* y *E. coli* a pH 7,5 y 8,8.

Figura 20. Muestra la permeabilidad de la membrana de las cepas número 1791 y S5 de *A. baumannii* tratadas con P307 y P307SQ-8C.

Figura 21. Muestra la inhibición de la actividad bactericida de P307 o P307SQ-8C por el eliminador de radicales hidroxilo, La tiourea y la condición anaeróbica.

Figura 22. Muestra el efecto del tratamiento de una infección de la piel con polimixina B y P307SQ-8C.

Descripción detallada

La presente invención proporciona polipéptidos que tienen actividad antibacteriana y para métodos para usar los polipéptidos divulgados. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un/a", "uno/a" y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

Los términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", "contiene", "que contiene" y similares tienen el significado atribuido en la ley de Patentes de los Estados Unidos; son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas del método adicionales no enumerados. Las expresiones tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado atribuido en la ley de Patentes de los Estados Unidos; permiten la inclusión de ingredientes o etapas adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Las expresiones "consiste en" y "que consiste en" tienen el significado asignado en la ley de Patentes de los Estados Unidos; concretamente, que estos términos son cerrados

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden comprender una secuencia de aminoácidos que tiene un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

En el presente documento se describen polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 % de identidad, con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento está conjugado con un péptido antimicrobiano para producir un polipéptido conjugado y el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.

El polipéptido descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, o al menos un 92 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 % o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento está conjugado con un péptido antimicrobiano para producir un polipéptido conjugado y el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.

En el presente documento se describen polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, o un 100 % de identidad, con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento está conjugado con un péptido antimicrobiano para producir un polipéptido conjugado y el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.

El polipéptido descrito en el presente documento puede consistir en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, o al menos un 92 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 % o un 100 %, de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:21, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento está conjugado con un péptido antimicrobiano para producir un polipéptido conjugado y el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.

En algunas realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos SQSRESQC (SEQ ID NO: 44) en la que al menos un amino es cisteína y 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido antimicrobiano están sustituidos de forma conservativa. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido antimicrobiano están sustituidos de forma conservativa. En otras realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos SQSRESQC (SEQ ID NO: 44). En aún otras realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos SQSRESQC (SEQ ID NO: 44) en la que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido antimicrobiano están sustituidos de forma conservativa y el péptido antimicrobiano consiste en 8 aminoácidos. En otras realizaciones más, el péptido antimicrobiano consiste en la secuencia de aminoácidos SQSRESQC (SEQ ID NO:44).

En algunas realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos CSQRQSES (SEQ ID NO:50) en la que al menos un amino es cisteína y 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido antimicrobiano están sustituidos de forma conservativa. En otras realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos CSQRQSES (SEQ ID NO:50). En aún otras realizaciones, el péptido antimicrobiano comprende la secuencia de aminoácidos CSQRQSES (SEQ ID NO:50) en la que 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del péptido antimicrobiano están sustituidos de forma conservativa y el péptido antimicrobiano consiste en 8 aminoácidos. En otras realizaciones más, el péptido antimicrobiano consiste en la secuencia de aminoácidos CSQRQSES (SEQ ID NO:50).

En algunas realizaciones, el extremo C del polipéptido o del fragmento está conjugado con el péptido antimicrobiano. En otras realizaciones, el extremo C del polipéptido o del fragmento está conjugado con el extremo N del péptido antimicrobiano. En aún otras realizaciones, el extremo N del polipéptido o fragmento está conjugado con el péptido antimicrobiano. En otras realizaciones más, el extremo N del polipéptido o fragmento está conjugado con el extremo C del péptido antimicrobiano. Para cualquiera de las realizaciones, el péptido antimicrobiano puede conjugarse con el polipéptido o fragmento a través de un enlace peptídico.

Otra realización de los péptidos de la presente divulgación es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRKSQSRESQA (SEQ ID NO: 45). Otra realización es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRKCSQRQSES (SEQ ID NO:51).

En algunas realizaciones los polipéptidos, fragmentos de polipéptidos o polipéptidos conjugados tienen actividad antibacteriana contra una bacteria gramnegativa. En algunas realizaciones, La bacteria gramnegativa es del género *Acinetobacter*.

En algunas realizaciones los polipéptidos, fragmentos de polipéptidos o polipéptidos conjugados tienen actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* o *A. baumannii*.

En algunas realizaciones los polipéptidos, fragmentos de polipéptidos o polipéptidos conjugados tienen actividad

antibacteriana contra una bacteria grampositiva. En algunas realizaciones, la bacteria grampositiva es *S. aureus* o *B. anthracis*.

En algunas realizaciones, El polipéptido se liofiliza.

EN la Tabla 1 de proporcionan polipéptidos específicos.

Tabla 1

SEQ ID NO:1	F307
SEQ ID NO:2	F376
SEQ ID NO:3	F351
SEQ ID NO:4	F347
SEQ ID NO:5	F344
SEQ ID NO:6	F340
SEQ ID NO:7	F338
SEQ ID NO:8	F336
SEQ ID NO:9	F334
SEQ ID NO:10	F332
SEQ ID NO:11	F330
SEQ ID NO:12	F328
SEQ ID NO:13	F324
SEQ ID NO:14	F321
SEQ ID NO:15	F320
SEQ ID NO:16	F315
SEQ ID NO:17	F306
SEQ ID NO:18	F303
SEQ ID NO:19	F301
SEQ ID NO:20	F309
SEQ ID NO:21	F311
SEQ ID NO:43	P307
SEQ ID NO:44	SQSRESQC
SEQ ID NO:45	P307SQ-8C (P307Ex)
SEQ ID NO:48	AEMLFLK
SEQ ID NO:49	P307AE-8
SEQ ID NO:50	CSQRQSES
SEQ ID NO:51	P307CS-8
SEQ ID NO:52	SQSRESQA
SEQ ID NO:53	P307SQ-8A

P307SQ-8C y P307Ex se usan indistintamente en el presente documento.

La invención también proporciona composiciones que comprenden los polipéptidos, fragmentos de polipéptidos o polipéptidos conjugados de la invención. En algunas realizaciones, las composiciones son composiciones farmacéuticas, que comprenden un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para administración tópica. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se formula para suministro subcutáneo. En aún otras realizaciones, la composición farmacéutica se formula para suministro intravenoso. En otras realizaciones más, la composición farmacéutica se formula para suministro oral.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un antibiótico. Ejemplos de antibióticos adecuados incluyen, pero sin limitación, amoxicilina, augmentine, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina, penicilina G, penicilina V, cefalexina, cefazedona, cefuroxima, loracarbef, cemetazol, cefotetán, cefoxitina, ciprofloxacino, levaquin y floxacino, tetraciclina, doxiciclina o minociclina, gentamicina, amikacina y tobramicina, claritromicina, azitromicina, eritromicina, daptomicina, neomicina, Kanamicina o estreptomicina.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende además un agente de coagulación.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se liofiliza.

En el presente documento se describen métodos para tratar a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento se describe un método para tratar a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable.

5 En el presente documento se describe un método para tratar a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un fragmento de polipéptido de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable.

10 El método puede ser un método para tratar a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido conjugado de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable.

15 El método puede ser un método para tratar una infección bacteriana y el tratamiento es un tratamiento terapéutico que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido conjugado de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede tener una infección bacteriana que no responde a otras modalidades de tratamiento. Por ejemplo, la infección bacteriana puede ser resistente a uno o más antibióticos. La infección bacteriana puede ser una infección de una herida.

20 El método puede ser un método para tratar profilácticamente a un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende un polipéptido conjugado de la invención, y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el sujeto se ha sometido o se está sometiendo a cirugía y la herida quirúrgica se pone en contacto con una composición farmacéutica de la invención. En determinadas realizaciones, la herida quirúrgica se irriga con la composición farmacéutica antes del cierre de la herida. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se aplica a la herida después del cierre, por
25 ejemplo, la composición farmacéutica se aplica al área suturada o grapada de la herida.

Un método puede comprender administrar una composición farmacéutica de la invención que se administra en combinación con un antibiótico. El método puede comprender administrar por vía tópica una composición farmacéutica de la invención. El método puede comprender administrar una composición farmacéutica de la invención por vía
30 subcutánea. El método puede comprender administrar una composición farmacéutica de la invención por inyección intravenosa. El método puede comprender administrar una composición farmacéutica de la invención por vía oral.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica está en una forma de dosificación unitaria. En otras realizaciones, la composición farmacéutica está en forma de una crema, pomada, bálsamo, gel, pastilla para chupar,
35 pulverizador o aerosol.

En el presente documento se describen métodos para tratar una infección bacteriana que comprende inhibir la formación de o alterar una biopelícula bacteriana que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una
40 composición que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención en una cantidad eficaz para destruir bacterias en la biopelícula.

Se proporcionan, adicionalmente, métodos de desinfección de un artículo que comprende poner en contacto el artículo con una composición que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención con el artículo durante un tiempo suficiente para desinfectar el artículo. El artículo puede ser una superficie dura. En
45 algunas realizaciones, el artículo es una encimera, teclado, instrumento quirúrgico o dispositivo médico.

Se proporcionan, adicionalmente, métodos para inhibir la formación de o alterar una biopelícula bacteriana en un artículo que comprende poner en contacto el artículo con un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido
50 conjugado de la invención, en una cantidad eficaz para destruir las bacterias en la biopelícula.

En el presente documento se describen artículos de fabricación que contienen una composición que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención. El artículo de fabricación puede ser una
botella de aerosol que contiene un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención.

55 El artículo de fabricación puede contener una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, fragmento de polipéptido o polipéptido conjugado de la invención y un transportador, agente tamponante o conservante. El artículo de fabricación puede ser un vial. El artículo de fabricación puede ser un dispositivo de suministro. La composición contenida en el artículo de fabricación puede estar liofilizada.

60 Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de los polipéptidos de la divulgación y aún obtener una molécula que tenga características similares al polipéptido (p. ej., una sustitución de aminoácidos conservativa). Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en una secuencia sin pérdida apreciable de actividad. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de un polipéptido lo que define la actividad funcional biológica de ese polipéptido, se pueden realizar determinadas sustituciones de la secuencia de
65 aminoácidos en una secuencia de polipéptidos y, sin embargo, obtener un polipéptido con propiedades similares.

Tales sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Sustituciones ejemplares que toman en consideración varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen (resto original: sustitución ejemplar): (Ala: Gly, Ser), (Arg: Lys), (Asn: Gin, His), (Asp: Glu, Cys, Ser), (Gin: Asn), (Glu: Asp), (Gly: Ala), (His: Asn, Gin), (Ile: Leu, Val), (Leu: Ile, Val), (Lys: Arg), (Met: Leu, Tyr), (Ser: Thr), (Thr: Ser), (Tyr: Trp, Phe) y (Val: Ile, Leu). Las realizaciones de esta divulgación contemplan así equivalentes funcionales o biológicos de un polipéptido como se establece anteriormente. En particular, los polipéptidos pueden incluir variantes que tienen aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de interés.

"Identidad" como se conoce en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas, determinada por comparación de las secuencias. La "identidad" se puede calcular fácilmente mediante algoritmos conocidos bien conocidos en la técnica. Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando un software de análisis (es decir, Sequence Analysis Software Package del Genetics Computer Group, Madison Wis.) que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol., 48: 443-453, 1970) (p. ej., NBLAST y XBLAST).

La identidad se puede medir como "identidad local" o "identidad global". La identidad local se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de tales secuencias. La identidad global se refiere al grado de relación de secuencia de un polipéptido en comparación con la longitud completa de un polipéptido de referencia. A menos que se especifique otra cosa, como se usa en el presente documento, identidad significa identidad global. Los porcentajes de identidad global en el presente documento, se calculan utilizando el algoritmo ClustalW utilizado a través del software Mac Vector, utilizando la configuración predeterminada; tanto para la identidad local como global.

Producción de polipéptidos

Los polipéptidos de la presente invención se pueden producir por cualquier método conocido. Por ejemplo, los polipéptidos se pueden producir en bacterias que incluyen, sin limitación, *E. coli*, o en otro sistema existente para polipéptidos (p. ej., *Bacillus subtilis*, sistemas de expresión de baculovirus que usan células Sf9 de *Drosophila*, sistemas de expresión de hongos filamentosos o levaduras, sistemas de expresión de células de mamífero), o pueden sintetizarse químicamente.

Si el polipéptido se va a producir en bacterias, p. ej., *E. coli*, la molécula de ácido nucleico que codifica el péptido también puede codificar una secuencia líder que permite la secreción del péptido maduro de la célula. Por lo tanto, la secuencia que codifica el péptido puede incluir la secuencia pre y la secuencia pro de, por ejemplo, un péptido ST bacteriano de origen natural. El péptido secretado, maduro puede purificarse a partir del medio de cultivo.

La secuencia que codifica un péptido descrito en el presente documento se puede insertar en un vector capaz de suministrar y mantener la molécula de ácido nucleico en una célula bacteriana. La molécula de ADN puede insertarse en un vector de replicación autónoma (los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, pGEM3Z y pcDNA3, y derivados de los mismos). El vector puede ser un vector de ADN bacteriano o bacteriófago tal como bacteriófago lambda o M13 y derivados de los mismos. La construcción de un vector que contiene un ácido nucleico descrito en el presente documento puede ir seguida por la transformación de una célula hospedadora tal como una bacteria. Los hospedadores bacterianos adecuados incluyen, pero sin limitación, *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Salmonella*. La construcción genética también incluye, además de la molécula de ácido nucleico codificante, elementos que permiten la expresión, tal como un promotor y secuencias reguladoras. Los vectores de expresión pueden contener secuencias de control transcripcional que controlan la iniciación transcripcional, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Los expertos en la materia conocen una variedad de secuencias de control transcripcional. El vector de expresión también puede incluir una secuencia reguladora de la traducción (p. ej., una secuencia 5' no traducida, una secuencia 3' no traducida o un sitio interno de entrada al ribosoma). El vector puede ser capaz de replicarse de forma autónoma o puede integrarse en el ADN del hospedador para garantizar la estabilidad durante la producción de péptidos.

En el presente documento se describen los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El ácido nucleico puede codificar un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El ácido nucleico puede codificar un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de la 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, o SEQ ID NO:42.

El ácido nucleico puede consistir en la secuencia de nucleótidos de la 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 o SEQ ID NO: 42.

En el presente documento se describe un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2, 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 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, o SEQ ID NO:45, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.

El vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la 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 o SEQ ID NO: 42.

El vector de expresión puede comprender un ácido nucleico que consiste en la secuencia de nucleótidos de la 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 o SEQ ID NO: 42.

La Tabla 2 la SEQ ID NO: de nucleótidos y los polipéptidos que codifican.

Tabla 2

Nucleótidos SEQ ID NO:	Aminoácidos correspondientes SEQ ID NO:	Nucleótidos SEQ ID NO:	Aminoácidos correspondientes SEQ ID NO:
22	1	33	12

(continuación)

Nucleótidos SEQ ID NO:	Aminoácidos correspondientes SEQ ID NO:	Nucleótidos SEQ ID NO:	Aminoácidos correspondientes SEQ ID NO:
23	2	34	13
24	3	35	14
25	4	36	15
26	5	37	16
27	6	38	17
28	7	39	18
29	8	40	19
30	9	41	20
31	10	42	21
32	11		

El ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en el presente documento también puede fusionarse con un ácido nucleico que codifica una etiqueta de afinidad peptídica, p. ej., glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, proteína A, etiqueta FLAG, hexa-histidina, etiqueta myc o la etiqueta de gripe HA, para facilitar la purificación. La etiqueta de afinidad o fusión indicadora se une al marco de lectura del péptido de interés para el marco de lectura del gen que codifica la etiqueta de afinidad de manera que se genera una fusión traduccional. La expresión del gen de fusión da como resultado la traducción de un péptido único que incluye tanto el péptido de interés como la etiqueta de afinidad. En algunos casos donde se utilizan etiquetas de afinidad, la secuencia de ADN que codifica un sitio de reconocimiento de proteasas se fusionará entre los marcos de lectura para la etiqueta de afinidad y el péptido de interés.

También pueden usarse las construcciones genéticas y los métodos adecuados para la producción de formas inmaduras y maduras de los polipéptidos y variantes descritos en el presente documento en sistemas de expresión de proteínas que no sean bacterias, y bien conocidos por los expertos en la materia, para producir polipéptidos en un sistema biológico.

Los polipéptidos y sus variantes pueden sintetizarse por el método de fase sólida usando un sintetizador de péptidos automatizado. Por ejemplo, el péptido se puede sintetizar en resina Cyc(4-CH₂ Bxl)-OCH₂-4-(oximetil)-fenilacetamidometilo usando un programa de doble acoplamiento. Los péptidos también se pueden sintetizar mediante muchos otros métodos, incluida la síntesis en fase sólida utilizando la protección tradicional Fmoc (es decir, el acoplamiento con DCC-HOBt y la desprotección con piperdina en DMF).

Composiciones Terapéuticas y Profilácticas y Su Uso

En el presente documento se describen métodos de tratamiento que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido de la invención. El sujeto es un ser humano u otro animal, incluidos, sin limitación, primates tales como monos y chimpancés; animales de ganado tal como vacas, cerdos, caballos o gallinas; y animales de compañía tales como perros, gatos y roedores. En una realización específica, el sujeto es un ser humano. En otra realización específica, el sujeto es un mamífero no humano. En una realización, los polipéptidos se administran como el único agente antibacteriano. En otra realización, los polipéptidos se administran en combinación con uno o más agentes antibacterianos diferentes.

Los métodos de administración de las composiciones farmacéuticas divulgadas pueden ser orales o parenterales e incluyen sin limitación, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarticular, intrasínovial, subcutánea, intranasal, epidural, tópica y oral. Los compuestos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier vía adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse mediante un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito Ommaya. Se puede emplear también la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de formación de aerosol. En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesite tratamiento, tal como uso tópico sobre la piel; se puede utilizar cualquier método adecuado conocido en la técnica.

En un aspecto de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos de la presente invención para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una infección bacteriana. Se puede formular

una composición farmacéutica para tratamiento tópico. Se puede formular una composición farmacéutica para infecciones sistémicas.

Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica particular deseada. Dichos transportadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como transportadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición también puede contener agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o agentes tamponantes de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de una solución, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, pastilla para chupar, cápsula, polvo, parches para administración tópica y similares. Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una pomada, loción o crema adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más transportadores. Transportadores adecuados para la administración tópica incluyen, pero sin limitación, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuestos de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante, polisorbato 60, cera de ésteres de etilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. La composición puede formularse como un supositorio con aglutinantes y transportadores tradicionales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir transportadores convencionales, tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Un experto en la materia está bien versado en la formulación de agentes terapéuticos. Véase p. ej., Remington The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Md. (2000); Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995).

En el presente documento, también se describe un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado a dicho recipiente o recipientes hay un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de agentes farmacéuticos o productos biológicos, aviso que refleja (a) la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos, (b) instrucciones de uso, o ambas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar información adicional a un experto en la materia sobre cómo fabricar y usar los polipéptidos descritos en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) sin embargo, deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique otra cosa, el peso molecular es el peso molecular promedio y la temperatura está en grados centígrados.

Ejemplo 1

Identificación de polipéptidos que tienen actividad antibacteriana.

Se obtuvieron quince aislados clínicos de *A. baumannii* de un hospital de Nueva York. Las cepas de *A. baumannii* se aislaron y se trataron con mitomicina C para inducir la inducción de profagos. Los sobrenadantes se recogieron y la fase se precipitó con polietilenglicol (PEG). Los sobrenadantes de tres de los aislados de *A. baumannii* se examinaron mediante ME con tinción negativa y se tomaron imágenes del fago (Figuras 1A, 1B, y 1C).

El ADN del fago se separó de los compuestos precipitados conjuntamente mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción de ADN de alto peso molecular. A partir de este ADN, se construyó una biblioteca aleatoria de enlazadores expresables (E-LASL) como se describe anteriormente. (Schmitz JE. et al., 2008, Appl. Environ. Microbiol. 74:1649-1652.) En resumen, para todas las muestras, se fragmentaron 100 ng de ADN con la enzima de restricción TSP509I (secuencia consenso AATT) Después de la extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol, el ADN se unió a 40 ng de secuencia enlazadora, con un saliente 5' complementario (AATTCGGCTCGAG, donde el saliente está subrayado (SEQ ID NO: 46). La mezcla de unión se usó como plantilla para la PCR basada en Taq usando el cebador dirigido al enlazador CCATGACTCGAGCCGAATT (SEQ ID NO: 47).

Los insertos amplificados se unieron en el plásmido pBAD inducible por arabinosa usando el kit de expresión pBAD TOPO® TA; Invitrogen, según las instrucciones del fabricante. Los vectores recombinantes se transformaron en *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen). Para determinar qué clones tenían actividad lítica, las *E. coli* se colocaron en placas sobre agar LB suplementado con 100 µg / ml de ampicilina y sangre de oveja desfibrinada al 5 %. Después del

cultivo durante la noche a 37 °C, las placas se colocaron en un recipiente sellado que se unió a la salida de un nebulizador comercial. La arabinosa nebulizada se bombeó continuamente al recipiente durante 1 hora. Las placas se devolvieron a 37 °C y se identificaron colonias que desarrollaron una zona de hemólisis en el agar de sangre circundante. Los clones seleccionados se sembraron en estrías en placas de LB-ampicilina (que carecen de arabinosa) por separado y se dejaron propagar sin expresión inducida. (Schmitz JE, et al., 2010 Appl. Environ. Microbiol.76:7181-7187).

Para determinar la actividad destructora de *A. baumannii*, se realizó una exploración secundaria esencialmente como se describe en Schmitz JE, et al., 2010 Appl. Environ. Microbiol.76:7181-7187. Los resultados se sembraron en estrías como parches de aproximadamente 1 cm por 2 cm sobre placas de LB-ampicilina suplementadas con arabinosa al 0,2 %. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, las placas se expusieron al vapor de cloroformo para destruir y permeabilizar cualquier *E. coli* viable. Después, los parches se cubrieron con agar blando fundido que contenía *A. baumannii* y se observaron las zonas de aclaramiento. Se identificaron veintiún clones positivos que exhibían una zona clara alrededor del clon. La Figura 2 muestra una exploración representativa de la actividad del clon de lisina en el aclaramiento de *A. baumannii* vivo embebido en el agar.

Los insertos de los cierres positivos se secuenciaron y compararon con las secuencias en la base de datos de proteínas NCBI. Las alineaciones mostraron que entre los 21 clones hay cuatro clases de actividad lítica: i) nueve pertenecían a la familia de las glicosil hidrolasas, ii) siete eran lisozimas de la placa de base de fagos, iii) dos eran lisozima autolisinas y iv) tres eran lisinas. (Fig. 3). Para facilitar la referencia en el presente documento, independientemente de la clase, los polipéptidos codificados por estas secuencias se denominan "lisinas". La Figura 4 muestra una alineación de secuencias basada en la similitud de las secuencias de nucleótidos que codifican los 21 clones. La Figura 5 muestra una alineación de secuencias basada en la similitud de las secuencias polipeptídicas de los 21 clones.

Ejemplo 2

Actividad de clones positivos.

Se exploraron veintiuna construcciones diferentes para determinar la actividad contra trece aislados clínicos de *A. baumannii* diferentes. Las construcciones se expresaron de forma recombinante en *E. coli*. Las células se cultivaron a 30 °C a 200 rpm, y cuando alcanzaron la fase logarítmica media se indujeron mediante la adición de arabinosa al 0,2 %. La inducción continuó durante la noche. Por la mañana, las células se centrifugaron, se lavaron 3x con tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, antes de homogeneizarse en un homogeneizador Emulsiflex. Los residuos celulares se eliminaron por centrifugación (16000 g, 45 min) y el lisado se pasó a través de un filtro estéril de 0,22 urn para generar el lisado bruto.

A. baumannii cultivado durante la noche en TSB, se mezcló con TSB de agar suave a 50 °C y se vertió en una placa de agar TSB como una capa de agar superior. La placa se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los lisados crudos (10 ul) se añadieron a una placa de agar suave con *A. baumannii*, y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente cada día, mientras se mantenían a 4 °C durante el resto del tiempo. Las placas se incubaron hasta que las zonas de aclaramiento fueron visibles (4-5 días). Se puntuó una zona de aclaramiento más grande que la mancha original del lisado crudo. El número sobre cada lisina indica cuántas manchas para las cuales esa lisina fue la más eficaz.

Los resultados se muestran en la Figura 6. La construcción de lisina se muestra en el eje x y el porcentaje de cepas de *Acinetobacter* lisadas se muestra en el eje y. Los números sobre cada barra indica el número de cepas para las cuales esa lisina fue la más eficaz, ningún número indica una cepa. Tal como se puede observar, La lisina F307 lisaba aproximadamente el 90 % de las cepas ensayadas y era la más activa contra siete cepas.

Ejemplo 3

Lisis de *A. baumannii* por F307.

La Figura 7 muestra Micrográficas Electrónicas de Transmisión representativas de células de la cepa 1791 de *A. baumannii* después del tratamiento con el polipéptido F307. Las micrográficas muestran que F307 provocó lisis a través de la extrusión de la membrana citoplasmática hacia el exterior de la célula. (Véase la Figura 7, flechas). Se iniciaron dos cultivos de 100 ml de la cepa 1791 de *A. baumannii* en medio BHI y se cultivaron en un matraz de 500 ml durante 1,5 h a 37 °C, 200 rpm. Las células se centrifugaron después y se lavaron una vez con tampón PBS 1X. Después, se resuspendieron en 1,2 ml de PBS 1X. Se añadió EDTA a una concentración final de 250 µM a cada muestra. A la muestra experimental, 300 µl de lisina (~ 1,2 mg de concentración final) e incubaron el control (EDTA solo) y experimental (EDTA + lisina F307) a 25 °C. Los puntos de tiempo se tomaron a los 0,5, 1, 5, 10, 15 y 30 minutos. Las reacciones se interrumpieron y las células se fijaron usando Gluteraldehído al 2,5 % en tampón CAC (cacodilato de sodio 10 mM, CaCl2 0,1 mM, pH 6,5).

Ejemplo 4

Efecto del polipéptido F307 sobre las biopelículas de *A. baumannii* en catéteres *in vitro* e *in vivo*.

Tratamiento *in vitro* de *A. baumannii* 1791 adherente a catéter con lisina F307

Se cortó el tubo de catéter (CareFusion Ref número 72023E) usando un bisturí estéril en secciones de 3 pulgadas de largo. Se usó un cultivo durante la noche de *A. baumannii* 1791 para inocular 1:1000 a 50 ml de Glucosa con TBS al 0,2 % (-1X105 UFC / ml). Cada tubo de catéter de 3 pulgadas se sembró con 300-350 µl del cultivo diluido 1:1000. Después se sujetaron los catéteres y se colocaron en recipientes de plástico en una incubadora a 37 °C durante 3 días para permitir la formación de biopelículas. Después de los 3 días, los catéteres se lavaron dos veces bien con PBS o con tampón de fosfato de sodio pH 7,5 y después se añadieron 300-350 µl de F307 al tubo (~ 1 mg de concentración final). Después se sujetaron los catéteres. Se tomaron catéteres en los puntos de tiempo 0, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora. Los catéteres se lavaron dos veces con fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5 y se cortaron en trozos pequeños. Se colocaron en un tubo ependorff de 1,5 ml y se añadieron 500 µl de tampón NaP 50 mM pH 7,5. Los tubos se sonicaron durante 20 minutos y se agitaron con formación de vórtice durante 1 minuto. Las muestras se diluyeron en serie y se colocaron en placas 20 µl sobre un cuadrante de una placa de agar BHI y se incubaron a 37 °C durante la noche. Las UFC se calcularon a la mañana siguiente.

Se observó una disminución aproximada de 4 en escala logarítmica en el número de unidades formadoras de colonias (UFC de *A. baumannii* después de 30 minutos de tratamiento. La Tabla 3 muestra los recuentos de UFC. La Figura 8 muestra micrografías de Barrido Electrónico de biopelículas de 3 días de la cepa 1791 de *A. baumannii* antes y después del tratamiento con 250 µg de polipéptido F307.

Tabla 3. Tratamiento de biopelículas de *A. baumannii* en catéteres.

Muestra	UFC
sin tratamiento	1,4 x 10 ⁷
repetición sin tratamiento	3,0 x 10 ⁶
tratamiento con F307 de 15 minutos	9,0 x 10 ⁴
tratamiento con F307 de 30 minutos	6,0 x 10 ³

Ejemplo 5

Modelo de Catéter en Ratones: Se sembraron varias secciones de tubo de catéter de 3 pulgadas (1:1000) con la cepa 1791 de *A. baumannii*. Las biopelículas de *A. baumannii* se formaron como se describe anteriormente. Se afeitó la espalda de veinte ratones BALB / C, se esterilizó la espalda y luego se hizo una incisión para colocar una sección de 1 pulgada del catéter con una biopelícula ya formada debajo de la dermis de la espalda. Las incisiones se cerraron con grapas. Después de 24 horas, se inyectaron 250 µl de F307 (1 mg) (n = 10) o 250 µl de vehículo de control (n = 10) directamente en el catéter que estaba debajo de la dermis del ratón. El tratamiento se repitió después de 4 horas. Después de 3 horas, se retiraron los catéteres de los ratones y se analizaron como se describe en el Experimento 4. La Figura 9 muestra la reducción de los recuentos bacterianos en aproximadamente 2 en escala logarítmica en el tratamiento de ratones con el polipéptido F307 en comparación con el control.

Ejemplo 6

El polipéptido F307 rescata a los ratones de la muerte después de una inyección letal de *A. baumannii*.

Veintidós ratones C57BL / 6 recibieron 10⁸ UFC de cepa de *A. baumannii* por vía intraperitoneal (IP). Dos horas más tarde, dos ratones fueron sacrificados y los órganos se examinaron como se describe a continuación, diez ratones se inyectaron IP con 1 mg de F307 y diez ratones se inyectaron IP con vehículo de control. Los animales tratados mostraron un 50 % de supervivencia con esta dosis de lisina, mientras que los ratones control mostraron solo un 10 % de supervivencia 14 días después de la infección (Figura 10).

Los órganos de los dos ratones que fueron sacrificados después de la infección se examinaron para confirmar que los órganos estaban infectados con *A. baumannii* en el momento del tratamiento con el polipéptido F307. Se diseccionaron el hígado, bazo, riñón y corazón de los ratones. Los órganos se homogeneizaron después en 500 µl de PBS 1X. Se hicieron diluciones y se colocaron en placas sobre placas con Brain Heart infusion (BHI). Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche. Se contó el número de unidades formadoras de colonias. Los ratones de control se sacrificaron a las dos horas y mostraron *Acinetobacter* en todos los órganos examinados, lo que indica que los órganos estaban infectados con *A. baumannii* en el momento del tratamiento.

Ejemplo 7

El polipéptido P307 (SEQ ID NO: 43) se ensayó por duplicado contra 18 aislados clínicos de cepas de *A. baumannii*. Las cepas de *A. baumannii* se cultivaron en ON para alcanzar la fase estacionaria. Las células se lavaron 3X en Tris 20 mM, pH 7,5 y se resuspendieron en el mismo tampón a una DO (595 nm) de aproximadamente 0,7. A estas células, se añadió P307 (250 µg / ml) o un volumen correspondiente de tampón, y la mezcla se dejó incubar durante 60 minutos

a temperatura ambiente. Se hicieron diluciones de las mezclas y se colocaron en placas sobre placas de Agar con TSB para el recuento posterior de unidades formadoras de colonias.

- 5 El tratamiento con el polipéptido P307 dio como resultado una disminución de 1 a 8 en escala logarítmica en la viabilidad bacteriana, frente al control, después de la incubación durante 60 minutos con 250 µg de P307. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Cuando se comparó P307 con el polipéptido F307 de longitud completa (SEQ ID NO: 1), el polipéptido P307 tuvo mayor actividad.

Tabla 4. Actividad de P307 contra 18 cepas de *A. baumannii*.

Cepa	Control 1	Control 2	Control Promedio	P307 1	P307 2	Promedio de P307	Diferencia	Disminución en escala logarítmica
1775	1,00E+08	4,50E+08	2,75E+08	1,00E+07	1,50E+07	1,25E+07	2,20E+01	1,34
1776	5,50E+08	3,50E+08	4,50E+08	8,80E+05	7,50E+05	8,15E+05	5,52E+02	2,74
1777	7,00E+08	4,00E+08	5,50E+08	6,50E+06	9,00E+06	7,75E+06	7,10E+01	1,85
1788	2,00E+08	3,00E+08	2,50E+08	1,50E+07	1,20E+07	1,35E+07	1,85E+01	1,27
1789	4,50E+08	3,50E+08	4,00E+08	1,10E+07	1,30E+07	1,20E+07	3,33E+01	1,52
1790	1,50E+08	2,00E+08	1,75E+08	5,50E+05	1,80E+05	3,65E+05	4,79E+02	2,68
1791	9,0E+08	4,5E+08	6,8E+08	2,2E+05	2,2E+05	2,2E+05	3,1E+03	3,49
1792	1,2E+09	8,5E+08	1,0E+09	7,1E+05	7,5E+05	7,3E+05	1,4E+03	3,15
1793	3,5E+08	5,0E+08	4,3E+08	6,5E+05	5,6E+05	6,1E+05	7,0E+02	2,85
1794	7,5E+08	4,0E+08	5,8E+08	7,0E+05	6,0E+05	6,5E+05	8,8E+02	2,95
1795	9,5E+08	1,3E+09	1,1E+09	9,0E+06	2,5E+07	1,7E+07	6,6E+01	1,82
1796	1,0E+09	7,0E+08	8,5E+08	8,2E+05	8,2E+05	8,2E+05	1,0E+03	3,02
1797	1,2E+09	9,0E+08	1,1E+09	6,7E+05	6,5E+05	6,6E+05	1,6E+03	3,20
1798	4,0E+08	4,0E+08	4,0E+08	2,7E+05	6,5E+05	4,6E+05	8,7E+02	2,94
1799	5,5E+08	3,5E+08	4,5E+08	2,9E+07	7,0E+06	1,8E+07	2,5E+01	1,40
S1	1,4E+09	1,1E+09	1,3E+09	4,2E+07	3,0E+07	3,6E+07	3,5E+01	1,54
S3	2,5E+08	2,0E+08	2,3E+08	6,8E+05	6,5E+05	6,7E+05	3,4E+02	2,53
S5	1,1E+09	8,5E+08	9,8E+08	1,0E+00	1,0E+00	1,0E+00	9,8E+08	8,99

Ejemplo 8

La adición de un péptido de extensión corta dio como resultado una mayor actividad antibacteriana de P307.

- 15 El péptido SQSRESQC (SEQ ID NO: 44) procede del virus de la hepatitis C y se ha demostrado que tiene actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y gramnegativas. Se conjugó esta secuencia con P307 (P307Ex) para determinar su efecto sobre la actividad. La secuencia de F307, p307 y P307Ex (SEQ ID NO: 1,43 y 45 respectivamente) se proporcionan en la figura 11, donde una parte de la secuencia de F307 está subrayada para mostrar la ubicación de P307 y una parte de la secuencia de P307 está doblemente subrayada para mostrar la ubicación de la secuencia antimicrobiana.

P307 y P307Ex se analizaron por duplicado contra seis cepas bacterianas. La acidez antibacteriana se midió como se describe en el Ejemplo 5. El tratamiento con P307Ex dio como resultado una disminución de 3,2 en escala logarítmica en *A. baumannii* 1791, mientras que el tratamiento con P307 dio como resultado una disminución de 2,9 en escala logarítmica que demuestra que la adición del péptido antimicrobiano aumentó la actividad de P307. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Cepa	Control 1	P307 EX1	P307 EX 2	Promedio de P307Ex	Diferencia	Disminución en escala logarítmica
1775	5,00E+08	1,60E+05	1,10E+05	1,35E+05	3,70E+03	3,5
1776	5,00E+08	5,50E+05	6,50E+05	6,00E+05	8,33E+02	2,9
1777	6,50E+08	6,50E+04	2,80E+05	1,73E+05	3,77E+03	3,5
1788	3,50E+08	8,80E+05	5,80E+05	7,30E+05	4,79E+02	2,6
1789	4,00E+08	1,10E+07	1,30E+07	1,20E+07	3,33E+01	1,5
1790	2,00E+08	1,50E+04	2,00E+04	1,75E+04	1,14E+04	4,0
1791	3,50E+08	4,00E+04	4,50E+04	4,25E+04	8,24E+03	3,9

(continuación)

Cepa	Control 1	P307 EX1	P307 EX 2	Promedio de P307Ex	Diferencia	Disminución en escala logarítmica
1792	1,00E+08	4,00E+04	5,00E+03	2,25E+04	4,44E+03	3,6
1793	1,50E+08	3,50E+04	2,00E+04	2,75E+04	5,45E+03	3,7
1794	5,00E+07	1,40E+05	1,00E+05	1,20E+05	4,17E+02	2,6
1795	4,00E+08	5,50E+04	1,30E+05	9,25E+04	4,32E+03	3,6
1796	2,50E+08	3,80E+05	2,50E+05	3,15E+05	7,94E+02	2,8
1797	2,50E+08	5,50E+06	8,50E+06	7,00E+06	3,57E+01	1,5
1798	3,50E+08	3,40E+05	3,70E+05	3,55E+05	9,86E+02	3,0
1799	3,50E+08	5,00E+03	3,00E+04	1,75E+04	2,00E+04	4,3
S1	8,50E+08	5,90E+05	7,00E+05	6,45E+05	1,32E+03	3,1
S3	3,00E+08	1,60E+07	1,40E+07	1,50E+07	2,00E+01	1,3
S5	1,50E+09	5,00E+05	2,90E+05	3,95E+05	3,80E+03	3,57

P307 y P307Ex se ensayaron para determinar la actividad contra la cepa 1791 de *A. baumannii*, *E. coli*, cepa PA01 de *P. aeruginosa*, cepa RN4220 de *S. aureus*, cepa 8325 de *S. aureus* y *B. anthracis*. Tal como se muestra en la Tabla 6, P307 y P307 fueron más activos contra *A. baumannii* y *B. anthracis*.

5

Tabla 6. P307 y P307Ex contra otras especies bacterianas.

Muestra	<i>A. baumannii</i> 1791	<i>E. coli</i>	<i>B. anthracis</i> Δ sterne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01	<i>S. aureus</i> RN4220	<i>S. aureus</i> 8325
control 1	5,50E+08	5,50E+08	2,40E+07	1,30E+09	1,50E+09	6,50E+08
control 2	2,60E+08	4,50E+08	2,80E+07	4,50E+08	7,50E+08	9,50E+08
P307EX 1	1,10E+05	3,50E+08	2,60E+03	4,70E+07	5,20E+07	3,20E+07
P307EX2	3,90E+05	3,00E+08	2,90E+03	3,70E+07	5,80E+07	3,60E+07
P307 1	5,80E+05	3,50E+08	3,10E+03	5,60E+07	8,00E+08	4,80E+07
P307 2	3,70E+05	3,50E+08	4,00E+03	4,00E+07	4,50E+08	4,40E+07
control promedio	4,05E+08	5,00E+08	2,60E+07	8,75E+08	1,13E+09	8,00E+08
P307EX promedio	2,50E+05	3,25E+08	2,75E+03	4,20E+07	5,50E+07	3,40E+07
P307 promedio	4,75E+05	3,50E+08	3,55E+03	4,80E+07	6,25E+08	4,60E+07
diferencia P307EX	1,62E+03	1,54E+00	9,45E+03	2,08E+01	2,05E+01	2,35E+01
diferencia P307	8,53E+02	1,43E+00	7,32E+03	1,82E+01	1,80E+00	1,74E+01
Disminución en escala log P307EX	3,2	0,2	4,0	1,3	1,3	1,4
Disminución en escala log P307	2,9	0,2	3,9	1,3	0,3	1,2

Ejemplo 9

10 P307 no es tóxico para los linfocitos B o los glóbulos rojos.

P307 se mezcló con glóbulos rojos para determinar si causaría lisis. No se observó lisis con 200 μ g de P307. Cuando se ensayó P307 para la lisis de una línea de linfocitos B, se encontró que tenía un ligero efecto sobre el número de células después de 24 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

15

Table 7 (% viable)

Muestra	0 min	5 min	30 min	1 horas	2 horas	3 horas	24 horas
Solo células iniciales	97 %			83,60 %		85 %	88,20 %
Tris-HCl pH=6,8		97,20 %	89,70 %	94,70 %	81,50 %	90,90 %	89,90 %
200 μ g de P307		94,60 %	1100 %	71,40 %	71,90 %	58,60 %	76,30 %
20 μ g de P307		97,20 %	88,60 %	89,70 %	90,30 %	91,00 %	94,20 %
2 μ g de P307		95,20 %	76,90 %	89,30 %	92,50 %	93,80 %	96,30 %

Los péptidos usados en los Ejemplos 10-20 se sintetizaron químicamente.

20 Los péptidos se crearon usando un sintetizador de péptidos Symphony™ de Protein Technologies (PTI Tucson, Arizona, EE. UU.) en resina Wang (alcohol p-alcoxi-bencílico) acoplada previamente (Bachem, Torrance, CA, EE. UU.). Los vasos de reacción se cargaron a 25 μ M y los péptidos se alargaron usando aminoácidos protegidos con Fmoc (Anaspec, San Jose, CA, EE.UU.) (1997. Standard Fmoc protocols. 289:44-67). La desprotección de la amina

se realizó con piperidina al 20 % (Sigma-Aldrich) en NMP (N-metilpirrolidinona). Se realizaron reacciones de acoplamiento repetitivas usando HATU / CI-HOBT 0,6 M (hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametiluronio / 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol) (P3 Biosystems, Shelbyville, KY, EE. UU.) y NMM 0,4 M (N-metilmorfolina) usando NMP (EMD) como solvente primario (1989. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry 30:1927-1930.). La escisión de la resina y la desprotección de la cadena lateral se lograron transfiriendo a un matraz de fondo redondo de 100 ml y se hicieron reaccionar con 4,0 ml de ácido trifluoroacético concentrado, grado de secuenciación (Fisher) con triisopropilsilano (Fluka), agua desgasificada y 3,6-dioxa-1,8-octaneditiol (DODT, Sigma-Aldrich) en una proporción de 95:2:2:1 durante un período de tiempo de 6 horas. Esto se siguió por filtración en columna a un matraz de fondo redondo de 50 ml y el volumen de TFA se redujo a 2 ml usando un evaporador rotatorio. Se realizó una precipitación de éter convencional en los péptidos individuales mediante la transferencia a un tubo de falcon de 50 ml que contenía 40 ml de *tert*-butil metil éter frío (TBME, Sigma-Aldrich). Las muestras se colocaron en un baño de hielo durante 2 horas para ayudar a la precipitación, seguido de la formación de sedimento mediante centrifugación (3300 rpm, 5 min). El exceso de éter se eliminó por aspiración al vacío y los sedimentos peptídicos se dejaron secar durante una noche en una campana extractora. Los sedimentos peptídicos secos se redisolieron en acetonitrilo al 20 % y 10 ml de agua de grado HPLC se submuestrearon para LC / MS y se liofilizaron. Todos los productos brutos se analizaron posteriormente mediante AquLC™ UPLC de fase inversa (Waters Chromatography, Milford, MA, EE. UU.) utilizando una columna Waters BEH C18. La integridad del péptido individual se verificó mediante espectrometría de masas por electroaspersión en tándem utilizando un sistema de espectrómetro ThermoFinnigan LTQ™ (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU.). La cromatografía preparativa se realizó en una columna preparativa Vydac C18 RP en una HPLC Waters 600 Prep. Se recogieron fracciones individuales en intervalos de 30 segundos, caracterizadas usando LC / MS y se liofilizaron las fracciones que contenían el producto deseado. Estas se almacenaron a -20 °C hasta que se resuspendieron en agua Milli-Q esterilizada en autoclave para varios ensayos. Las soluciones madre se almacenaron a 4 °C. Los péptidos se resumen con sus secuencias de aminoácidos, puntos isoeléctricos (pi) y pesos moleculares (PM) en la tabla 8.

Tabla 8

Nombres	Secuencias de aminoácidos	pI	PM	SEQ ID NO:
F307		10,12	16 kDa	1
P307	NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRK	10,71	3,4 kDa	43
P307AE-8	NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRK <u>AE</u> MELFLK	10,21	4,4 kDa	49
P307SQ-8C	NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRK <u>SQSRESQC</u>	10,38	4,3 kDa	45
P307CS-8	NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRK <u>CSQRQSES</u>	10,38	4,3 kDa	51
P307SQ-8A	NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLGLVKRRK <u>SQSRESQA</u>	10,69	4,3 kDa	53

Ejemplo 10

Comparación de las actividades bactericidas *in vitro* de péptidos de la presente divulgación.

Para determinar las actividades bactericidas *in vitro* de los péptidos, P307, P307AE-8, P307SQ-8C y P307CS-8, las bacterias se trataron con los péptidos durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células sobrevivientes se diluyeron en serie y se colocaron en placas sobre placas de agar con TSB para determinar la actividad.

Las actividades bactericidas de 50 µg / ml de los péptidos, P307, P307AE-8 y P307SQ-8C se compararon tratando cepas número 1791, S5 y ATCC17978 de *A. baumannii*. P307SQ-8C fue el más activo, reduciendo aproximadamente 10⁶ ufc / ml de bacterias por debajo del límite de detección (<10 ufc / ml). P307 fue ligeramente más activo que P307AE-8, pero ambos péptidos indujeron una disminución de aproximadamente 3,8 unidades logarítmicas en bacterias viables (Fig. 2A). Para investigar cómo los ocho aminoácidos, QSRESQC, contribuyeron a la mayor actividad de P307SQ-8C, se añadió la misma concentración molar de péptido QSRESQC que 50 µg / ml de P307 por sí mismo o en combinación con P307 a las cepas número 1791 y S5 de *A. baumannii*. Las actividades se compararon con 50 µg / ml de P307 y P307SQ-8C. La combinación fue solamente tan activa como P307 mientras que el péptido QSRESQC solo no tiene actividad (Fig. 2B). Por lo tanto, el enlace es esencial para la alta actividad bactericida de P307SQ-8C. A continuación, se investigó la importancia de la secuencia y la composición. Al codificar los últimos ocho aminoácidos en P307SQ-8C, se sintetizó P307CS-8 con una adición C-terminal de CSQRQSES a P307. Las actividades de P307SQ-8C y P307CS-8 fueron comparables (Fig. 2C). Las barras de error muestran la desviación estándar y la línea horizontal negra marca el límite de detección. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la actividad superior de P307SQ-8C deriva de la composición de los últimos ocho aminoácidos, independientemente del orden de los últimos ocho aminoácidos. Para una investigación adicional, SE UTILIZÓ P307SQ-8C porque es el más activo y comparamos su actividad con P307.

Ejemplo 11

Actividades bactericidas de P307 y P307SQ-8C

Se investigaron los efectos del pH y el NaCl sobre las actividades *in vitro* de P307 y P307SQ-8C. La cepa NÚMERO 1791 de *A. baumannii* se trató con 50 µg / ml de péptidos para analizar cada condición. Se utilizaron dos sistemas de tampón (fosfato de sodio y Tris-HCl) para PROBAR pH 6,8, 7,5, 8,0 y 8,8. Los péptidos fueron más activos en Tris-HCl y un pH más alto provocó una mejor destrucción (Fig. 13A). Por lo tanto, se decidió continuar con los experimentos *in vitro* de los presentes inventores con Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que se aproxima al pH fisiológico. Las actividades de ambos péptidos fueron inversamente proporcionales a la concentración de NaCl (Fig. 13B). A continuación, la titulación de P307 y la cinética de destrucción de P307 y P307SQ-8C se investigaron tratando la cepa número 1791 de *A. baumannii*. La actividad de P307 fue dependiente de la concentración, comenzando desde 4 µg / ml (Fig. 13C). P307SQ-8C actuó más rápido que P307, dando como resultado una disminución de aproximadamente 3,2 unidades logarítmicas ya en el punto de tiempo de 5 minutos (Fig. 13D). No hubo diferencias en las actividades de ninguno de los péptidos a temperatura ambiente o 37 °C (datos no mostrados). A partir de estos experimentos de caracterización *in vitro*, se decidió que las condiciones experimentales óptimas de los presentes inventores eran Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 50 µg / ml de péptidos y 2 horas a temperatura ambiente (22-25 °C), a menos que se indique otra cosa.

Ejemplo 12

A continuación, se investigaron los espectros bactericidas *in vitro* de P307 y P307SQ-8C contra diferentes especies bacterianas, *A. baumannii* (cepas números 1775, 1776, 1777, 1788, 1789, 1790, 1791, 1792, 1793, 1794, 1796, 1797, 1798, 1799, ATCC 17978 y S1, S3, D5), *Bacillus anthracis* (ΔSterne), *Escherichia coli* (DH5α), *Pseudomonas aeruginosa* (PA01), *Staphylococcus aureus* (RN4220) y dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603 y ATCC10031). Estas especies bacterianas se trataron con 50 µg / ml de P307 o P307SQ-8C en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 durante 2 horas a temperatura ambiente para investigar la especificidad de los péptidos. Entre las bacterias ensayadas, las cepas de *A. baumannii* fueron consistentemente más sensibles a los péptidos, mostrando una disminución promedio de 2,7 y 6,2 unidades logarítmicas con P307 y P307SQ-8C, respectivamente. *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* son moderadamente sensibles. P307 y P307SQ-8C produjeron una disminución promedio de aproximadamente 1,3 y 2,9 unidades logarítmicas, respectivamente, para estas bacterias. Sin embargo, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* son resistentes a ambos péptidos (Fig. 14).

Ejemplo 13.

Además, para investigar las actividades de los péptidos contra *A. baumannii* en diferentes fases de crecimiento, se compararon las sensibilidades de la cepa número 1791 en la fase logarítmica, fase estacionaria y estado de biopelícula. Las bacterias en la fase logarítmica (3 horas después de la inoculación del cultivo durante la noche 1:100 en medios nuevos) y la fase estacionaria (cultivo durante la noche) se trataron con 50 µg / ml de P307 o P307SQ-8C durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células sobrevivientes se diluyeron en serie y se colocaron en placas sobre placas de agar con TSB para determinar ufc/ml. (figura 15A). Las biopelículas de *A. baumannii* se establecieron incubando aproximadamente 10⁵ ufc / ml de la cepa número 1791 en TSB con glucosa al 0,2 % dentro de catéteres de aproximadamente 2,5 cm de largo durante 72 horas a 37 °C. Después se lavaron los catéteres para eliminar las células planctónicas y se trataron con 250 µg / ml de P307 o P307SQ-8C. Después de 2 horas y 24 horas a temperatura ambiente, la biopelícula se alteró por completo y las células sobrevivientes se resuspendieron para sembrarse en placas y contarse para determinar la eficacia de destrucción de los péptidos contra la biopelícula *in vitro*, (figura 15B). Los organismos en fase logarítmica fueron ligeramente más sensibles a P307 que en fase estacionaria (aproximadamente una disminución de 3,7- frente a 2,4 unidades logarítmicas). Parece que no hay tal diferencia con P307SQ-8C (Figura 15A). Las biopelículas fueron las más resistentes de todas las fases de crecimiento. Las biopelículas se trataron con 250 µg / ml de P307 o P307SQ-8C durante 2 o 24 h. Después de 2 horas, se observó una disminución de aproximadamente 3 y 4 unidades logarítmicas en ufc / ml con P307 y P307SQ-8C, respectivamente. Después de 24 horas, P307 produjo una disminución adicional de aproximadamente 1,3 unidades logarítmicas, mientras que P307SQ-8C no lo hizo (figura 15B).

Ejemplo 14

Para comparar la eficacia de los péptidos P307 y P307SQ-8C con algunos antibióticos clínicamente utilizados, se realizó un ensayo de concentración inhibitoria mínima para dos cepas de *A. baumannii*, número 1791 y ATCC17978. Se usó el método de dilución por microtitulación para determinar las CIM de levofloxacin, ceftazidima, polimixina B, P307 y P307SQ-8C para las cepas número 1791, número 1798, S5 y ATCC17978 de *A. baumannii*. Para los antibióticos, se incluyeron diluciones en serie de 1,5-2 veces (tres inferiores y tres superiores) de las CIM determinadas por Etest Lood R, et al., 2015, Antimicrob. Agents Chemother. 59:1983-1991.). Para los péptidos, se analizaron diluciones en serie de dos veces (500-31,25 µg / ml). Los cultivos durante la noche se resuspendieron a DO₆₀₀ de 0,001 (aproximadamente 10⁵ ufc / ml) en caldo Mueller-Hinton (pH 7,9). Los antibióticos o péptidos se agregaron hasta alcanzar 100 µl finales para cada dilución. Se permitió que las bacterias crecieran a 37 °C durante 24 horas a 220 rpm. La absorbancia a 595 nm se leyó después en un lector SpectraMax Plus (Molecular Devices). Las CIM se determinaron como las concentraciones más bajas de agentes antimicrobianos que inhiben completamente el crecimiento bacteriano. Se utilizó Alamar@Blue para confirmar los datos obtenidos a partir de DO₅₉₅. Los experimentos se realizaron al menos dos veces por duplicado.

Las cepas presentaron un grado variable de sensibilidad a todos los agentes antimicrobianos (Tabla 9).

Tabla 9

Cepas de <i>A. baumannii</i>	Levofloxacin		Ceftazidima		Polimixina B		P307	P307SQ-8C		
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
número 1791	6	16,6	250	457	0,25	0,19	375	110	125	29
ATCC17978	≤ 0,1	0,3	12	21,9	0,25	0,19	750	220	≤ 500	≤ 116

P307SQ-8C tiene una CIM menor que P307, que está de acuerdo con la actividad de destrucción *in vitro* (Fig. 2 y 3).

Ejemplo 15

Efectos citotóxicos de P307 y P307SQ-8C medidos por la supervivencia de los linfocitos B y la hemólisis.

Los linfocitos B humanos obtenidos de un paciente con fiebre reumática en el Hospital Universitario Rockefeller se cultivaron en medio RPMI suplementado con suero bovino al 10 %, penicilina y estreptomina. Las células se cosecharon por centrifugación a baja velocidad, se lavaron una vez en medio y se volvieron a suspender en medio calentado previamente a una concentración de 10^7 células / ml, según se determinó mediante pruebas de exclusión con azul de tripano. Los péptidos (P307, P307SQ-8C y melitina) se diluyeron en serie (80-0,3125 µM) en medios de cultivo y se añadieron a 5×10^4 células vivas. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂, después de lo cual se tiñeron (ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96; Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron durante 4 horas adicionales, antes de agregar una solución de Solubilización / Parada, y se incubaron durante la noche. La absorbancia a 570 nm se midió en un lector SpectraMax Plus (Molecular Devices). Las reacciones se llevaron a cabo dos veces por triplicado y los datos representativos se muestran como media ± desviación estándar.

Se recogió sangre humana de un individuo sano en un tubo de EDTA y se recogieron glóbulos rojos (RBC) a través de centrifugación a baja velocidad. Las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en una solución de RBC al 10 %. P307 y P307SQ-8C se diluyeron en serie en PBS (80-0,3125 µM). se utilizaron PBS y Triton X-100 al 1 % como controles negativos y positivos, respectivamente. Las muestras se mezclaron y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se recogió el sobrenadante y se registró la absorbancia a 405 nm a través del lector SpectraMax Plus (Molecular Devices). Las reacciones se llevaron a cabo dos veces por triplicado y los datos representativos se muestran como media ± desviación estándar.

Se incubaron diluciones en serie de péptidos con aproximadamente 5×10^4 linfocitos B vivos durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂, y se usó melitina como control positivo. El ensayo de Proliferación Celular No Radiactivo CellTiter 96® (Promega) se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante para cuantificar la supervivencia de los linfocitos B. Los glóbulos rojos (RBC) se incubaron con diluciones en serie de los péptidos y la liberación de hemoglobina en el sobrenadante se midió por DO₄₀₅ para determinar la hemólisis. Se usó Triton X-100 como control positivo. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Los péptidos se probaron para determinar su citotoxicidad utilizando linfocitos B y glóbulos rojos (RBC) humanos. A diferencia del control positivo de melitina, las membranas de los linfocitos B no se ven afectadas por P307 o P307SQ-8C. Incluso a la concentración más alta probada (80 µM), la viabilidad de las células permanece igual que el control del tampón (figura 16A). Análogamente, la integridad de los glóbulos rojos tampoco se ve afectada por ninguno de los péptidos en comparación con el control positivo Triton X-100 (figura 16B).

Ejemplo 16

Una porción de P307SQ-8C (aproximadamente el 25 %) se desplaza al doble del peso molecular teórico en comparación con P307SQ-8A, que se desplaza a 4,3 kD (datos no mostrados). Para determinar la importancia de la formación de enlaces disulfuro para la alta actividad de P307SQ-8C, se compararon las actividades bactericidas de P307 y P307SQ-8C en presencia de ditioneitol (DTT) 0, 0,1 y 1 mM. La cepa número 1791 de *A. baumannii* se trató con 50 µg / ml de P307 o 10 µg / ml de P307SQ-8C en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 durante 2 horas a temperatura ambiente. Las células sobrevivientes se diluyeron en serie y se colocaron en placas sobre placas de agar con TSB. P307SQ-8C se vuelve menos activo con una mayor concentración de DTT, mientras que la actividad de P307 aumenta ligeramente (figura 17A). Para confirmar aún más la importancia de la formación de disulfuro para la actividad de P307SQ-8C, se sintetizó P307SQ-8A con la última cisteína cambiada a alanina. Las cepas número 1791 y ATCC17978 de *A. baumannii* se trataron con 10 µg / ml de cada péptido. Los ensayos bactericidas de P307SQ-8C y P307SQ-8A mostraron que el primero es ligeramente más activo que el último (figura 17B). Estos resultados en conjunto señalaron que parte de la actividad superior de P307SQ-8C deriva de la formación de enlaces disulfuro entre dos moléculas.

Ejemplo 17

A continuación, se investigó si P307 se une al ADN, dadas las cargas positivas en los péptidos (carga neta de +7). El péptido P307 se mezcló con ADN a diferentes relaciones péptido: ADN (0:1-15:1) y se incubó durante 1 hora antes de analizarlo en un gel de agarosa. En comparación con el péptido de control positivo, no se observó ningún cambio en el peso molecular para P307 en ninguna de las proporciones de péptido a ADN ensayadas (Fig. 18).

Ejemplo 18

Debido a que los péptidos no parecían destruir las bacterias al interactuar con el ADN, se investigó si afectan la membrana bacteriana mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés). La cepa número 1791 de *A. baumannii* se trató con tampón (control) o 300 µg / ml de P307SQ-8C durante 5 minutos o 2 horas. La comparación de las imágenes por TEM de las muestras revela una alteración de la membrana interna y cambios en la densidad intracelular (Figuras 19A, B y C). Además, se descubrió que las bacterias resistentes a pH 7,5 (figura 3) eran sensibles a P307 a pH 8,8, incluidas *E. coli* y *K. pneumoniae* (figura 19D). Debido a que las cargas en el péptido no varían a medida que el pH cambia de 7,5 a 8,8, se razonó que los cambios se producen en la membrana bacteriana. A un pH más alto, la membrana bacteriana se carga más negativamente, permitiendo que los péptidos cargados positivamente establezcan interacciones iónicas más fuertes.

Ejemplo 19

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se planteó la hipótesis del siguiente mecanismo de acción: P307SQ-8C interactúa con la membrana bacteriana para ingresar a la célula y, en el proceso, altera la membrana citoplasmática. La permeabilización de la membrana es más eficaz cuando el péptido se dimeriza. La alteración induce la producción de especies reactivas de oxígeno, tal como los radicales hidroxilo, que alteran el contenido intracelular. Para investigar esta hipótesis, se determinó la alteración de la membrana utilizando el ensayo de absorción SYTOX® Green.

Los cultivos de bacterias durante la noche se lavaron en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, y se resuspendieron a una DO_{600} de 0,3 (aproximadamente 10^7 ufc / ml). Se añadió Benzonase® nucleasa (25 U / ml) (Novagen) y SYTOX® Green (1 µM) (nitrógeno) a las células bacterianas, y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se añadieron péptidos (50 µg / ml; P307 14,7 µM y P307SQ-8C 11,6 µM, y se usó melitina (14,7 µM) (Sigma) como control. Las unidades de fluorescencia relativa (UFR) se midieron en un lector SpectraMax Plus (Molecular Devices) a temperatura ambiente (ex: 485 nm, em: 520 nm) durante 2 horas. Las reacciones se llevaron a cabo dos veces por duplicado y los datos representativos se muestran como media ± desviación estándar.

Ambos péptidos permeabilizan las membranas de las bacterias sensibles, dando lugar a un aumento de las señales fluorescentes del tinte SYTOX® Green a medida que se une al ADN intracelular (figura 20). La formación de radicales hidroxilo se investigó tratando las bacterias con P307 y P307SQ-8C en presencia de un eliminador de radicales hidroxilo, tiourea. La polimixina B se incluyó como control, ya que se ha indicado que su actividad bactericida depende parcialmente de la vía de destrucción por radicales hidroxilo. La tiourea (300 mM) inhibe completamente la actividad de P307 y P307SQ-8C (Fig. 21A). Sin embargo, no se puede ignorar que la tiourea afecta las actividades por otras vías. Por tanto, las actividades bactericidas también se compararon en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Debido a que *A. baumannii* es una bacteria estrictamente aeróbica, *E. coli* se usó para el ensayo bactericida con Tris-HCl 50 mM, pH 8,8. Las actividades de ambos péptidos se inhibieron completamente por la condición anaeróbica (Fig. 21B). Aunque no se pueden descartar otras posibilidades, tal como el efecto sobre el mecanismo de transporte dependiente del oxígeno, los resultados actuales respaldan la hipótesis de los presentes inventores de formación de radicales hidroxilo.

Ejemplo 20

Se investigó la actividad *in vivo* de P307SQ-8C usando el modelo de piel en ratones porque la infección de la piel es una ruta común de enfermedad por *A. baumannii*. Las espaldas de 40 ratones hembra CD-1 (de 6 a 8 semanas de edad; Charles River Laboratories) se afeitaron con una rasuradora eléctrica. Se aplicó Nair™ (loción depilatoria para cuerpo y piernas, aloe y lanolina) en las áreas afeitadas para eliminar el vello restante. Después, las áreas se desinfectaron con toallitas con alcohol, y se indujo la abrasión de la piel por un esparadrapo. Después se marcó un área de - 1 cm² de la piel abrasada con esparadrapo y se infectó con 10 µl de aproximadamente 10^8 ufc / ml de cepa número 1791 de *A. baumannii*. Se permitió que las bacterias colonizaran durante 16-18 horas, después de lo cual el área infectada se dejó sin tratar o se trató con 200 µg de P307SQ-8C o 2 µg de polimixina B durante 2 horas. Para recoger las bacterias restantes en la piel, se sacrificaron los ratones y la piel infectada se procesó en 500 µl de PBS durante 1 minuto en un Stomacher® 80 Biomaster usando una microbolsa (Seward Ltd., Reino Unido). La solución se diluyó en serie y se colocó en placas sobre agar LB que contenía 4 µg / ml de levofloxacina y 12 µg / ml de ampicilina para la selección. Las ufc / ml resultantes de cada animal se muestra como un punto y las barras horizontales representan los medios. Ambos tratamientos reducen significativamente la carga bacteriana

(valor p = 0,0023, ANOVA unidireccional ordinaria) (figura 22).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Rockefeller University Office of Techonology Transfer

<120> LISINAS DE ACINETOBACTER

5 <130> 235932-373399

<150> 62/017.618

<151> 26/06/2014

10 <160> 53

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

15 <211> 146

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 1

20

Val Lys Thr Ser Asn Pro Gly Val Asp Leu Ile Lys Gly Phe Glu Gly
1 5 10 15

Leu Arg Leu Lys Ala Tyr Asp Asp Gly Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
20 25 30

Phe Gly Thr Ile Lys Tyr Pro Asn Gly Val Arg Val Lys Lys Gly Asp
35 40 45

Thr Cys Thr Glu Ser Gln Ala Glu Glu Tyr Leu Arg Asn Asp Leu Val
50 55 60

Val Phe Glu Ser Ala Ile Asn Arg Leu Val Lys Val Pro Leu Asn Gln
65 70 75 80

Asn Gln Phe Asp Ala Leu Ala Ser Phe Thr Tyr Asn Leu Gly Glu Gly
85 90 95

Asn Leu Ser Ile Ser Thr Leu Leu Lys Lys Leu Asn Ala Lys Asp Tyr
100 105 110

Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn Lys Ala Gly Gly Arg
115 120 125

Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys Ala Glu Met Glu Leu Phe
130 135 140

Leu Lys
145

<210> 2

<211> 189

<212> PRT

25

<213> Acinetobacter baumannii

<220>

<221> MOD_RES

<222> (105)..(105)

<223> METILACIÓN, Abu

<400> 2

Met Ser Ala Asn Pro Glu Leu Pro Trp Ile Ala Glu Ala Arg Arg His
1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Glu Ile Ala Gly Pro Lys His Asn Gln Thr Ile Ile
20 25 30

Lys Trp Leu Lys Asp Leu Lys Ser Ser Trp Leu Asp Asp Glu Thr Ala
35 40 45

Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His Cys Leu Gln Thr Ala Gly Phe Gln
50 55 60

Arg Gly Ser Val Asn Ser Arg Ser Lys Thr Tyr Lys Ser Gly Thr Lys
65 70 75 80

Ala Pro Pro Gly Phe Tyr Pro Phe Asn Trp Tyr Ala Ala Leu Glu Tyr
85 90 95

Ile Lys Glu Gly Gly Val Lys Leu Asx Lys Pro Cys Tyr Gly Cys Val
100 105 110

Ala Val Lys Ser Arg Glu Gly Gly Gly His Val Thr Phe Val Val Gly
115 120 125

Lys Thr Pro Thr Gly Lys Leu Ile Cys Leu Gly Gly Asn Gln Ser Asn
130 135 140

Lys Val Cys Phe Ala Val Tyr Asp Val Ser Ala Phe Glu Ala Phe Met
145 150 155 160

Trp Tyr Gly Lys Thr Ser Lys Pro Ala Ala His Arg Tyr Asp Leu Pro
165 170 175

Val Leu Lys Ile Val Ser Val Thr Ser Val Ser Glu Ala
180 185

<210> 3

<211> 185

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 3

ES 2 767 294 T3

Leu Lys Glu Thr Glu Met Asn Ile Glu Lys Tyr Leu Asp Glu Leu Ile
 1 5 10 15
 Lys Arg Glu Gly Gly Tyr Val Asn Asn Pro Ala Asp Arg Gly Gly Ala
 20 25 30
 Thr Lys Tyr Gly Ile Thr Gln Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Trp Asn
 35 40 45
 Gly Asn Met Lys Asp Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Lys
 50 55 60
 Lys Gln Tyr Trp Thr Ala Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Ser Ala Val Ala Glu Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Thr
 85 90 95
 Gly Phe Ala Lys Pro Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn
 100 105 110
 Gln Gly Lys Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Val Asp Gly Val Tyr Gly
 115 120 125
 Ser Ala Thr Leu Gly Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ser Lys Arg Gly Lys
 130 135 140
 Glu Gly Glu Lys Val Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln
 145 150 155 160
 Arg Tyr Ile Glu Ile Cys Glu Arg Asn Pro Lys Gln Glu Gln Phe Phe
 165 170 175
 Tyr Gly Trp Ile Ala Asn Arg Ile Gly
 180 185

<210> 4
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 4

Leu Pro Ser Thr Thr Arg Ala Glu Leu Ser Gln Thr Glu Tyr Asp Leu
 1 5 10 15

ES 2 767 294 T3

Tyr Leu Asp Phe Thr Tyr Gln Tyr Gly Val Pro Thr Phe Ala Lys Ser
20 25 30

Ser Met Leu Lys His Leu Lys Ala Gly Gln Tyr Lys Ala Ala Cys Asp
35 40 45

Ser Leu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Ala Lys Arg Asp Cys Ser Val Arg
50 55 60

Lys Asn Gly Cys Tyr Gly Val Trp Thr Arg Gln Val Glu Arg His Ala
65 70 75 80

Lys Cys Ile Gly Ala Gln
85

<210> 5
<211> 195
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii
<400> 5

Met Pro Pro Ser Gly Gly Phe Leu His Leu Lys Glu Thr Glu Met Asn
1 5 10 15

Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Glu Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Asn Asn Pro Ala Asp Arg Gly Gly Glu Thr Lys Tyr Gly Ile Thr Glu
35 40 45

Ala Val Ala Arg Thr Asn Gly Phe Lys Gly Asn Met Lys Asp Leu Pro
50 55 60

Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Lys Lys Gln Tyr Trp Thr Asp Pro
65 70 75 80

Arg Phe Asp Gln Val Asn Val Ile Ser Ser Leu Val Ala Glu Glu Leu
85 90 95

Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Thr Gly Phe Ala Lys Pro Leu Leu
100 105 110

Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly Trp Pro
115 120 125

Asp Leu Thr Val Asp Gly Ile Tyr Gly Pro Ala Thr Leu Asn Ala Leu
130 135 140

ES 2 767 294 T3

Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Asp Gly Glu Lys Val Leu Val
145 150 155 160

Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile Cys Glu
165 170 175

Arg Asn Pro Ser Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala Asn Arg
180 185 190

Val Val Ile
195

<210> 6
<211> 189
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 6

Met Ser Ala Asn Pro Glu Leu Pro Trp Ile Ala Glu Ala Arg Arg His
1 5 10 15

Ile Gly Leu Ala Glu Ile Ala Gly Pro Lys His Asn Gln Thr Ile Ile
20 25 30

Lys Trp Leu Lys Asp Leu Lys Ser Ser Trp Leu Asp Asp Glu Thr Ala
35 40 45

Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His Cys Leu Gln Thr Ala Gly Phe Gln
50 55 60

Arg Gly Ser Val Asn Ser Arg Ser Lys Thr Tyr Lys Ser Gly Thr Lys
65 70 75 80

Ala Pro Pro Gly Phe Tyr Pro Phe Asn Trp Tyr Ala Ala Leu Glu Tyr
85 90 95

Ile Lys Glu Gly Gly Val Lys Leu Asp Lys Pro Cys Tyr Gly Cys Val
100 105 110

Ala Val Lys Ser Arg Glu Gly Gly Gly His Val Thr Phe Val Val Gly
115 120 125

Lys Thr Pro Thr Gly Lys Leu Ile Cys Leu Gly Gly Asn Gln Ser Asn
130 135 140

Lys Val Cys Phe Ala Val Tyr Asp Val Ser Ala Phe Glu Ala Phe Met
145 150 155 160

ES 2 767 294 T3

Trp Tyr Gly Lys Thr Ser Lys Pro Ala Ala His Arg Tyr Asp Leu Pro
165 170 175

Val Leu Lys Ile Val Ser Val Thr Ser Val Ser Glu Ala
180 185

<210> 7
<211> 256
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 7

Met Lys Leu Ile Glu Asn Asn Ala Trp Gln Tyr Leu Ser Val Lys Leu
1 5 10 15

Pro Ala Val Gly Ala Phe Ile Met Leu Ile Leu Leu Pro Ala Leu Gln
20 25 30

Trp Gly Val Asp Tyr Glu Val Ile Pro Glu Lys Tyr His Ala Phe Val
35 40 45

Thr Gly Thr Leu Met Leu Val Leu Ser Trp Ile Gly Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Pro Arg Leu Asn Gly Pro Gln Leu Thr Gly Gln Leu Val Gly Ile
65 70 75 80

Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Thr Pro Thr Lys Pro Asp Glu Leu Ala
85 90 95

Trp Ile Ala Glu Ala Lys Lys His Leu Gly Leu Gln Glu Ile Pro Gly
100 105 110

Lys Gln His Asn Pro Thr Ile Leu Lys Trp Leu Ser Glu Leu Lys Ala
115 120 125

Trp Trp Ala Asp Asp Glu Thr Ala Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His
130 135 140

Cys Leu Lys Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Lys His Trp Tyr Arg Ala
145 150 155 160

Leu Asp Tyr Val Asn Tyr Gly Thr Lys Leu Ala Lys Pro Ala Tyr Gly
165 170 175

Cys Val Ala Ile Lys Thr Arg Lys Gly Gly Gly His Val Cys Phe Val
180 185 190

Val Gly Arg Asp Lys Lys Ser Gly Lys Leu Val Cys Leu Gly Gly Asn
195 200 205

Gln Ser Asn Lys Val Cys Tyr Ala Leu Tyr Asn Asp Ser Asp Phe Gln
210 215 220

Glu Phe Arg Trp Tyr Gly Arg Thr Thr Gln Pro Ala Ser Lys Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Pro Gln Leu Lys Gly Val Thr Ala Thr Arg Val Leu Glu Ala
245 250 255

<210> 8

<211> 256

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 8

Met Lys Leu Ile Glu Asn Asn Ala Trp Gln Tyr Leu Ser Val Lys Leu
1 5 10 15

Pro Ala Val Gly Ala Phe Ile Met Leu Ile Leu Leu Pro Ala Leu Gln
20 25 30

Trp Gly Val Asp Tyr Glu Val Ile Pro Glu Lys Tyr His Ala Phe Val
35 40 45

Thr Gly Thr Leu Met Leu Val Leu Ser Trp Ile Gly Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Pro Arg Leu Asn Gly Pro Gln Leu Thr Gly Gln Leu Val Gly Ile
65 70 75 80

Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Thr Pro Thr Lys Pro Asp Glu Leu Ala
85 90 95

Trp Ile Ala Glu Ala Lys Lys His Leu Gly Leu Gln Glu Ile Pro Gly
100 105 110

Lys Gln His Asn Pro Thr Ile Leu Lys Trp Leu Ser Glu Leu Lys Ala
115 120 125

Trp Trp Ala Asp Asp Glu Thr Ala Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His
130 135 140

Cys Leu Lys Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Lys His Trp Tyr Arg Ala
145 150 155 160

5

10

Leu Asp Tyr Val Asn Tyr Gly Thr Lys Leu Ala Lys Pro Ala Tyr Gly
 165 170 175

Cys Val Ala Ile Lys Thr Arg Lys Gly Gly Gly His Val Cys Phe Val
 180 185 190

Val Gly Arg Asp Lys Lys Ser Gly Lys Leu Val Cys Leu Gly Gly Asn
 195 200 205

Gln Ser Asn Lys Val Cys Tyr Ala Leu Tyr Asn Asp Ser Asp Phe Gln
 210 215 220

Glu Phe Arg Trp Tyr Gly Arg Thr Thr Gln Pro Ala Ser Lys Arg Tyr
 225 230 235 240

Thr Leu Pro Gln Leu Lys Gly Val Thr Ala Thr Arg Val Leu Glu Ala
 245 250 255

<210> 9

<211> 256

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 9

Met Lys Leu Ile Glu Asn Asn Ala Trp Gln Tyr Leu Ser Val Lys Leu
 1 5 10 15

Pro Ala Val Gly Ala Phe Ile Met Leu Ile Leu Leu Pro Ala Leu Gln
 20 25 30

Trp Gly Val Asp Tyr Glu Val Ile Pro Glu Lys His His Ala Phe Val
 35 40 45

Thr Gly Thr Leu Met Leu Val Leu Ser Trp Ile Gly Lys Lys Ile Ser
 50 55 60

Gln Pro Arg Leu Asn Gly Pro Gln Leu Thr Gly Gln Leu Val Gly Ile
 65 70 75 80

Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Thr Pro Thr Lys Pro Asp Glu Leu Ala
 85 90 95

Trp Ile Ala Glu Ala Lys Lys His Leu Gly Leu Gln Glu Ile Pro Gly
 100 105 110

Lys Gln His Asn Pro Thr Ile Leu Lys Trp Leu Ser Glu Leu Lys Ala
 115 120 125

Trp Trp Ala Asp Asp Glu Thr Ala Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His
130 135 140

Cys Leu Lys Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Lys His Trp Tyr Arg Ala
145 150 155 160

Leu Asp Tyr Val Asn Tyr Gly Thr Lys Leu Ala Lys Pro Ala Tyr Gly
165 170 175

Cys Val Ala Ile Lys Thr Arg Lys Gly Gly Gly His Val Cys Phe Val
180 185 190

Val Gly Arg Asp Lys Lys Ser Gly Lys Leu Val Cys Leu Gly Gly Asn
195 200 205

Gln Ser Asn Lys Val Cys Tyr Ala Leu Tyr Asn Asp Ser Asp Phe Gln
210 215 220

Glu Phe Arg Trp Tyr Gly Arg Thr Thr Gln Pro Ala Gly Lys Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Pro Gln Leu Lys Gly Val Thr Ala Thr Arg Val Leu Glu Ala
245 250 255

<210> 10

<211> 256

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 10

Met Lys Leu Ile Glu Asn Asn Ala Trp Gln Tyr Leu Ser Val Lys Leu
1 5 10 15

Pro Ala Val Gly Ala Phe Ile Met Leu Ile Leu Leu Pro Ala Leu Gln
20 25 30

Trp Gly Val Asp Tyr Glu Val Ile Pro Glu Lys Tyr His Ala Phe Val
35 40 45

Thr Gly Thr Leu Met Leu Val Leu Ser Trp Ile Gly Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Pro Arg Leu Asn Gly Pro Gln Leu Thr Gly Gln Leu Val Gly Ile
65 70 75 80

Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Thr Pro Thr Lys Pro Asp Glu Leu Ala
85 90 95

5

10

Trp Ile Ala Glu Ala Lys Lys His Leu Gly Leu Gln Glu Ile Pro Gly
100 105 110

Lys Gln His Asn Pro Thr Ile Leu Lys Trp Leu Ser Glu Leu Lys Ala
115 120 125

Trp Trp Ala Asp Asp Glu Thr Ala Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His
130 135 140

Cys Leu Lys Ser Ala Gly Ile Ala Tyr Pro Lys His Trp Tyr Arg Ala
145 150 155 160

Leu Asp Tyr Val Asn Tyr Gly Thr Lys Leu Ala Lys Pro Ala Tyr Gly
165 170 175

Cys Val Ala Ile Lys Thr Arg Lys Gly Gly Gly His Val Cys Phe Val
180 185 190

Val Gly Arg Asp Lys Lys Ser Gly Lys Leu Val Cys Leu Gly Gly Asn
195 200 205

Gln Ser Asn Lys Val Cys Tyr Ala Leu Tyr Asn Asp Ser Asp Phe Gln
210 215 220

Glu Phe Arg Trp Tyr Gly Arg Thr Thr Gln Pro Ala Ser Lys Arg Tyr
225 230 235 240

Thr Leu Pro Gln Leu Lys Gly Val Thr Ala Thr Arg Val Leu Glu Ala
245 250 255

<210> 11
<211> 248
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 11

Leu Asp Pro Val Met Thr Met Thr Ser Ser Pro Phe His Asn Ser Ser
1 5 10 15

Arg Ile Leu Leu Pro Ala Leu Gln Trp Gly Val Asp Tyr Glu Val Ile
20 25 30

Pro Glu Lys Tyr His Ala Phe Val Thr Gly Thr Leu Met Leu Val Leu
35 40 45

Ser Trp Ile Gly Lys Lys Ile Ser Gln Pro Arg Leu Asn Gly Pro Gln
50 55 60

Leu Thr Gly Gln Leu Val Gly Ile Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Thr
65 70 75 80

Pro Thr Lys Pro Asp Glu Leu Ala Trp Ile Ala Glu Ala Lys Lys His
85 90 95

Leu Gly Leu Gln Glu Ile Pro Gly Lys Gln His Asn Pro Thr Ile Leu
100 105 110

Lys Trp Leu Ser Glu Leu Lys Ala Trp Trp Ala Asp Asp Glu Thr Ala
115 120 125

Trp Cys Gly Thr Phe Val Ala His Cys Leu Lys Ser Ala Gly Ile Ala
130 135 140

Tyr Ser Lys His Trp Tyr Arg Ala Leu Asp Tyr Val Asn Tyr Gly Thr
145 150 155 160

Lys Leu Ala Lys Pro Ala Tyr Gly Cys Val Ala Ile Lys Thr Arg Lys
165 170 175

Gly Gly Gly Arg Val Cys Phe Val Val Gly Arg Asp Lys Lys Ser Gly
180 185 190

Lys Leu Val Cys Leu Gly Gly Asn Gln Ser Asn Lys Val Cys Tyr Ala
195 200 205

Leu Tyr Asn Asp Ser Asp Phe Gln Glu Phe Arg Trp Tyr Gly Arg Thr
210 215 220

Thr Gln Pro Ala Ser Lys Arg Tyr Thr Leu Pro Gln Leu Lys Gly Val
225 230 235 240

Thr Ala Thr Arg Val Leu Glu Ala
245

<210> 12
<211> 180
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 12

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Val Gly Gly
1 5 10 15

Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile
20 25 30

Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp
35 40 45

Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile
50 55 60

Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu
65 70 75 80

Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro
85 90 95

Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly
100 105 110

Tyr Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Asn Thr Leu Gly
115 120 125

Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val
130 135 140

Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile
145 150 155 160

Cys Glu Arg Asn Lys Ser Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala
165 170 175

Asn Arg Ile Gly
180

<210> 13
<211> 180
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 13

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly
1 5 10 15

Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile
20 25 30

Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp
35 40 45

Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile
50 55 60

Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu
65 70 75 80

Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro
85 90 95

Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly
100 105 110

Tyr Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Asn Thr Leu Gly
115 120 125

Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val
130 135 140

Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile
145 150 155 160

Cys Glu Arg Asn Lys Ser Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala
165 170 175

Asn Arg Ile Gly
180

<210> 14

<211> 180

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 14

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly
1 5 10 15

Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile
20 25 30

Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp
35 40 45

Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile
50 55 60

Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu
65 70 75 80

Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro
85 90 95

5

10

Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly
 100 105 110

Tyr Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Asn Thr Leu Gly
 115 120 125

Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val
 130 135 140

Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile
 145 150 155 160

Cys Glu Arg Asn Lys Ser Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala
 165 170 175

Asn Arg Ile Gly
 180

<210> 15

<211> 180

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 15

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly
 1 5 10 15

Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile
 20 25 30

Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp
 35 40 45

Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile
 50 55 60

Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu
 65 70 75 80

Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro
 85 90 95

Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly
 100 105 110

Tyr Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Ser Thr Leu Gly
 115 120 125

5

10

ES 2 767 294 T3

Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val
130 135 140

Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile
145 150 155 160

Cys Glu Arg Asn Pro Lys Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala
165 170 175

Asn Arg Ile Gly
180

<210> 16

<211> 168

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 16

Met Ser Asn Lys Thr Lys Ile Ile Val Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ala
1 5 10 15

Leu Phe Phe Ala Ser Leu Ile Gly Tyr Glu Gly Tyr Lys Ser Lys Pro
20 25 30

Tyr Leu Asp Ser Ala Lys Val Ala Thr Ile Gly Ile Gly Ser Thr Ser
35 40 45

Tyr Glu Asn Gly Thr Lys Val Lys Met Thr Asp Lys Pro Ile Thr Lys
50 55 60

Glu Arg Ala Val Gln Ile Ala Lys Ala His Ile Ala Lys Asp Glu Val
65 70 75 80

Ala Phe Arg Lys Ser Leu Gln Gly Val Arg Leu Thr Gln Thr Glu Tyr
85 90 95

Asp Val Tyr Leu Asp Phe Val Tyr Asn Tyr Gly Gln Ala Asn Trp Asn
100 105 110

Gly Ser Ser Met Leu Arg Asn Leu Lys Ala Gly Gln Tyr Lys Gln Ala
115 120 125

Cys Ala Ser Leu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Ala Lys Arg Asp Cys Ser
130 135 140

Ile Arg Ser Asn Gly Cys Tyr Gly Val Trp Thr Arg Gln Gln Asp Cys
145 150 155 160

ES 2 767 294 T3

Tyr Ser Lys Cys Met Ala Val Gln
165

<210> 17
<211> 168
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 17

Met Ser Asn Lys Thr Lys Ile Ile Val Thr Thr Leu Ser Ala Ser Ala
1 5 10 15

Leu Phe Phe Ala Ser Leu Ile Gly Tyr Glu Gly Tyr Lys Ser Lys Pro
20 25 30

Tyr Leu Asp Ser Ala Lys Val Ala Thr Ile Gly Ile Gly Ser Thr Ser
35 40 45

Tyr Glu Asn Gly Thr Lys Val Lys Met Thr Asp Lys Pro Ile Thr Lys
50 55 60

Glu Arg Ala Val Gln Ile Ala Lys Ala His Ile Ala Lys Asp Glu Val
65 70 75 80

Ala Phe Arg Lys Ser Leu Gln Gly Val Arg Leu Thr Gln Thr Glu Tyr
85 90 95

Asp Val Tyr Leu Asp Phe Val Tyr Asn Tyr Gly Gln Ala Asn Trp Asn
100 105 110

Gly Ser Ser Met Leu Arg Asn Leu Lys Ala Gly Gln Tyr Lys Gln Ala
115 120 125

Cys Ala Ser Leu Leu Lys Tyr Lys Tyr Val Ala Lys Arg Asp Cys Ser
130 135 140

Ile Arg Ser Asn Gly Cys Tyr Gly Val Trp Thr Arg Gln Gln Asp Arg
145 150 155 160

Tyr Ser Lys Cys Met Ala Val Gln
165

<210> 18
<211> 180
<212> PRT
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 18

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly

ES 2 767 294 T3

1	5	10	15
Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile	20	25	30
Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp	35	40	45
Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile	50	55	60
Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu	65	70	75
Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro	85	90	95
Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly	100	105	110
Tyr Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Ser Thr Leu Gly	115	120	125
Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val	130	135	140
Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile	145	150	155
Cys Glu Arg Asn Pro Lys Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala	165	170	175
Asn Arg Ile Gly	180		

<210> 19
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 19

Leu Thr Lys Asn Leu Ser Leu His Phe Trp Ile Asn Ile Asn Ile Lys	1	5	10	15
Phe Thr Asp Gln Leu Val Ala Phe Leu Arg Leu Lys Glu Ser Glu Met	20	25	30	
Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly Tyr				

ES 2 767 294 T3

35	40	45
Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile Thr		
50	55	60
Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp Leu		
65	70	75
Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile Glu		
	85	90
Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu Glu		
	100	105
		110
Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro Leu		
	115	120
		125
Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly Tyr		
	130	135
		140
Ala Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Asn Thr Leu Gly Ala		
145	150	155
		160
Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val Leu		
	165	170
		175
Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile Cys		
	180	185
		190
Glu Arg Asn Lys Ser Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala Asn		
	195	200
		205
Arg Ile Gly		
210		

<210> 20
 <211> 180
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 20

Met Lys Ile Glu Gln Tyr Leu Asp Asp Leu Ile Lys Arg Glu Gly Gly
1 5 10 15
Tyr Val Asn Asn Pro Val Asp Arg Gly Gly Ala Thr Lys Tyr Gly Ile
20 25 30
Thr Glu Ala Val Ala Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Gly Asn Met Lys Asp

35	40	45
Leu Pro Leu Asp Val Ala Lys Ala Ile Tyr Arg Lys Gln Tyr Trp Ile		
50	55	60
Glu Pro Arg Phe Asp Gln Val Asn Thr Leu Ser Ser Ala Val Ala Glu		
65	70	75
Glu Leu Leu Asp Thr Gly Val Asn Cys Gly Ile Asn Phe Ala Lys Pro		
	85	90
Leu Leu Gln Arg Ala Leu Asn Leu Leu Asn Asn Gln Gly Lys Ala Gly		
	100	105
Tyr Thr Asp Leu Lys Val Asp Gly Val Tyr Gly Ser Ser Thr Leu Gly		
	115	120
Ala Leu Lys Thr Tyr Leu Ala Lys Arg Gly Lys Glu Gly Glu Lys Val		
130	135	140
Leu Val Arg Val Leu Asn Ile Met Gln Gly Gln Arg Tyr Ile Glu Ile		
145	150	155
Cys Glu Arg Asn Pro Lys Gln Glu Gln Phe Phe Tyr Gly Trp Ile Ala		
	165	170
Asn Arg Ile Gly		
	180	

<210> 21
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter baumannii
 <400> 21

Met Lys Thr Ser Asn Ser Gly Ile Asn Leu Ile Lys Gly Phe Glu Gly
1 5 10 15
Lys Arg Leu Lys Ala Tyr Asp Asp Gly Val Gly Val Trp Thr Ile Gly
20 25 30
Phe Gly Thr Ile Lys Tyr Pro Asn Gly Val Arg Val Lys Lys Gly Asp
35 40 45
Ile Cys Thr Glu Ser Gln Ala Glu Gly Tyr Leu Arg Asn Asp Leu Val
50 55 60
Ala Phe Glu Asn Ala Ile Asn Arg Leu Val Lys Val Pro Leu Asn Gln

ES 2 767 294 T3

65		70		75		80		
Asn	Gln	Phe	Asp	Ala	Leu	Gly	Glu	Gly
				85			90	95
Asn	Leu	Ser	Lys	Ser	Thr	Leu	Lys	Lys
			100				105	110
Lys	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Phe	Pro	Lys
		115					120	125
Val	Leu	Ala	Gly	Leu	Val	Lys	Arg	Arg
	130					135		140
Leu	Lys							
	145							

<210> 22
 <211> 441
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 22

gtgaaaacaa gtaacccagg agtggattta atcaaaggct ttgaaggtct acgattgaaa	60
gcctatgacg atggtgtggg cgtttggacc attggctttg gcaccatcaa ataccggaac	120
ggtgtgogag tcaaaaaagg cgatacatgc actgaatctc aagcgggaaga ataccttcgc	180
aatgacttag ttgtatttga aagcgctatc aatcgtttgg tgaaagttcc gcttaatcaa	240
aaccaattcg atgctttggc ctcatcact tacaaccttg gtgagggcaa tcttagtata	300
tcaactttgc taaaaaagct taatgccaaa gactataaag gtgctgcagc tgaatttcct	360
aaatggaata aggcgggtgg tcgtgtcttg gctggattag ttaaactgcg caaagctgaa	420
atggagttat ttttaaaatg a	441

<210> 23
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 23

ttaagcctct gaaacactcg taacagaaac gatttttagg actggtaaact cgtatcgggtg	60
agcagctggg ttacttgttt tgccatacca cataaaggct tcaaaagccg aaacgtcata	120
tactgcaaaa caaactttat ttgactgatt accacctaag caaattaatt taccagtagg	180
tgttttacca acaacgaaag ttacatggcc accgccctct cttgatttta ccgcaacaca	240

	cccataacaa ggcttgtyta atttgactcc gccttctttg atgtattcaa gtgcggcata	300
	ccagttgaaa ggataaaagc ctggtggggc ctttgttcct gatttataag ttttgaacg	360
	cgagtttaca cttcctcttt gaaatcccgc cgtttggaga cagtgcgcaa cgaatgttcc	420
	gcaccatgca gtttcacgt caagccaaga ggactttaag tccttcagcc atttgatgat	480
	tgtctgggtg tgtttggggc cggcgatttc agccaaccct atgtgacggc gagcctctgc	540
	gatccacggt aattctggat ttgcactcat	570
	<210> 24	
	<211> 558	
5	<212> ADN	
	<213> Acinetobacter baumannii	
	<400> 24	
	ctgaaggaaa ccgaaatgaa tattgaaaaa tatcttgatg aattaattaa gcgtgaaggc	60
	gggtatgtaa ataaccagc tgatcggggc ggtgcaacta aatatggcat cacacaagct	120
	gttgcgctg aaaatggctg gaatggcaat atgaaagatt tgccgcttga tgtggccaaa	180
	gctatttaca agaagcaata ctggacagct ccgcgatttg accaagtaaa tgctgtttct	240
	tctgcagtag ctgaagagct tctagacact ggtgtgaatt gcggtaccgg atttgcaaaa	300
	cctcttttac aacgagcttt gaacttgctt aataaccaag gtaaagctgg atatgcagat	360
	ttagagggtg atggtgttta tggctcagca acgctagggtg cccttaaaac atacttgtca	420
	aaacgtggga aagaagggtga gaaggttctg gtgcgagtg tcaatattat gcaagggcaa	480
	cgctacattg aaatctgtga gcgtaatcca aagcaggaac agtttttcta tggctggatt	540
	gctaaccgga tcggctag	558
10	<210> 25	
	<211> 261	
	<212> ADN	
	<213> Acinetobacter baumannii	
15	<400> 25	
	tcactgcgct cctatacatt ttgcgtgtcg ttctacttgt ctggtccaga cgccataaca	60
	cccgttttta cgaacagagc aatcgcgctt tgcaacgtac ttatatttaa gtaaagagtc	120
	gcaagctgct ttatatgtac cagcctttaa atgcttaagc attgatgatt ttgcgaatgt	180
	tggcacaccg tattgatacg tgaaatcaag gtatagggtca tattcagtct gtgataattc	240
	ggctcgagtt gtggaaggca g	261
20	<210> 26	
	<211> 588	
	<212> ADN	
	<213> Acinetobacter baumannii	
25	<400> 26	

tcatataaca actcgattgg cgatccaacc atagaaaaac tgttcctggc taggattgcg	60
ttcacagatt tcaatgtaac gttgcccttg catgatatta agaacacgca ccaggacttt	120
ttcgccgtct tttccacgct tggccagata agttttgagt gcattaagag ttgctggacc	180
ataaattccg tcaactgtta aatctggcca acctgcttta ccttggttat tcagcaaatt	240
taaagcacgc tgtaagagtg gttttgcaaa tccggtaccg caatttacc cagtatctaa	300
aagctcttca gcaactaacg agctaattac attcacttga tcaaactcgcg gatctgtcca	360
atactgcttt ttataaatgg ctttggccac atcaagcggg aaatctttca tgttgccctt	420
aaagccgtta gtacgtgcta ctgcttcagt aataccgtac tttgtttcac cgcctcgatc	480
tgctggggtg tttacgtacc cgccctcacg cttaattaac tcgtccagat attgttcaat	540
gttcatttcg gtttccttca gatgtaaaaa accgcccga ggcggcat	588

5

<210> 27
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

10

<400> 27

ttaagcctct gaaacactcg taacagaaac gatttttagg actggtaaact cgtatcggtg	60
agcagctggg ttacttgttt tgccatacca cataaaggct tcaaaagccg aaacgtcata	120
tactgcaaaa caaactttat ttgactgatt accacctaag caaattaatt taccagtggg	180
tgtttttacca acaacgaaag ttacatggcc accgcccctct cttgatttta ccgcaacaca	240
cccataacaa ggcttggtcta atttgactcc gccttccttg atgtattcaa gtgcggcata	300
ccagttgaaa ggataaaagc ctgggtggggc ctttgttcct gatttataag ttttggaacg	360
cgagtttaca cttcctcttt gaaatccgc cgtttgagaga cagtgcgcaa cgaatgttcc	420
gcaccatgca gtttcatcgt caagccaaga ggactttaag tccttcagcc atttgatgat	480
tgtctgggtg tgtttggggc cggcgatttc agccaaccct atgtgacggc gagcctctgc	540
gatccacggg aattctggat ttgcactcat	570

15

<210> 28
 <211> 771
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

20

<400> 28

atgaagttaa ttgaaaacaa tgcttggcag tatctatctg ttaagttacc cgccgtaggt	60
gcattcatca tgctaatttt attgccagca ctacaatggg gtgttgatta tgaagttatt	120
cctgaaaaat atcatgcatt tgttactggg actttgatgc ttgttctgtc atggattgga	180

aagaaaattt ctcaaccacg acttaatggc ccgcaattaa caggccagtt agtagggatc 240
aattctttat tgaatatccc aacaccaaca aagcctgatg aattagcttg gattgcggaa 300
gcaaaaaagc atcttggcct tcaagaaata cctggtaaac agcataaccc aactatttta 360

aatggctct cggagctaaa ggcttgggtg gctgacgatg aaacggcttg gtgtgggacc 420
ttcgttgcaac attgcttgaa atcagctgga attgcttatc ctaagcattg gtaccgtgca 480
ttggattatg tgaattatgg tacaaaatta gctaaacccg cttacggttg ttagctatt 540
aaaactcgaa aggggtggtg gcatgtttgt tttgtagttg gccgtgacaa aaagtctgga 600
aagttagtat gccttggagg caatcagtc aataaagttt gttatgcact ttataatgac 660
tctgactttc aagaattcag atggtatggt cgtacaactc aaccagcaag taagcgttat 720
acattgccac aattaaaagg cgtaacagct actagggttt tggaagccta a 771

<210> 29

<211> 771

<212> ADN

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 29

ttaggcttcc aaaaccctag tagctgttac gccttttaaat tgtggcaatg tataacgctt 60
acttgctggt tgagttgtac gaccatacca tctgaattct tgaaagtcag agtcattata 120
aagtgcataa caaactttat ttgactgatt gcctccaagg cataactaact ttccagactt 180
tttgtcacgg ccaactacaa aacaaacatg cccaccaccc tttcgagttt taatagctac 240
acaaccgtaa gcgggttttag ctaattttgt accataattc acataatcca atgcacggtg 300
ccaatgctta ggataagcaa ttccagctga tttcaagcaa tgtgcaacga aggtcccaca 360
ccaagccgtt tcatcgtcag cccaccaagc ctttagctcc gagagccatt ttaaaatagt 420
tggtgttatgc tgtttaccag gtatttcttg aaggccaaga tgcttttttg cttctgcaat 480
ccaagctaatt tcatcaggct ttgttgggtg tgggatattc aataaagaat tgatccctac 540
taactggcct gttaattgag ggccattaag tcgtgggtga gaaattttct ttccaatcca 600
tgacagaaca agcatcaaag taccagtaac aaatgcatga tatttttcag gaataacttc 660
ataatcaaca cccattgta gtgctggcaa taaaattagc atgatgaatg cacctacggc 720
gggtaactta acagatagat actgccaagc attgttttca attaacttca t 771

<210> 30

<211> 771

<212> ADN

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 30

ttaggcttcc aaaaccctag tagctgttac gccttttaaat tgtggcaatg tataacgctt 60
 acctgctggt tgagttgtac gaccatacca tctgaattct tgaaagtcag agtcattata 120
 aagtgcataa caaactttat ttgactgatt gcctccaagg cataactaact ttccagactt 180
 tttgtcacgg ccaactacaa aacaaacatg cccaccaccc tttcgagttt taatagctac 240
 acaaccgtaa gcgggttttag ctaattttgt accataattc acataatcca atgcacggtg 300
 ccaatgctta ggataagcaa ttccagctga tttcaagcaa tgtgcaacga aggtcccaca 360
 ccaagccggt tcatcgtcag cccaccaagc ctttagctcc gagagccatt ttaaaatagt 420
 tgggttatgc tgtttaccag gtattttcttg aaggccaaga tgcttttttg cttctgcaat 480
 ccaagctaatt tcatcaggct ttgttggtgt tgggatattc aataaagaat tgatccctac 540
 taactggcct gttaattgog ggccattaag tcgtgggtga gaaattttct ttccaatcca 600
 tgacagaaca agcatcaaag taccagtaac aaatgcatga tgtttttcag gaataacttc 660
 ataatcaaca cccattgta gtgctggcaa taaaattagc atgatgaatg cacctacggc 720
 gggtaactta acagatagat actgccaagc attgttttca attaacttca t 771

<210> 31
 <211> 771
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

<400> 31

atgaagttaa ttgaaaacaa tgcttggcag tatctatctg tcaagttacc cgccgtaggt 60
 gcattcatca tgctaatttt attgccagca ctacaatggg gtgttgatta tgaagttatt 120
 cctgaaaaat atcatgcatt tgttactggt actttgatgc ttgttctgtc atggattgga 180
 aagaaaattt ctcaaccacg acttaatggc ccgcaattaa caggccagtt agtagggatc 240
 aattctttat tgaatatccc aacaccaaca aagcctgatg aattagcttg gattgcagaa 300
 gcaaaaaagc atcttggcct tcaagaaata cctggtaaac agcataaccc aactatttta 360
 aaatggctct cggagctaaa ggcttgggtg gctgacgatg aaacggcttg gtgtgggacc 420
 ttcgttgacac attgcttgaa atcagctgga attgcttatc ctaagcattg gtaccgtgca 480
 ttggattatg tgaattatgg tacaaaatta gctaaacccg cttacggttg ttagctatt 540
 aaaactcgaa aggggtggtg gcatgtttgt tttgtagttg gccgtgacaa aaagtctgga 600
 aagttagtat gccttggagg caatcagtca aataaagttt gttatgcact ttataatgac 660
 tctgactttc aagaattcag atggtatggt cgtacaactc aaccagcaag taagcgttat 720
 acattgccac aattaaaagg cgtaacagct actagggttt tggaagccta a 771

<210> 32

<211> 747
<212> ADN
<213> Acinetobacter baumannii

5 <400> 32

ctggatccgg	tgatgacgat	gacaagctcg	cccttccaca	actcgagccg	aattttattg	60
ccagcactac	aatgggggtgt	tgattatgaa	gttattcctg	aaaaatatca	tgcatTTgtt	120
actggTactt	tgatgcttgt	tctgtcatgg	attggaaaga	aaatttctca	accacgactt	180
aatggccccg	aattaacagg	ccagttagta	gggatcaatt	ctttattgaa	tatcccaaca	240
ccaacaaagc	ctgatgaatt	agcttggatt	gcagaagcaa	aaaagcatct	tggccttcaa	300
gaaatacctg	gtaaacagca	taacccaact	attttaaaat	ggctctcgga	gctaaaggct	360
tggtgggctg	acgatgaaac	ggcttgggtgt	gggaccttcg	ttgcacattg	cttgaaatca	420
gctggaattg	cttattctaa	gcattggtac	cgtgcattgg	attatgtgaa	ttatggtaca	480
aaattagcta	aaccgcctta	cggtttgtgt	gctattaaaa	ctcgaaaggg	tggtgggcgt	540
gtttgttttg	tagttggccg	tgacaaaaag	tctggaaagt	tagtatgcct	tggaggcaat	600
cagtcaaata	aagtttgTTa	tgcactttat	aatgactctg	actttcaaga	attcagatgg	660
tatggTcgta	caactcaacc	agcaagtaag	cgttatacat	tgccacaatt	aaaaggcgta	720
acagctacta	gggttttTga	agcctaa				747

<210> 33
<211> 543
<212> ADN
<213> Acinetobacter baumannii

10 <400> 33

15

ctagccgatc	cggttagcga	tccagccata	aaaaaactgc	tcttggcttt	tattacgttc	60
acagatttca	atgtatcggt	ggccttgcat	aatatttaac	acgcgcacta	agaccttttc	120
gccttctttg	ccacgttttg	ccaagtaagt	ttttagagct	cctaaagtgt	tagaaccata	180
aacgccatca	accttcaagt	ctgcataacc	agctttacct	tgattgttaa	gcaagttcaa	240
agcacgttgt	aaaagtgggt	ttgcaaagtt	gataccacag	ttcacaccag	tgtctaaaag	300
ttcttcagct	actgcagagc	taagagtatt	aacctgatca	aaacgtggct	ctatccagta	360
ctgtttccga	taaattgctt	tggccacatc	aagaggcaaa	tctttcatat	tgcccttata	420
gccgttttca	cgtgctacag	cttcagtaat	accgtatttg	gtagcacctc	ctcgatctac	480
tggattattt	acataaccgc	ctacgcgttt	aatcaaatca	tcaagatatt	gttcaatttt	540
cat						543

<210> 34
<211> 543
<212> ADN
<213> Acinetobacter baumannii

20

ES 2 767 294 T3

<400> 34

atgaaaattg aacaatatct tgatgatttg attaaacgcg aaggcgggta tgtaaataat	60
ccagtggatc gaggaggtgc taccaaatac ggtattactg aagctgtagc acgtgaaaac	120
ggctataagg gcaatatgaa agatttgcct cttgatgtgg ccaaagcaat ttatcggaaa	180
cagtactgga tagagccacg ttttgatcag gttaatactc ttagctctgc agtagctgaa	240
gaacttttag aactgggtgt gaactgtggt atcaactttg caaaaccact tttacaacgt	300
gctttgaact tgcttaacaa tcaaggtaaa gctgggttatg cagacttgaa ggttgatggc	360
gtttatgggt ctaacacttt aggagctcta aaaacttact tggccaaacg tggcaaagaa	420
ggcgaaaagg tatttagtgcg cgtgttaaatt attatgcaag gccaacgata cattgaaatc	480
tgtgaacgta ataaaagcca agagcagttt ttttatggct ggatcgctaa ccggatcggc	540
tag	543

5

<210> 35
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

10

<400> 35

atgaaaattg aacaatatct tgatgatttg attaaacgcg aagggtggta tgtaaataat	60
ccagtagatc gaggaggtgc taccaaatac ggtattactg aagctgtagc acgtgaaaac	120
ggctataagg gcaatatgaa agatttgcct cttgatgtgg ccaaagcaat ttatcggaaa	180
cagtactgga tagagccacg ttttgatcag gttaatactc ttagctctgc agtagctgaa	240
gaacttttag aactgggtgt gaactgtggt atcaactttg caaaaccact tttacaacgt	300
gctttgaact tgcttaacaa tcaaggtaaa gctgggttatg cagacttgaa ggttgatggc	360
gtttatgggt ctaacacttt aggagctcta aaaacttact tggccaaacg tggcaaagaa	420
ggcgaaaagg tcttagtgcg cgtgttaaatt attatgcaag gccaacgata cattgaaatc	480
tgtgaacgta ataaaagcca agagcagttt ttttatggct ggatcgctaa ccggatcggc	540
tag	543

15

<210> 36
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

20

<400> 36

ctagccgatc cggttagcaa tccagccata gaagaattgc tcttgcttgg gattacgctc 60
 acaaatttcg atatatcgct ggccttgcat gatattaaga actcgacta ggactttctc 120
 accttctttc ccacgtttgg ccaagtaagt tttgagagct cctaattgtgc tagaaccata 180
 aacgccatca accttcaagt ctgcataacc agctttacct tgattgttaa gcaagttcaa 240
 agcacgttgt aaaagtgggt ttgcaaagtt gataccacag ttcacaccag tgtctaaaag 300
 ttcttcagct actgcagagc taagagtatt aacctgatca aaacgtggct ctatccagta 360
 ctgtttccga taaattgctt tggccacatc aagaggcaaa tctttcatat tggccttata 420
 gccgttttca cgtgctacag cttcagtaat accgtatttg gtagcacctc ctcgatctac 480
 tggattatth acataaccgc cttcgcgttt aatcaaatca tcaagatatt gttcaattht 540
 cat 543

5 <210> 37
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

10 <400> 37

tcactgcacc gccatacact tgctataaca atcttggttg cgtgtccaga caccataaca 60
 accattggac cgaatcgagc aatcacgctt tgcaacatat ttgtatttca gtaatgaagc 120
 acaagcttgc ttatattgcc ctgctttgag attacgaagc attgatgagc cgttccaatt 180
 tgcttggcca tagttgtaaa caaagtctaa gtacacatca tattcagtct gagttagcct 240
 cacgccctgc aacgacttgc gaaatgccac ctcatcttta gcaatgtgag ctttggcaat 300
 ttgaacagca cgttcttttg taatcggtt gtcagtcatt ttgaccttg taccgttttc 360
 ataggaagtg gatccgatac caatcgttgc cacttttagcg ctatctaaat atggctttga 420
 tttgtacccc tcatagccaa ttaaagatgc aaaaaaagc gctgatgcgc ttaatgttgt 480
 tactatgatt ttagtcttgt ttgacat 507

15 <210> 38
 <211> 507
 <212> ADN
 <213> Acinetobacter baumannii

20 <400> 38

atgtcaaaca agactaaaat catagtaaca acattaagcg catcagcgct tttttttgca 60
 tctttaattg gctatgaggg gtacaaatca aagccatatt tagatagcgc taaagtggca 120
 acgattggta tcggatccac ttcttatgaa aacggtacca aggtcaaaat gactgacaag 180
 ccgattacaa aagaacgtgc tgttcaaatt gccaaagctc acattgctaa agatgaggtg 240

	gcatttcgca agtcggttgca gggcgtgagg ctaactcaga ctgaatatga tgtgtactta	300
	gactttgttt acaactatgg ccaagcaa at tggaacggct catcaatgct tcgtaatctc	360
	aaagcagggc aatataagca agcttgtgct tcattactga aatacaaata tgttgcaaag	420
	cgtgattgct cgattcggct caatgggtgt tatgggtgtct ggacacgcca acaagatcgt	480
	tatagcaagt gtatggcggt gcaatga	507
5	<210> 39 <211> 543 <212> ADN <213> Acinetobacter baumannii	
	<400> 39	
10	ctagccgata cggtttagcaa tccagccata gaagaattgc tcttgcttag gattacgctc	60
	acaaatttcg atatatcgct ggccttgcat gatattaaga actcgacta ggactttctc	120
	accttctttc ccacgtttgg ccaagtaagt tttgagagct cctaattgtgc tagaaccata	180
	aacgccatca accttcaagt ctgcataacc agctttacct tgattgttaa gcaagttcaa	240
	agcacgttgt aaaagtgggt ttgcaaagtt gataccacag ttcacaccag tgtctaaaag	300
	ttcttcagct actgcagagc taagagtatt aacctgatca aaacgtggct ctatccagta	360
	ctgtttccga taaattgctt tggccacatc aagaggcaaa tctttcatat tgcccttata	420
	gccgttttca cgtgctacag cttcagtaat accgtatttg gtagcacctc ctcgatctac	480
	tggattattt acataaccgc cttcgcgttt aatcaaatca tcaagatatt gttcaatttt	540
	cat	543
15	<210> 40 <211> 636 <212> ADN <213> Acinetobacter baumannii	
20	<400> 40	
	ctagccgata cggtttagcga tccagccata aaaaaactgc tcttggtttt tattacgttc	60
	acagatttca atgtatcggt ggccttgcat aatatttaac acgcgcacta agaccttttc	120
	gccttctttg ccacgtttgg ccaagtaagt ttttagagct cctaaagtgt tagaaccata	180
	aacgccatca accttcaagt ctgcataacc agctttacct tgattgttaa gcaagttcaa	240
	agcacgttgt aaaagtgggt ttgcaaagtt gataccacag ttcacaccag tgtctaaaag	300
	ttcttcagct actgcagagc taagagtatt aacctgatca aaacgtggct ctatccagta	360
	ctgtttccga taaattgctt tggccacatc aagaggcaaa tctttcatat tgcccttata	420
	gccgttttca cgtgctacag cttcagtaat accgtatttg gtagcacctc ctcgatctac	480

ES 2 767 294 T3

	tggattat	ttt	acataaccgc	cttcgcgttt	aatcaaatca	tcaagatatt	gttcaat	ttt	540
	catttcactt	tccttttagac	gtaaaaaagc	caccagttga	tccgtgaact	tgatatttat			600
	attgatccag	aagtgcaggc	tgagggtttt	ggtcag					636
	<210> 41								
	<211> 543								
5	<212> ADN								
	<213> Acinetobacter baumannii								
	<400> 41								
	atgaaaattg	aacaatatct	tgatgatttg	attaaacgcg	aaggcgggta	tgtaaataat			60
	ccagtagatc	gaggaggtgc	taccaaatac	ggattactg	aagctgtagc	acgtgaaaac			120
	ggctataagg	gcaatatgaa	agatttgcc	cttgatgtgg	ccaaagcaat	ttatcggaaa			180
	cagtactgga	tagagccacg	ttttgatcag	gttaatactc	ttagctctgc	agtagctgaa			240
	gaacttttag	acactggtgt	gaactgtggt	atcaactttg	caaaaccact	tttacaacgt			300
	gctttgaact	tgcttaacaa	tcaaggtaaa	gctgggtata	cagacttgaa	ggttgatggc			360
	gtttatgggt	ctagcacatt	aggagctctc	aaaacttact	tggccaaacg	tgggaaagaa			420
	ggtgagaaag	tcctagtgcg	agttcttaat	atcatgcaag	gccagcgata	tatcgaaatt			480
	tgtgagcgta	atcctaagca	agagcaattc	ttctatggct	ggattgctaa	ccggatcggc			540
10	tag								543
	<210> 42								
	<211> 441								
	<212> ADN								
15	<213> Acinetobacter baumannii								
	<400> 42								
	tcatttttaa	aataactcca	tttcagcttt	gcgacgtttc	accagtcctg	ccaatacacg			60
	accgccagct	ttgttccatt	ttgggaattc	tgctgctgca	cctttatagt	ccttagcatt			120
	taactttttt	agcaaagtag	atttgctaag	attgccttcg	cctaagttat	aagtgaatga			180
	ggccaaagca	tcgaattggt	tttgattaag	tggtactttc	accaagcgat	tgatagcatt			240
	ttcaaagtgc	accaagtcac	tgcgaaagata	tccttctgct	tgagactcag	tgcatatatc			300
	gccttttttg	acacgcactc	cattaggata	tttaattggt	ccaaatccaa	tggtccaaac			360
	gcccacacca	tcgtcatagg	ctttcaaacg	tttaccttca	aagcctttga	ttagattgat			420
20	tcctgagtta	cttggttttca	t						441
	<210> 43								
	<211> 31								
	<212> PRT								
25	<213> Acinetobacter baumannii								

<400> 43

Asn Ala Lys Asp Tyr Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn
1 5 10 15

Lys Ala Gly Gly Arg Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys
20 25 30

5 <210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Ex

<400> 44

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
1 5

15 <210> 45
<211> 39
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> P307Ex

25 <400> 45

Asn Ala Lys Asp Tyr Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn
1 5 10 15

Lys Ala Gly Gly Arg Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys Ser
20 25 30

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Cys
35

30 <210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 46

Ala Ala Thr Thr Cys Gly Gly Cys Thr Cys Gly Ala Gly
1 5 10

40 <210> 47
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador

<400> 47

Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Thr Cys Gly Ala Gly Cys Cys Gly Ala
1 5 10 15

Ala Thr Thr

5 <210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Extensión Peptídica

<400> 48

Ala Glu Met Leu Phe Leu Lys
1 5

15 <210> 49
<211> 39
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> P307AE-8

25 <400> 49

Asn Ala Lys Asp Tyr Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn
1 5 10 15

Lys Ala Gly Gly Arg Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys Ala
20 25 30

Glu Met Glu Leu Phe Leu Lys
35

30 <210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Extensión Peptídica

<400> 50

Cys Ser Gln Arg Gln Ser Glu Ser
1 5

40 <210> 51
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> P307CS-8

<400> 51

ES 2 767 294 T3

Asn Ala Lys Asp Tyr Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn
1 5 10 15

Lys Ala Gly Gly Arg Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys Cys
20 25 30

Ser Gln Arg Gln Ser Glu Ser
35

5 <210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Extensión Peptídica

<400> 52

Ser Gln Ser Arg Glu Ser Gln Ala
1 5

15 <210> 53
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> P307SQ-8A

<400> 53

25 Asn Ala Lys Asp Tyr Lys Gly Ala Ala Ala Glu Phe Pro Lys Trp Asn
1 5 10 15

Lys Ala Gly Gly Arg Val Leu Ala Gly Leu Val Lys Arg Arg Lys Ser
20 25 30

Gln Ser Arg Glu Ser Gln Ala
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.
- 10 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o un fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido o fragmento tiene actividad antibacteriana.
- 15 3. Un polipéptido conjugado que comprende: el polipéptido o fragmento de la reivindicación 1; y un péptido antimicrobiano conjugado con el polipéptido o el fragmento del polipéptido, en el que el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana.
- 20 4. El polipéptido conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el péptido antimicrobiano comprende los ocho aminoácidos C, S, Q, R, S, E y S en cualquier orden.
- 25 5. El polipéptido conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el péptido antimicrobiano tiene la secuencia de aminoácidos SQSRESQC (SEQ ID NO:44) o CSQRQSES (SEQ ID NO:50).
- 30 6. El polipéptido conjugado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el polipéptido conjugado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:45 o SEQ ID NO:51.
- 35 7. El polipéptido conjugado de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que el extremo C del polipéptido o fragmento está conjugado con el péptido antimicrobiano o en el que el extremo N del polipéptido o fragmento está conjugado con el péptido antimicrobiano.
- 40 8. El polipéptido conjugado de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana contra una bacteria gramnegativa o en el que el polipéptido conjugado tiene actividad antibacteriana contra una bacteria grampositiva.
- 45 9. Una composición que comprende uno o más polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 50 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una infección bacteriana.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 9 y un transportador, agente tamponante o conservante farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de una herida quirúrgica irrigando la herida quirúrgica con la composición.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la herida quirúrgica se irriga antes del cierre quirúrgico de la herida.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en la inhibición de la formación de o en la alteración de una biopelícula bacteriana en una cantidad eficaz para destruir bacterias en la biopelícula.
14. Método para inhibir la formación de o alterar una biopelícula bacteriana sobre un artículo que comprende poner en contacto el artículo con la composición de la reivindicación 9 en una cantidad eficaz para destruir bacterias en la biopelícula.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el artículo es una encimera, teclado, instrumento quirúrgico o dispositivo médico.

FIG. 1A

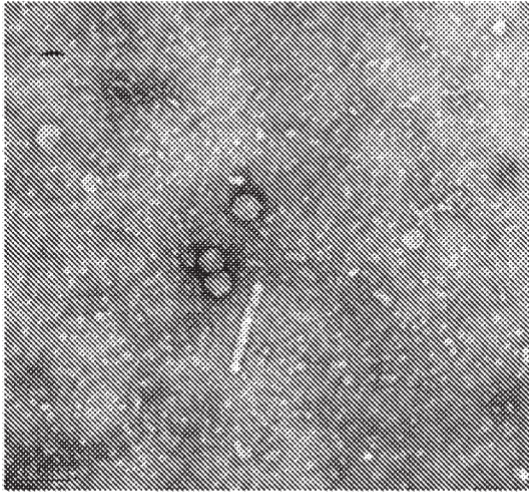


FIG. 1B

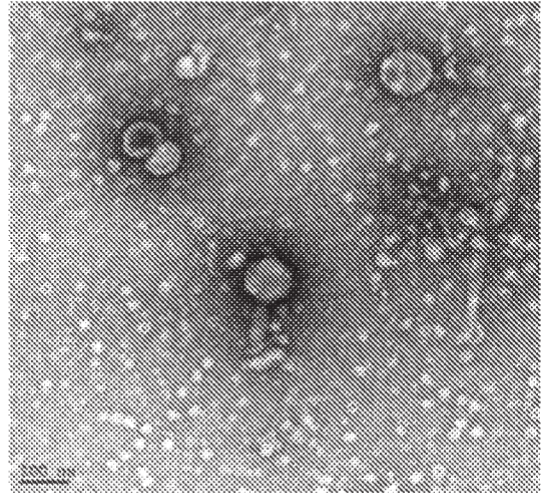


FIG. 1C

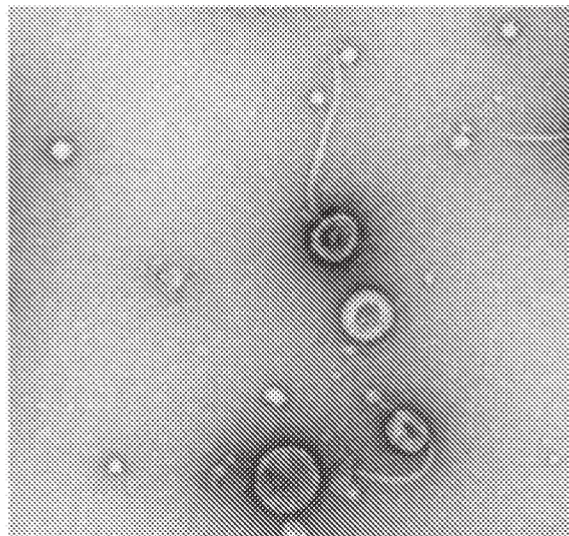


FIG. 2

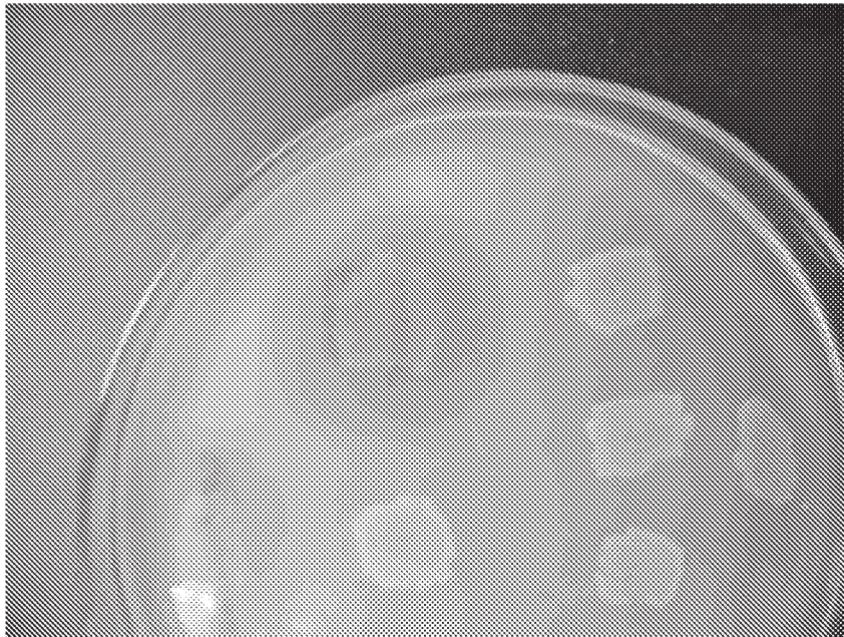
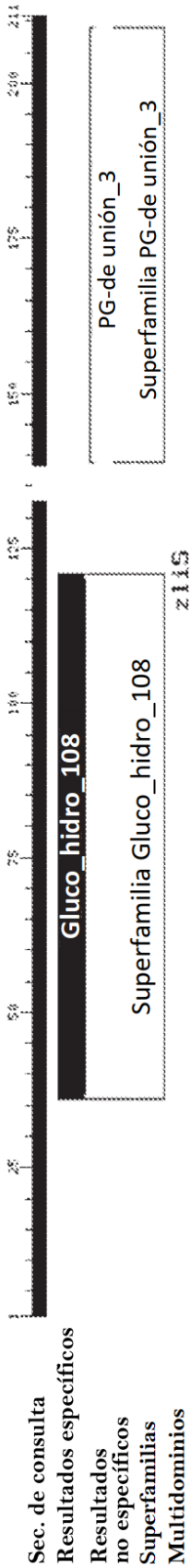


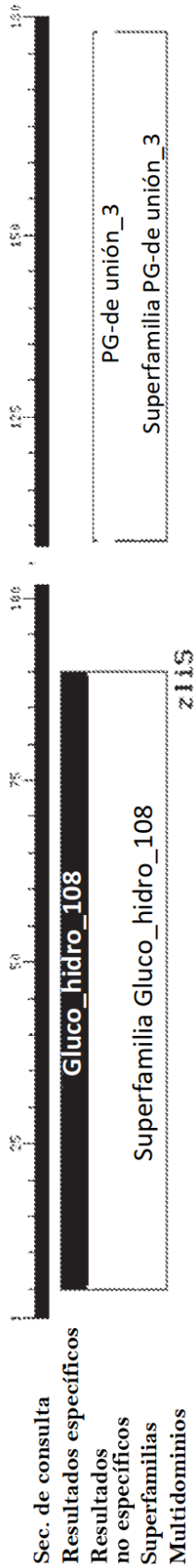
FIG. 3

(I) Familia de la Glucosil hidrolasa (número 9)

Lisina F301



Lisina F303



Lisina F309

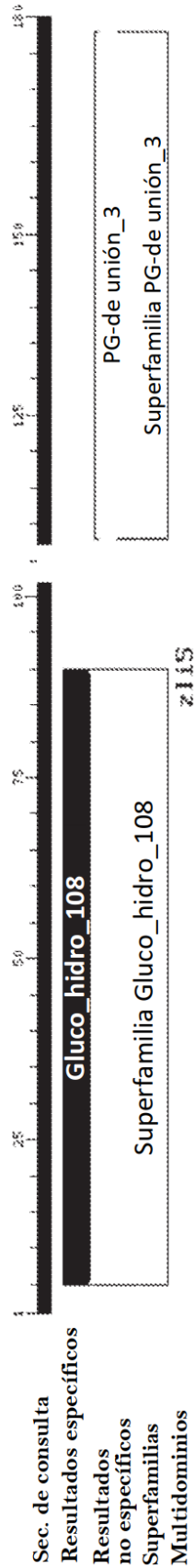


FIG. 3 Cont.

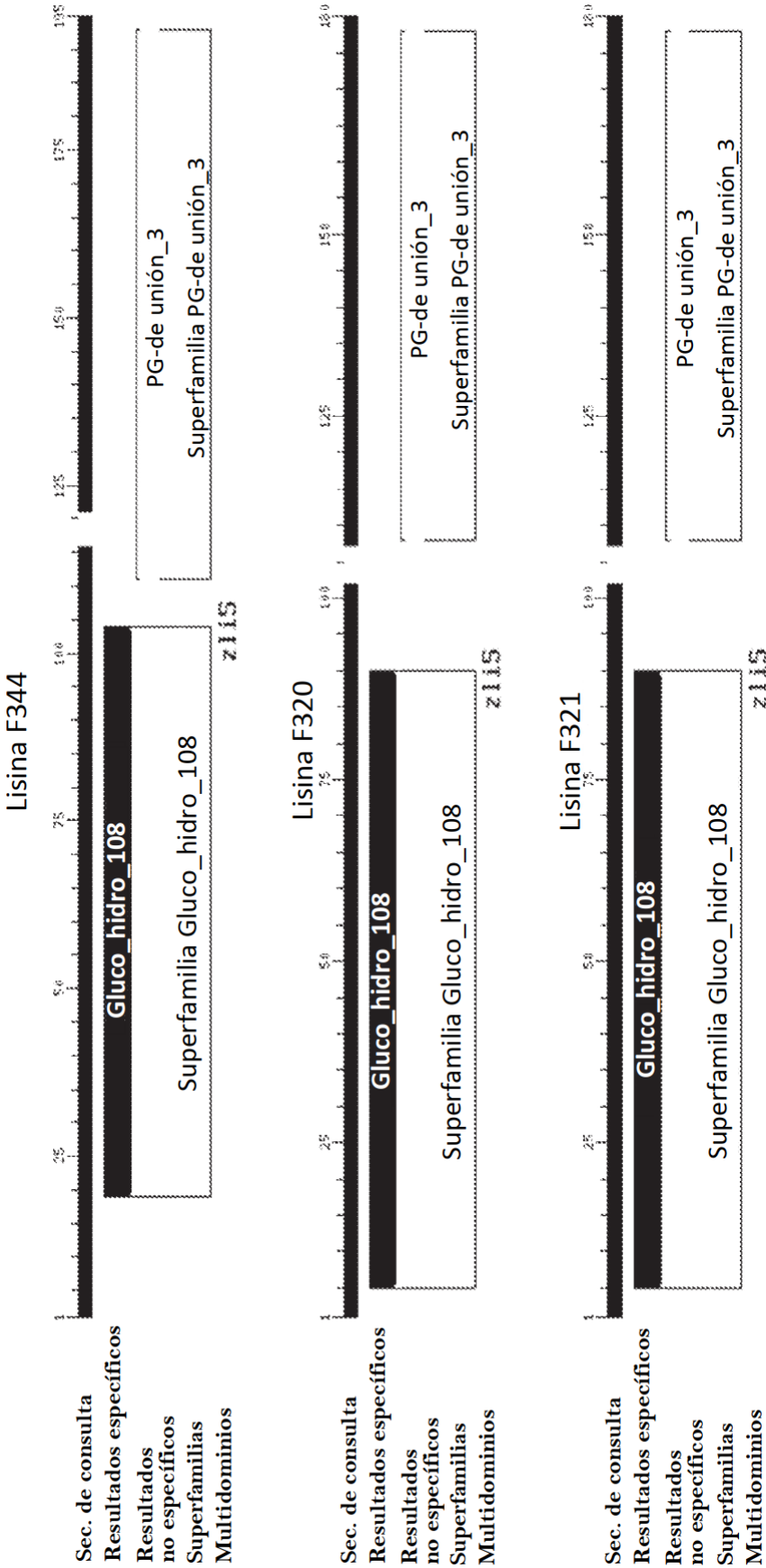


FIG. 3 Cont.

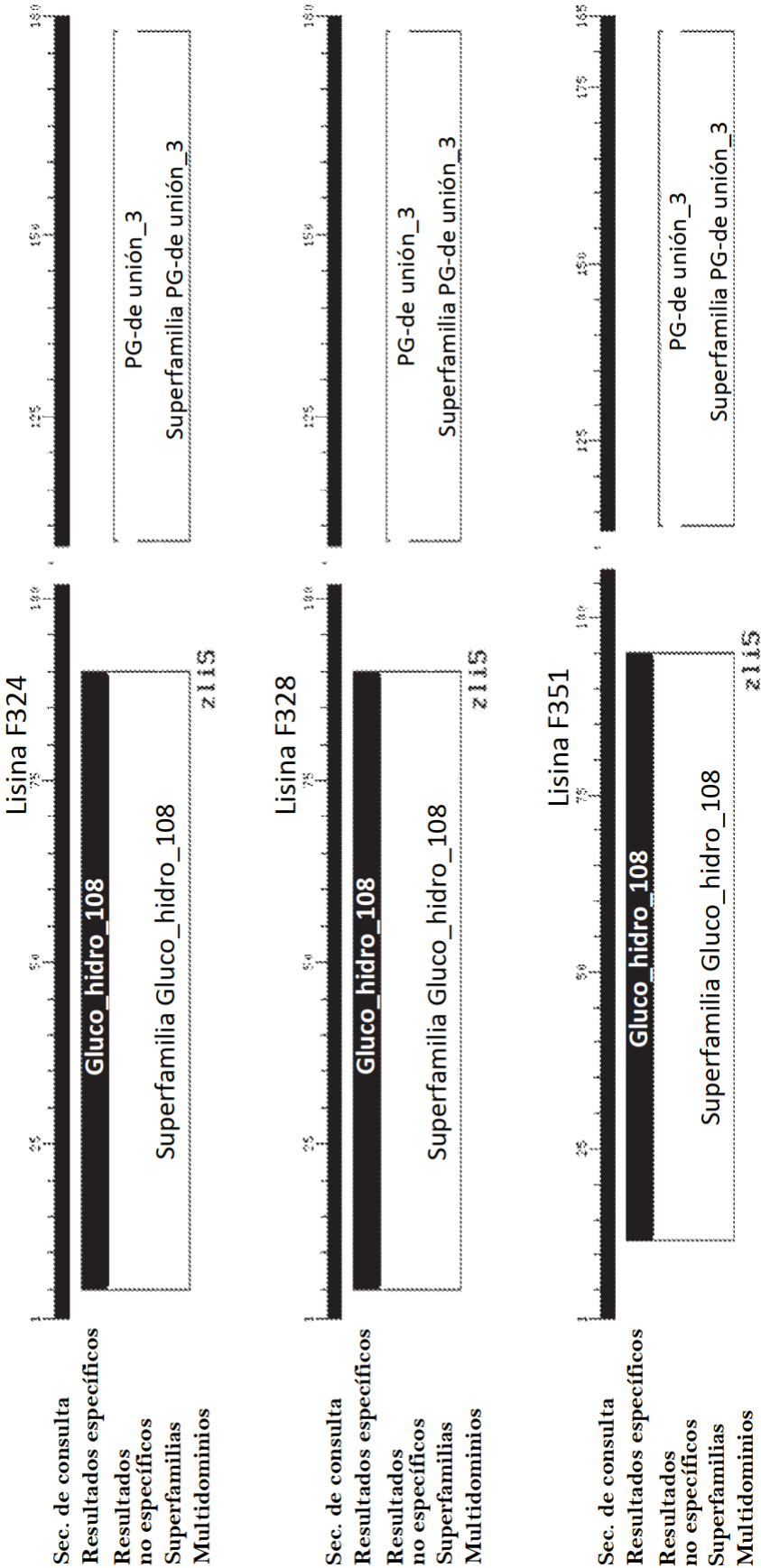


FIG. 3 Cont.

(II) Lisozima de placa base (número 7)

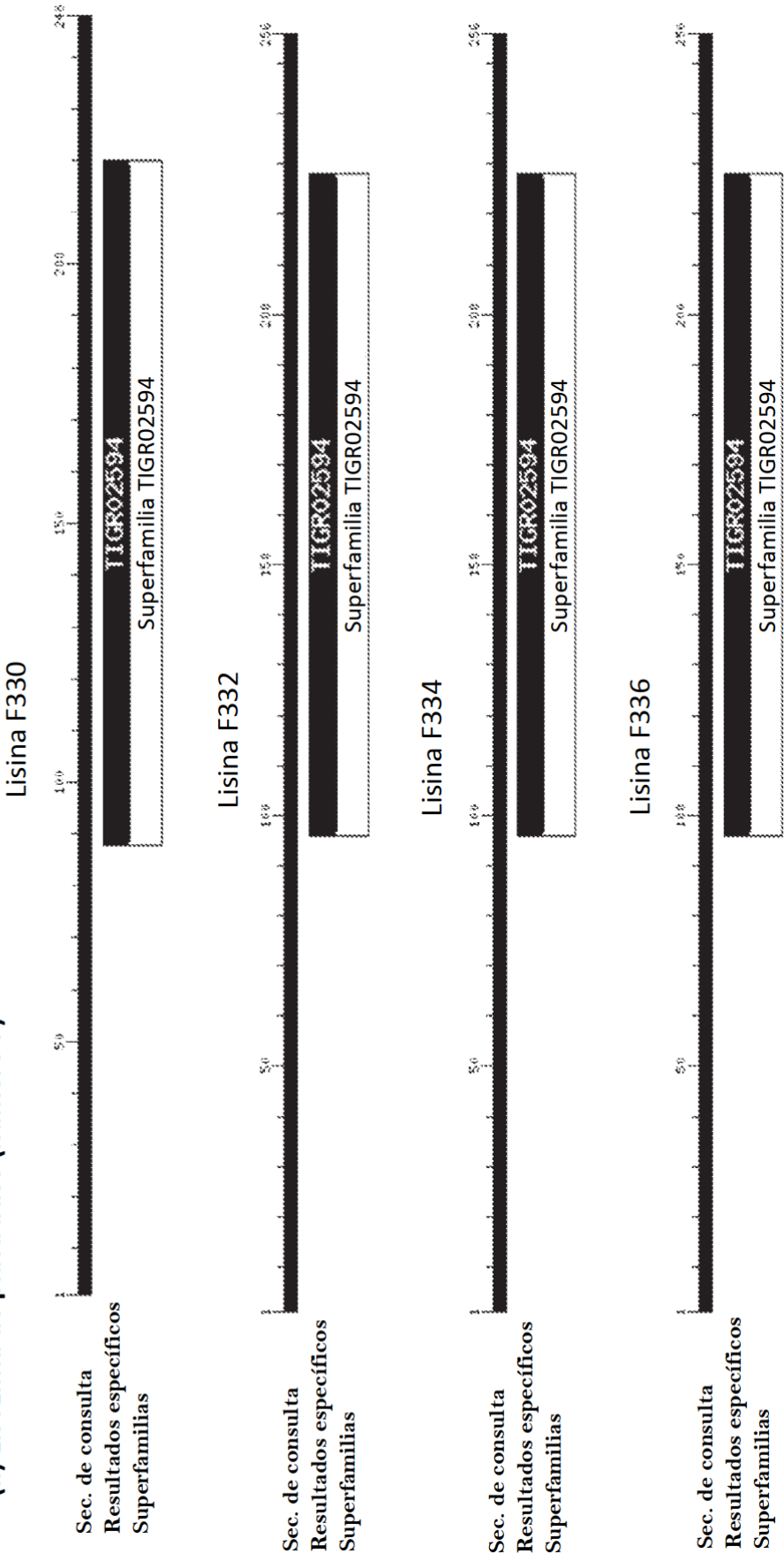
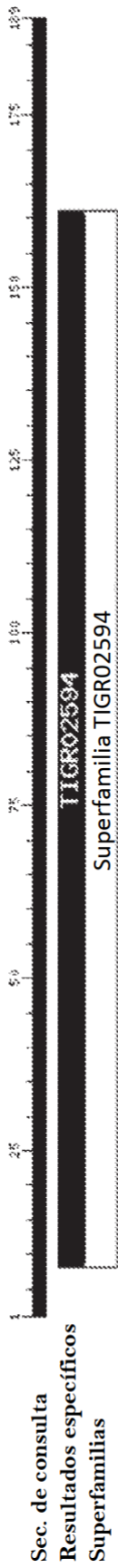


FIG. 3 Cont.

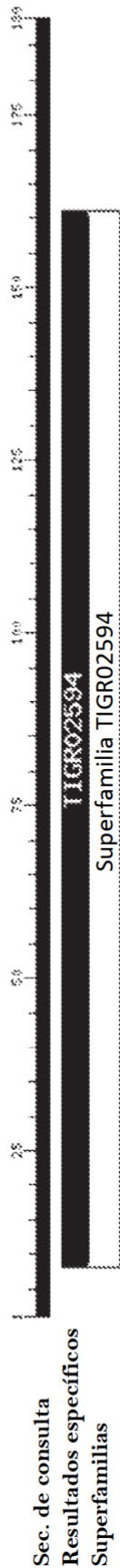
Lisina F338



Lisina F340



Lisina F376



(III) Lisozima Autolisina (número 2)

Lisina F307

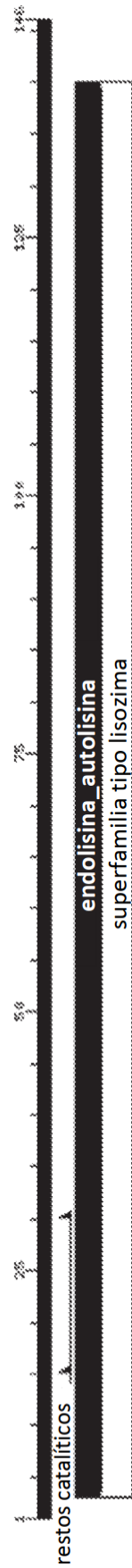
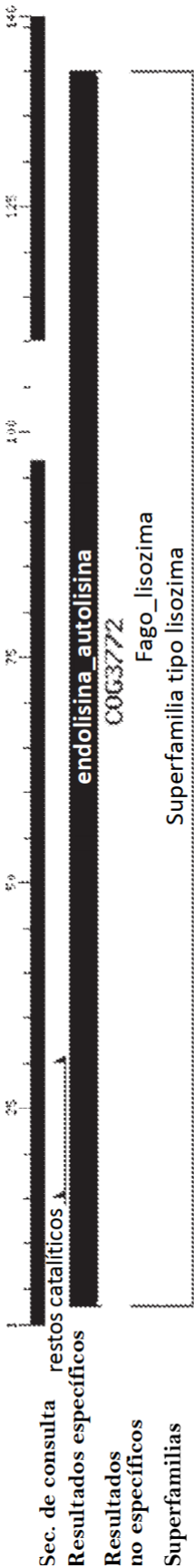
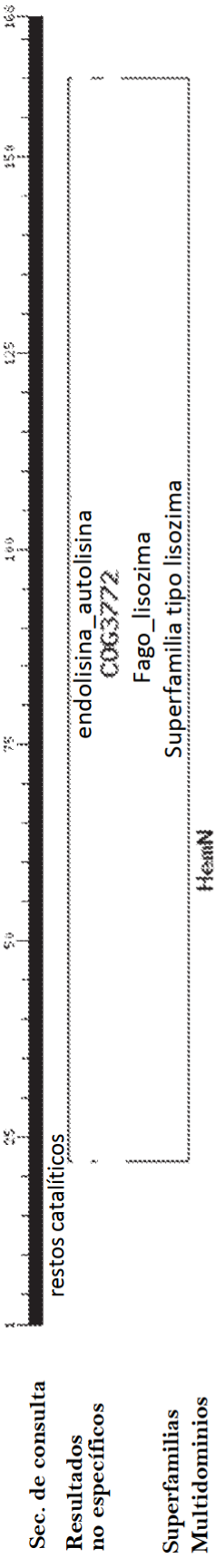


FIG. 3 Cont.

Lisina F311



Lisina F306



Lisina F315

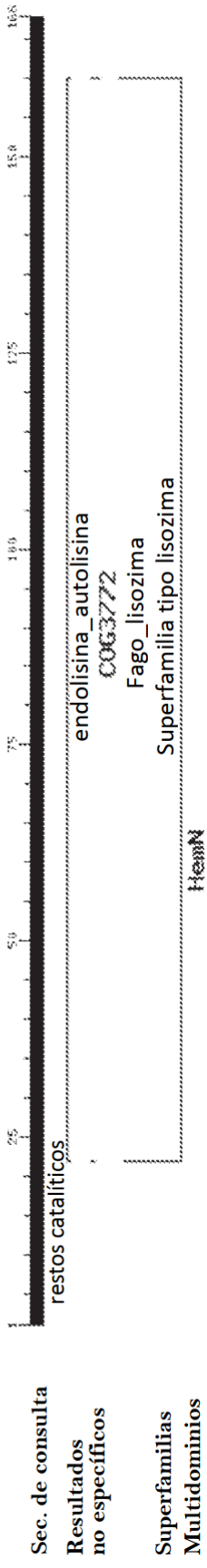


FIG. 3 Cont.

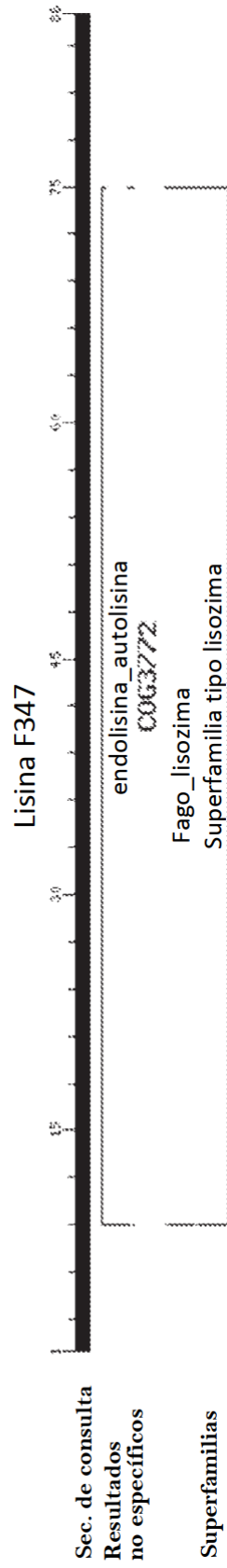


FIG. 4

Alineación de secuencias múltiple ClustalW (v1.83)

21 Secuencias Alineadas Tiempo de procesamiento: 1,8 segundos
 Huecos insertados = 540 Identidades Conservadas = 1
 Puntuación = 0

Modo de alineación por pares: Lento

Parámetros de alineación por pares:

Penalización por Apertura Penalización por Extensión
 de Hueco = 10,0 de Hueco = 5,0

Parámetros de Alineación Múltiple:

Penalización por Apertura Penalización por Extensión
 de Hueco = 10,0 de Hueco = 5,0

Retraso Divergente = 40% Transiciones: Ponderadas

F376	1	-----	0
F311	1	-----	0
F328	1	-----	0
F324	1	-----	0
F347	1	-----	0
F351	1	-----	0
F344	1	-----	0
F340	1	-----	0
F338	1	ATGAAGTTAATTGAAAACAATGCTTGGCAGTATCTATCTGTAAAGTTACCCGCCGTAGGT	60
F336	1	-----	0
F334	1	-----	0
F332	1	ATGAAGTTAATTGAAAACAATGCTTGGCAGTATCTATCTGTCAAGTTACCCGCCGTAGGT	60
F330	1	-----CTGGATCCGGTGATGACGAT--GACAAG---CTCGCCCT---T	35
F307	1	-----	0
F309	1	-----	0
F303	1	-----	0
F301	1	-----	0
F320	1	-----	0
F306	1	-----	0
F321	1	-----	0
F315	1	-----	0
F376	1	-----	0
F311	1	-----	0

FIG. 4 Cont.

F328	1	-----	0
F324	1	-----	0
F347	1	-----	0
F351	1	-----C	1
F344	1	-----	0
F340	1	-----	0
F338	61	GCATTCATCATGCT-AATTTTATTGCCAGCACTACAATGGGGTGTTGATTATGAAGTTAT	119
F336	1	-----	0
F334	1	-----	0
F332	61	GCATTCATCATGCT-AATTTTATTGCCAGCACTACAATGGGGTGTTGATTATGAAGTTAT	119
F330	36	CCACAACCTCGAGCCGAATTTTATTGCCAGCACTACAATGGGGTGTTGATTATGAAGTTAT	95
F307	1	-----	0
F309	1	-----	0
F303	1	-----	0
F301	1	-----	0
F320	1	-----	0
F306	1	-----	0
F321	1	-----	0
F315	1	-----	0
F376	1	-----TTAAGCCTCTGAAACACTCGTAACAGA	27
F311	1	-----	0
F328	1	-----CTAGCCGAT	9
F324	1	-----ATGAAAAT-TGAACAATATCTTGATGATT-----TGATTAAACGC	39
F347	1	-----TCACTGC	7
F351	2	TGAAGGAAACCGAAATGAATAT-TGAAAAATATCTTGATGAAT-----TAATTAAGCGT	54
F344	1	-----TCATATAAC-AAC	12
F340	1	-----TTAAGCCTCTGAAACACTCGTAACAGA	27
F338	120	TCCTGAAAAATATCATGCATTTGTTACTGGTACTTTGATGCTTGTTCTGTCATGGATTGG	179
F336	1	-----TTAGGCTTCCAAAACCTAGTAGCTGT	27
F334	1	-----TTAGGCTTCCAAAACCTAGTAGCTGT	27
F332	120	TCCTGAAAAATATCATGCATTTGTTACTGGTACTTTGATGCTTGTTCTGTCATGGATTGG	179
F330	96	TCCTGAAAAATATCATGCATTTGTTACTGGTACTTTGATGCTTGTTCTGTCATGGATTGG	155
F307	1	-----GT	2
F309	1	-----ATGAAAAT-TGAACAATATCTTGATGATT-----TGATTAAACGC	39
F303	1	-----CTAGCCGAT	9
F301	1	-----CTAGCCGAT	9
F320	1	-----CTAGCCGAT	9

FIG. 4 Cont.

F306	1	-----ATGTCAAACAAGACTAAAATCATAGT	26
F321	1	-----ATGAAAAT-TGAACAATATCTTGATGATT-----TGATTAAACGC	39
F315	1	-----TCACTGC	7
F376	28	AACGATTTTTAGGACTGGTAAATCGTATCGGTGAGCAG---CTGGTTTACTTGTTTTGCC	84
F311	1	-----TCAT-TTTAA-AAA	12
F328	10	CCGGTTAGCGATCCAGCCATAAAAAAACTGCTCTTGGC---TTTTATTACGTTTAC-AGA	65
F324	40	GAAGGCGGTTATGTAA--ATAATCCAGTGGATCGAGG---AGGTGCTACCAAATAC-GGT	93
F347	8	GCTCCTATACATTT-----TGCGTGTCTGTT--CTAC---TTGTCTGGTCCAGAC-GCC	54
F351	55	GAAGGCGGGTATGTAA--ATAACCCAGCTGATCGGGG---CGGTGCAACTAAATAT-GGC	108
F344	13	TCGATTGGCGATCCAACCATAGAAAAAACTGTTCTTGCC---TAGGATTGCGTTTAC-AGA	68
F340	28	AACGATTTTTAGGACTGGTAAATCGTATCGGTGAGCAG---CTGGTTTACTTGTTTTGCC	84
F338	180	AAAGAAAATTTCTCAACCACGACTTAATGGCCCGCAATTAACAGGCCAGTTAGTA-GGG	237
F336	28	TACGCTTTTAAATTGTGGCAATGTATAACGCTTACTTG---CTGGTTGAGTTGTACGACC	84
F334	28	TACGCTTTTAAATTGTGGCAATGTATAACGCTTACCTG---CTGGTTGAGTTGTACGACC	84
F332	180	AAAGAAAATTTCTCAACCACGACTTAATGGCCCGCAATTAACAGGCCAGTTAGTA-GGG	237
F330	156	AAAGAAAATTTCTCAACCACGACTTAATGGCCCGCAATTAACAGGCCAGTTAGTA-GGG	213
F307	3	GAAAACAAGTAACCCA--GGAGTGGATTTAATCAAA-----GGCTTTGAA-GGT	48
F309	40	GAAGGCGGTTATGTAA--ATAATCCAGTAGATCGAGG---AGGTGCTACCAAATAC-GGT	93
F303	10	CCGGTTAGCAATCCAGCCATAGAAGAATTGCTCTTGCT---TAGGATTACGCTCAC-AAA	65
F301	10	CCGGTTAGCGATCCAGCCATAAAAAAACTGCTCTTGCC---TTTTATTACGTTTAC-AGA	65
F320	10	CCGGTTAGCAATCCAGCCATAGAAGAATTGCTCTTGCT---TGGGATTACGCTCAC-AAA	65
F306	27	AACAACATTAAGCGCA--TCAGCGCTTTTTTTTGCATC--TTTAATTGGCTATGAG-GGG	81
F321	40	GAAGGTGGTTATGTAA--ATAATCCAGTAGATCGAGG---AGGTGCTACCAAATAC-GGT	93
F315	8	ACCGCCATACACTT-----GCTATAACAAT--CTTG---TTGGCGTGTCCAGAC-ACC	54
F376	85	ATACCACATAAAGGCTTCAAAAGCCGAAACGTCATATACTGCAAAACAACTT-TATTTG	143
F311	13	T----AACTCCATTTTACGCTTTGCGACGT-TTACCAGTCCTGC-CAATACACGACCGCC	66
F328	66	TTT-CAATGTATCGTTGGCCTTGCATAATATTTAACACGCGCAC-TAAGACCTTTTCGCC	123
F324	94	AT--TACTGAAGCTGTAGCACGTGAAAACGGCTATAAGGGCAAT-ATGAA-AGATTTGC	148
F347	55	ATAACACCCGTTTTTACGAA---CAGAGCAATCGCGCTTTGCA-ACGTACTTATATTTA	109
F351	109	AT--CACACAAGCTGTTGCGCGTGAAAATGGCTGGAATGGCAAT-ATGAA-AGATTTGC	163
F344	69	TTT-CAATGTAACGTTGCCCTTGCATGATATTAAGAACACGCAC-CAGGACTTTTCGCC	126
F340	85	ATACCACATAAAGGCTTCAAAAGCCGAAACGTCATATACTGCAAAACAACTT-TATTTG	143
F338	238	AT--CAATTCT-TTATTGAATATCCCAACACCAACAAAGCCTG-ATGAATTAGCTTGGA	292
F336	85	ATACCATCTGAATTCTTGAAAGTCAGAGTCATTATAAAGTGCATAACAACTT-TATTTG	143
F334	85	ATACCATCTGAATTCTTGAAAGTCAGAGTCATTATAAAGTGCATAACAACTT-TATTTG	143
F332	238	AT--CAATTCT-TTATTGAATATCCCAACACCAACAAAGCCTG-ATGAATTAGCTTGGA	292
F330	214	AT--CAATTCT-TTATTGAATATCCCAACACCAACAAAGCCTG-ATGAATTAGCTTGGA	268

FIG. 4 Cont.

F307	49	CTA-CGATTGA---AAGCC-TATGACGATGGTGTGGGCGTTTGG-ACCATTGGCTTTGGC	102
F309	94	AT--TACTGAAGCTGTAGCACGTGAAAACGGCTATAAGGGCAAT-ATGAA-AGATTTGC	148
F303	66	TTT-CGATATATCGCTGGCCTTGCATGATATTAAGAACTCGCAC-TAGGACTTTTCTCACC	123
F301	66	TTT-CAATGTATCGTTGGCCTTGCATAATATTTAACACGCGCAC-TAAGACCTTTTTCGCC	123
F320	66	TTT-CGATATATCGCTGGCCTTGCATGATATTAAGAACTCGCAC-TAGGACTTTTCTCACC	123
F306	82	-TA-CAAATCA---AAGCCATATTTAGATAGCGCTAAAGTGGCA-ACGATTGGTATCGGA	135
F321	94	AT--TACTGAAGCTGTAGCACGTGAAAACGGCTATAAGGGCAAT-ATGAA-AGATTTGC	148
F315	55	ATAACAACCATTTGGACCGAA---TCGAGCAATCACGCTTTGCA-ACATATTTGTATTTT	109
F376	144	ACTGATTACCACCTAAGCAAATTA-ATTTACCAGTAGGTGTTTTAC---CAACAACGAAA	199
F311	67	AGCTTTGTTCCATTTTGGGAATTCTGCTGCT-GCACCTTTATAGTCCTT-AGCATTTAAC	124
F328	124	TTCTTTGCCACGTTTGGCCAAGTAAGTTTTTAGAGCTCCTAAAGTGTTAGAACCATAAAC	183
F324	149	CTCTTGATGTGGCCAAA-GCAATTTA--TCGGAAACAGTACTGGA-TAGA-GCCAC-GTT	202
F347	110	AGTAAAGAGTCGCAAGCTGCTTTATATTGACCAGC-----CTTTA-----AATGCTTAAG	159
F351	164	CGCTTGATGTGGCCAAA-GCTATTTA--CAAGAAGCAATACTGGA-CAGC-TCCGC-GAT	217
F344	127	GTCTTTTCCACGCTTGGCCAGATAAGTTTTGAGTGCATTAAGAGTTGCTGGACCATAAAT	186
F340	144	ACTGATTACCACCTAAGCAAATTA-ATTTACCAGTGGGTGTTTTAC---CAACAACGAAA	199
F338	293	TTGCGGAAGCAAAA-AAA-GCATCTTGGCCTTCAAGAAATACCTGG-TAAACAGCAT-AAC	348
F336	144	ACTGATTGCCTCCAAGGCATACTA-ACTTTCCAGACTTTTTGTACGGCCAACTACAAAA	202
F334	144	ACTGATTGCCTCCAAGGCATACTA-ACTTTCCAGACTTTTTGTACGGCCAACTACAAAA	202
F332	293	TTGCAGAAGCAAAA-AAA-GCATCTTGGCCTTCAAGAAATACCTGG-TAAACAGCAT-AAC	348
F330	269	TTGCAGAAGCAAAA-AAA-GCATCTTGGCCTTCAAGAAATACCTGG-TAAACAGCAT-AAC	324
F307	103	ACCATCAAAATACCCGAACGGTGTGCGAGTCAAAAAAGGCGATA---CATGCACTGA-ATC	158
F309	149	CTCTTGATGTGGCCAAA-GCAATTTA--TCGGAAACAGTACTGGA-TAGA-GCCAC-GTT	202
F303	124	TTCTTTCCACGTTTGGCCAAGTAAGTTTTGAGAGCTCCTAATGTGCTAGAACCATAAAC	183
F301	124	TTCTTTGCCACGTTTGGCCAAGTAAGTTTTTAGAGCTCCTAAAGTGTTAGAACCATAAAC	183
F320	124	TTCTTTCCACGTTTGGCCAAGTAAGTTTTGAGAGCTCCTAATGTGCTAGAACCATAAAC	183
F306	136	TCCACTTCCTATGAAAACGGTACCAAGGTCAAAATGACTGACAAGCCGATTACAAA-AGA	194
F321	149	CTCTTGATGTGGCCAAA-GCAATTTA--TCGGAAACAGTACTGGA-TAGA-GCCAC-GTT	202
F315	110	AGTAATGAAGCACAAGCTTGCTTATATTGCCCTGC-----TTTGA-----GATTACGAAG	159
F376	200	GTTACATGGCCACCGCCCTCTCTTGATTTTACCGCAACACACCCATAACAAGGCTTGTYT	259
F311	125	TTTTTTAGCAAAGTAGATTTGCTAAGATTGCCTTC-GCCTAAGT-TAT-AAGTGAATG-A	180
F328	184	GCCATCAACCTT-CAAGTCTGCATAACCAGCTTT--ACCTTGAT-TGTTAAGCAAGTTCA	239
F324	203	TTGATCAGGTTAATA---CTCTTAGCTCTGCAGT-----AGC-TG--AAGA-----	242
F347	160	CATTGATG-----ATTT-TGCG-AATGTTGGCACACCGTATTGATACGTGAA---ATCA	208
F351	218	TTGACCAAGTAAATG---CTGTTTCTTCTGCAGT-----AGC-TG--AAGA-----	257
F344	187	TCCGTCAACTGT-TAAATCTGGCCAACCTGCTTT--ACCTTGGT-TATTCAGCAAATTTA	242
F340	200	GTTACATGGCCACCGCCCTCTCTTGATTTTACCGCAACACACCCATAACAAGGCTTGCT	259

FIG. 4 Cont.

F338 349 CCAACTATTTTAAAAATGGCTCTCGGAGCTAAAGGCTTGGTGGGC-TG-ACGATGAAACG 405
F336 203 CAAACATGCCCCACCACCCCTTTCGAGTTTTTAATAGCTACACAACCGTAAGCGGGTTTAGCT 262
F334 203 CAAACATGCCCCACCACCCCTTTCGAGTTTTTAATAGCTACACAACCGTAAGCGGGTTTAGCT 262
F332 349 CCAACTATTTTAAAAATGGCTCTCGGAGCTAAAGGCTTGGTGGGC-TG--ACGATGAAACG 405
F330 325 CCAACTATTTTAAAAATGGCTCTCGGAGCTAAAGGCTTGGTGGGC-TG--ACGATGAAACG 381
F307 159 TCAAGCGGAAGAATA---CCTTCGCAA-TGACTT-----AGT-TG--TATTTGAAA-202
F309 203 TTGATCAGGTTAATA---CTCTTAGCTCTGCAGT-----AGC-TG--AAGA----- 242
F303 184 GCCATCAACCTT-CAAGTCTGCATAACCAGCTTT--ACCTTGAT-TGTTAAGCAAGTTCA 239
F301 184 GCCATCAACCTT-CAAGTCTGCATAACCAGCTTT--ACCTTGAT-TGTTAAGCAAGTTCA 239
F320 184 GCCATCAACCTT-CAAGTCTGCATAACCAGCTTT--ACCTTGAT-TGTTAAGCAAGTTCA 239
F306 195 ACGTGCTGTTCAA-A---TTGCCAAAGCTCACAT-----TGC-TA--AAGATGAGGTG 240
F321 203 TTGATCAGGTTAATA---CTCTTAGCTCTGCAGT-----AGC-TG--AAGA----- 242
F315 160 CATTGATG-----AGCCGTTC- AAT-TTGCTTGGCCATAGTTGTAAACAAA---GTCT 208
F376 260 AATTTGACTCCGCCTTCTTTGATGTATTC--AAGTGCGGCAT-----ACCAGTTGAAAG 311
F311 181 GGCCAAAGCATCGAATTGGTTTTGATTAA-GTGGTACT-----TTCAC-CAAGC 227
F328 240 AAGCACGTTGTAAAAGTGGTTTTGCAAAG-TTGATAACCACAG-----TTCACACCAGT 291
F324 243 ACTT----TTAGACACTGGT-GTGAAGTGTG--TGGTATCAACT----TTGCAAAAACCA--- 288
F347 209 AGGTA---TAGGTCATATTCAGTCTGTGA--TAATT---CGG-----CT-----CGAGT 249
F351 258 GCTT----CTAGACACTGGT-GTGAATTG--CGGTACCGGAT----TTGCAAAACCT--- 303
F344 243 AAGCACGCTGTAAGAGTGGTTTTGCAAAT-CCGGTACCGCAA-----TTTACCCCAGT 294
F340 260 AATTTGACTCCGCCTTCTTTGATGTATTC--AAGTGCGGCAT-----ACCAGTTGAAAG 311
F338 406 GCTTGGTGTGGGACCTTCGTTGCACATTGCTTGAAATCAGCTGGAATTGCTTATCCTAAG 465
F336 263 AATTT---TGTACCATAATTCACATAATC--CAATGCACGGT-----ACCAATGCTTAG 311
F334 263 AATTT---TGTACCATAATTCACATAATC--CAATGCACGGT-----ACCAATGCTTAG 311
F332 406 GCTTGGTGTGGGACCTTCGTTGCACATTGCTTGAAATCAGCTGGAATTGCTTATCCTAAG 465
F330 382 GCTTGGTGTGGGACCTTCGTTGCACATTGCTTGAAATCAGCTGGAATTGCTTATCCTAAG 441
F307 203 GCGC----TAT-CAATCGTTTGGTGAAAAG--TTCCGCTTAAT-----CAAAAACCA--- 245
F309 243 ACTT----TTAGACACTGGT-GTGAAGTGTG--TGGTATCAACT----TTGCAAAAACCA--- 288
F303 240 AAGCACGTTGTAAAAGTGGTTTTGCAAAG-TTGATAACCACAG-----TTCACACCAGT 291
F301 240 AAGCACGTTGTAAAAGTGGTTTTGCAAAG-TTGATAACCACAG-----TTCACACCAGT 291
F320 240 AAGCACGTTGTAAAAGTGGTTTTGCAAAG-TTGATAACCACAG-----TTCACACCAGT 291
F306 241 GCAT----TTCGCAAGTCGTTGCAGGGCG--TGAGGCTAACT-----CAGACTGA--- 284
F321 243 ACTT----TTAGACACTGGT-GTGAAGTGTG--TGGTATCAACT----TTGCAAAAACCA--- 288
F315 209 AAGTA---CACATCATATTCAGTCTGAGT--TAGCCTCACGC-----CCTGCAACGACT 257
F376 312 GATAA--AAGCCTGGTGGGGCCTTTGTTCC-TGATTT---ATAAGTTTTGGAACGCGAGT 365
F311 228 GATTG--ATAGCATTTTCAAATGCGACCAAGTCATTGCGAAGATATCCTTCTGCTTGAGA 285
F328 292 GTCTA--AAAGT-TCTTCAGCTACTGCAGAGCTAAGAGTATTAACCTGATCAAAAACGTGG 348

FIG. 4 Cont.

F324 289 CTTTT--ACAACGTGCTTTGAACTTGCTTAACAATCAAGGTAAAGCTGGTTATGCAG--A 344
 F347 250 TGTGG--AAGGCAG----- 261
 F351 304 CTTTT--ACAACGAGCTTTGAACTTGCTTAATAACCAAGGTAAAGCTGGATATGCAG--A 359
 F344 295 ATCTA--AAAGC-TCTTCAGCAACTAACGAGCTAATTACATTCACTTGATCAAATCGCGG 351
 F340 312 GATAA--AAGCCTGGTGGGGCCTTTGTTCC-TGATTT---ATAAGTTTTGGAACGCGAGT 365
 F338 466 CATTG--GTACCGTGCATTGGATTATGTGAATTAT-GGTACAAAATTAGCTAAACCC--G 520
 F336 312 GATAAGCAATTCCAGCTGATTTCAAGCAATGTGCAAC---GAAGGTCCCACACCAAGCCG 368
 F334 312 GATAAGCAATTCCAGCTGATTTCAAGCAATGTGCAAC---GAAGGTCCCACACCAAGCCG 368
 F332 466 CATTG--GTACCGTGCATTGGATTATGTGAATTAT-GGTACAAAATTAGCTAAACCC--G 520
 F330 442 CATTG--GTACCGTGCATTGGATTATGTGAATTAT-GGTACAAAATTAGCTAAACCC--G 496
 F307 246 -ATTC--GATGCTTTGGCCTCATTCACTTA-CAACCTTGGTGAGGGCAATCTTAGTA--T 299
 F309 289 CTTTT--ACAACGTGCTTTGAACTTGCTTAACAATCAAGGTAAAGCTGGTTATACAG--A 344
 F303 292 GTCTA--AAAGT-TCTTCAGCTACTGCAGAGCTAAGAGTATTAACCTGATCAAAACGTGG 348
 F301 292 GTCTA--AAAGT-TCTTCAGCTACTGCAGAGCTAAGAGTATTAACCTGATCAAAACGTGG 348
 F320 292 GTCTA--AAAGT-TCTTCAGCTACTGCAGAGCTAAGAGTATTAACCTGATCAAAACGTGG 348
 F306 285 -ATAT--GATGTGTACTTAGACTTTGTTTA-CAACTATGGCCAAGCAAATTGGAACG--G 338
 F321 289 CTTTT--ACAACGTGCTTTGAACTTGCTTAACAATCAAGGTAAAGCTGGTTATGCAG--A 344
 F315 258 TGCGA--AATGCCACCTCATCTTTAGCAATGTGAGCTTTGGCAATTTGAACAGCACGTTC 315
 F376 366 TTACACT-TCCTCTTTGAAATCCCGCCGTTTGG-AGA--CAGTGCGCAACGAATGTTCCG 421
 F311 286 CTCAGTGCATATATCGCCTTTTTTGACACGC----ACTCCATTAGG-----ATATTTAA 335
 F328 349 CTCTATCCA-GTACTGTTTCCGATAAATTGCTTTGGCCACATCAAGAGGCAAATCTTTCA 407
 F324 345 CTTGAAGGTTG-ATGGCGTTT-ATGGTTCTA---ACACTT--TAGGA-----GCTCTAAA 392
 F347 262 ----- 261
 F351 360 TTTAGAGGTTG-ATGGTGTTT-ATGGCTCAG---CAACGC--TAGGT-----GCCCTTAA 407
 F344 352 ATCTGTCCA-ATACTGCTTTTTATAAATGGCTTTGGCCACATCAAGCGGTAAATCTTTCA 410
 F340 366 TTACACT-TCCTCTTTGAAATCCCGCCGTTTGG-AGA--CAGTGCGCAACGAATGTTCCG 421
 F338 521 CTT-ACGGTTGTGTAGCTATT-AAAACTCGA---AAGGGTGGTGGGC-----ATGTTTGT 570
 F336 369 TTTTCATCGTCAGCCACCAAGCCTTTAGCTCCG-AGAGCCATTTTAAAATAGTTGGGTTA 427
 F334 369 TTTTCATCGTCAGCCACCAAGCCTTTAGCTCCG-AGAGCCATTTTAAAATAGTTGGGTTA 427
 F332 521 CTT-ACGGTTGTGTAGCTATT-AAAACTCGA---AAGGGTGGTGGGC-----ATGTTTGT 570
 F330 497 CTT-ACGGTTGTGTAGCTATT-AAAACTCGA---AAGGGTGGTGGGC-----GTGTTTGT 546
 F307 300 ATC-AACTTTGCTAAAAAAGC-TTAATGCCA---AAGACTA-TAAAG-----GTGCTGCA 348
 F309 345 CTTGAAGGTTG-ATGGCGTTT-ATGGTTCTA---GCACAT--TAGGA-----GCTCTCAA 392
 F303 349 CTCTATCCA-GTACTGTTTCCGATAAATTGCTTTGGCCACATCAAGAGGCAAATCTTTCA 407
 F301 349 CTCTATCCA-GTACTGTTTCCGATAAATTGCTTTGGCCACATCAAGAGGCAAATCTTTCA 407
 F320 349 CTCTATCCA-GTACTGTTTCCGATAAATTGCTTTGGCCACATCAAGAGGCAAATCTTTCA 407
 F306 339 CTC-ATCAATGCTTCGTAATC-TCAAAGCAG---GGCAATA-TAAGC-----AAGCTTGT 387

FIG. 4 Cont.

F321 345 CTTGAAGGTTG-ATGGCGTTT-ATGGTTCTA---ACACTT--TAGGA-----GCTCTAAA 392
F315 316 TTTTGTAAATCGGCTTGTCTAGTCATTTTGACCTT-GGTACCGTTTTTCATAGGAAGTGGATC 374
F376 422 CACCATG---CAGTTTCATCGTCAAG---CCAAGAGG---ACTTTAAGTCCTTCAGCCAT 472
F311 336 T--TGTTT-C-AAATCCAATG----GTCCAAACGCC---ACACCAT---CGTCATA 378
F328 408 TATTGCCC-TTATAGCCGTTTTACGTGCTACAGCTTCAGTAATACCGTATTTGGTAGCA 466
F324 393 A-ACTTAC-TTGGCCA-AACGTGGCAA--AGAAGGCG-----AAAAGGTATTAGTGC GCG 442
F347 262 ----- 261
F351 408 A-ACATAC-TTGTCAA-AACGTGGGAA--AGAAGGTG-----AGAAGGTCTGGTGCGAG 457
F344 411 TGTTGCCC-TTAAAGCCGTTAGTACGTGCTACTGCTTCAGTAATACCGTACTTTGTTTCA 469
F340 422 CACCATG---CAGTTTCATCGTCAAG---CCAAGAGG---ACTTTAAGTCCTTCAGCCAT 472
F338 571 T-TTGTAG-TTGGCCGTGACAAAAAGTCTGGAAAGTT-----AGTATGCCTTGGAGGCAA 6
F336 428 TGCTGTTTACCAGGTATTTCTTGAAGG--CCAAGATG---CTTTT--TTGCTTCTGCAAT 480
F334 428 TGCTGTTTACCAGGTATTTCTTGAAGG--CCAAGATG---CTTTT--TTGCTTCTGCAAT 480
F332 571 T-TTGTAG-TTGGCCGTGACAAAAAGTCTGGAAAGTT-----AGTATGCCTTGGAGGCAA 623
F330 547 T-TTGTAG-TTGGCCGTGACAAAAAGTCTGGAAAGTT-----AGTATGCCTTGGAGGCAA 599
F307 349 G-CTGAAT-TT--CCTAAATG-GAATA--AG--G--C-----GG---GTGGTCGT--GTC 387
F309 393 A-ACTTAC-TTGGCCA-AACGTGGGAA--AGAAGGTG-----AGAAAGTCCTAGTGC GAG 442
F303 408 TATTGCCC-TTATAGCCGTTTTACGTGCTACAGCTTCAGTAATACCGTATTTGGTAGCA 466
F301 408 TATTGCCC-TTATAGCCGTTTTACGTGCTACAGCTTCAGTAATACCGTATTTGGTAGCA 466
F320 408 TATTGCCC-TTATAGCCGTTTTACGTGCTACAGCTTCAGTAATACCGTATTTGGTAGCA 466
F306 388 G-CTTCAT-TA--CTGAAATACAAATA--TGTTG--C-----AAAGCGTGATTGCTCGAT 434
F321 393 A-ACTTAC-TTGGCCA-AACGTGGCAA--AGAAGGCG-----AAAAGGTCTTAGTGC GCG 442
F315 375 CGATACCAATCGTTGCCACTTTAGCGCTATCTAAATA---TGGCTTTGATTTGTACCCCT 431
F376 473 TTGA--TGATT-GTCTGGTTGTGTTTGGGGCCGGCGATTTAGCCAA-----CCCTA 521
F311 379 GGCTTTCAAAC-----GTTTACCTTC---AAA---GCCTTTG-ATT-----AGATTGATT 421
F328 467 CCTCCTCGATCTACTGGATTATTTAC---ATAACCGCTACGCGTT-----TAATCAAAT 518
F324 443 T--GTTAAATA-----TTATGCA---AGGCCAACGAT-ACATT----GAAATC---- 480
F347 262 ----- 261
F351 458 T--GCTCAATA-----TTATGCA---AGGGCAACGCT-ACATT----GAAATC---- 495
F344 470 CCGCCTCGATCTGCTGGGTTGTTTAC---GTACCCGCCCTCACGCT-----TAATTA ACT 521
F340 473 TTGA--TGATT-GTCTGGTTGTGTTTGGGGCCGGCGATTTAGCCAA-----CCCTA 521
F338 624 TCAGTCAAATAAAGTTTGTTATGCACTTTATAATGACTCTGACTTTCAA-GAATTCAGAT 682
F336 481 CCAAGCTAATTCATCAGGCTTTGTT-GGTGTTGGGATATTCAATAAAGAATTGATCCCTA 539
F334 481 CCAAGCTAATTCATCAGGCTTTGTT-GGTGTTGGGATATTCAATAAAGAATTGATCCCTA 539
F332 624 TCAGTCAAATAAAGTTTGTTATGCACTTTATAATGACTCTGACTTTCAA-GAATTCAGAT 682
F330 600 TCAGTCAAATAAAGTTTGTTATGCACTTTATAATGACTCTGACTTTCAA-GAATTCAGAT 658
F307 388 TTGGCTGGAT-----TAGTTA-AAC---GTCGCAAAGCTGAAAT-----GGAGTTAT-T 431

FIG. 4 Cont.

F309	443	T--TCTTAATA-----TCATGCA----AGGCCAGCGAT-ATATC----GAAATT-----	480
F303	467	CCTCCTCGATCTACTGGATTATTTAC---ATAACCGCCTTCGCGTT-----TAATCAAAT	518
F301	467	CCTCCTCGATCTACTGGATTATTTAC---ATAACCGCCTTCGCGTT-----TAATCAAAT	518
F320	467	CCTCCTCGATCTACTGGATTATTTAC---ATAACCGCCTTCGCGTT-----TAATCAAAT	518
F306	435	TCGGTCCAATGG---TTGTTATGGT----GTCTGGACACGCCAAC-----AAGATCGT-T	481
F321	443	T--GTAAATA-----TTATGCA----AGGCCAACGAT-ACATT----GAAATC-----	480
F315	432	CATAGCCAATTAAAGATGCAAAAAAAAAAGCGCTGATGCGCTTAATGTTGTTACTATGATTT	491
F376	522	TGTGACGGCGAGCCT-CTGCGATCCACG-----GTAATTCTGGA-TTTGCACTC--AT--	570
F311	422	CCT---GA-GTT--ACTTG-TTTTCAT-----	441
F328	519	CATCAAGATATT--GTTCAATTTTCAT-----	543
F324	481	--TGTGAACGTA--ATAAAA--GCCAAGAGCAGTTTTTTTTATGGCTG-GATCGCTAACCG	533
F347	262	-----	261
F351	496	--TGTGAGCGTA--ATCCAA--AGCAGGAACAGTTTTTCTATGGCTG-GATTGCTAACCG	548
F344	522	CGTCCAGATATT--GTTCAATGTTCAATTTTCGGTTTCCTTCAGATGTAAAAAACCGCCCGA	579
F340	522	TGTGACGGCGAGCCT-CTGCGATCCACG-----GTAATTCTGGA-TTTGCACTC--AT--	570
F338	683	GGTATGGTCGTACAACCTCAACCAGCAAGTAAGCGTTATACATTGCCACAATTAAAGGCG	742
F336	540	CTAACTGGCCTGTTAATTGCGGGCCATTAAAGTCGTGGTTGAGAAATTTTCTTTCCAATCC	599
F334	540	CTAACTGGCCTGTTAATTGCGGGCCATTAAAGTCGTGGTTGAGAAATTTTCTTTCCAATCC	599
F332	683	GGTATGGTCGTACAACCTCAACCAGCAAGTAAGCGTTATACATTGCCACAATTAAAGGCG	742
F330	659	GGTATGGTCGTACAACCTCAACCAGCAAGTAAGCGTTATACATTGCCACAATTAAAGGCG	718
F307	432	TTTA-AAATGA-----	441
F309	481	--TGTGAGCGTA--ATCCTA--AGCAAGAGCAATTCTTCTATGGCTG-GATTGCTAACCG	533
F303	519	CATCAAGATATT--GTTCAATTTTCAT-----	543
F301	519	CATCAAGATATT--GTTCAATTTTCATTTCACTTTTCCTTTAGACGTAAAAAAGCCACCAG	576
F320	519	CATCAAGATATT--GTTCAATTTTCAT-----	543
F306	482	ATAGCAAGTGTATGGCGGTGCAATGA-----	507
F321	481	--TGTGAACGTA--ATAAAA--GCCAAGAGCAGTTTTTTTTATGGCTG-GATCGCTAACCG	533
F315	492	TAGTCTTGTTTGACAT-----	507
F376	571	-----	570
F311	442	-----	441
F328	544	-----	543
F324	534	GATCGGCTAG-----	543
F347	262	-----	261
F351	549	GATCGGCTAG-----	558
F344	580	AGGCGGCAT-----	588
F340	571	-----	570
F338	743	TAACAGCTACTAGGGTTTTTGAAGCCTAA-----	771

FIG. 4 Cont.

F336	600	ATGACAGAACAAGCATCAAAGTACCAGTAACAAATGCATGATATTTTTCAGGAATAACTT	659
F334	600	ATGACAGAACAAGCATCAAAGTACCAGTAACAAATGCATGATGTTTTTCAGGAATAACTT	659
F332	743	TAACAGCTACTAGGGTTTTGGAAGCCTAA-----	771
F330	719	TAACAGCTACTAGGGTTTTGGAAGCCTAA-----	747
F307	442	-----	441
F309	534	GATCGGCTAG-----	543
F303	544	-----	543
F301	577	TTGATCCGTGAACTTGATATTTATATTGATCCAGAAGTGCAGGCTGAGGTTTTTGGTCAG	636
F320	544	-----	543
F306	508	-----	507
F321	534	GATCGGCTAG-----	543
F315	508	-----	507
F376	571	-----	570
F311	442	-----	441
F328	544	-----	543
F324	544	-----	543
F347	262	-----	261
F351	559	-----	558
F344	589	-----	588
F340	571	-----	570
F338	772	-----	771
F336	660	CATAATCAACACCCCATTGTAGTGCTGGCAATAAAAATTAGCATGATGAATGCACCTACGG	719
F334	660	CATAATCAACACCCCATTGTAGTGCTGGCAATAAAAATTAGCATGATGAATGCACCTACGG	719
F332	772	-----	771
F330	748	-----	747
F307	442	-----	441
F309	544	-----	543
F303	544	-----	543
F301	637	-----	636
F320	544	-----	543
F306	508	-----	507
F321	544	-----	543
F315	508	-----	507
F376	571	-----	570
F311	442	-----	441
F328	544	-----	543
F324	544	-----	543

FIG. 4 Cont.

F347	262	-----	261
F351	559	-----	558
F344	589	-----	588
F340	571	-----	570
F338	772	-----	771
F336	720	CGGGTAACTTAACAGATAGATACTGCCAAGCATTGTTTTCAATTAACTTCAT-----	771
F334	720	CGGGTAACTTAACAGATAGATACTGCCAAGCATTGTTTTCAATTAACTTCAT-----	771
F332	772	-----	771
F330	748	-----	747
F307	442	-----	441
F309	544	-----	543
F303	544	-----	543
F301	637	-----	636
F320	544	-----	543
F306	508	-----	507
F321	544	-----	543
F315	508	-----	507

FIG. 5

Alineación de secuencias múltiple CluastalW (v1.83)

21 Secuencias Alineadas Tiempo de procesamiento: 0,3 segundos
 Huecos insertados = 50 Identities Conservadas = 1
 Puntuación = 83346

Modo de alineación por pares: Lento

Parámetros de alineación por pares:

Penalización por Apertura Penalización por Extensión
 de Hueco = 10,0 de Hueco = 0,1
 Matriz de Similitud: gonnet

Parámetros de Alineación Múltiple:

Penalización por Apertura Penalización por Extensión
 de Hueco = 10,0 de Hueco = 0,1
 Retraso Divergente = 40% Distancia entre Huecos = 8
 Matriz de Similitud: gonnet

F307	1	-----	0
F376	1	-----	0
F351	1	-----	0
F347	1	-----	0
F344	1	-----	0
F340	1	-----	0
F338	1	MKLIENNAWQYLSVKLPAVGAFIMLILLPALQWGVDEYEVPEKYHAFVTGTMLVLVLSWIG	60
F336	1	MKLIENNAWQYLSVKLPAVGAFIMLILLPALQWGVDEYEVPEKYHAFVTGTMLVLVLSWIG	60
F334	1	MKLIENNAWQYLSVKLPAVGAFIMLILLPALQWGVDEYEVPEKHHAFVTGTMLVLVLSWIG	60
F332	1	MKLIENNAWQYLSVKLPAVGAFIMLILLPALQWGVDEYEVPEKYHAFVTGTMLVLVLSWIG	60
F330	1	----LDPVMTMTSSPFHNS----SRILLPALQWGVDEYEVPEKYHAFVTGTMLVLVLSWIG	52
F328	1	-----	0
F324	1	-----	0
F321	1	-----	0
F320	1	-----	0
F315	1	-----	0
F306	1	-----	0
F303	1	-----	0
F301	1	-----LTKN	4
F309	1	-----	0
F311	1	-----	0

FIG. 5 Cont.

F307	1	-----VKTSNPGVDLIKGFEGRLRLKAYDDGVGVWTIGF	33
F376	1	-----MSANP-ELPWIAEARRHIGLAEIAGPKHNQTII	32
F351	1	-----LKETEMNIEKYLDELIKREGGYVNNPADRGGATKYGIT	38
F347	1	-----LPSTTR-----	6
F344	1	-----MPPSGGFLHLKETEMNIEQYLDELIKREGGYVNNPADRGGETKYGIT	47
F340	1	-----MSANP-ELPWIAEARRHIGLAEIAGPKHNQTII	32
F338	61	KKISQPRNLNGPQLTGQLVGINSLLNIPTPTKPDDELAWIAEAKKHLGLQEIPGKQHNPTIL	120
F336	61	KKISQPRNLNGPQLTGQLVGINSLLNIPTPTKPDDELAWIAEAKKHLGLQEIPGKQHNPTIL	120
F334	61	KKISQPRNLNGPQLTGQLVGINSLLNIPTPTKPDDELAWIAEAKKHLGLQEIPGKQHNPTIL	120
F332	61	KKISQPRNLNGPQLTGQLVGINSLLNIPTPTKPDDELAWIAEAKKHLGLQEIPGKQHNPTIL	120
F330	53	KKISQPRNLNGPQLTGQLVGINSLLNIPTPTKPDDELAWIAEAKKHLGLQEIPGKQHNPTIL	112
F328	1	-----MKIEQYLDDLIKRVGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F324	1	-----MKIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F321	1	-----MKIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F320	1	-----MKIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F315	1	-----MSNKTKIIVTTLSASALFFASLIGYEGYKSKPYLDSAKVATIGI	44
F306	1	-----MSNKTKIIVTTLSASALFFASLIGYEGYKSKPYLDSAKVATIGI	44
F303	1	-----MKIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F301	5	LSLHFWININIKFTDQLVAFRLKESEMIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	64
F309	1	-----MKIEQYLDDLIKREGGYVNNPVDRGGATKYGIT	33
F311	1	-----MKTSNSGINLIKGFEGKRLKAYDDGVGVWTIGF	33
F307	34	GTIKYPNGVRVKKGDTCTESQAEEYLRLNDLV-----FES	68
F376	33	KWLKDLKSSWLDDETAWCCTFVAHCLQTAGFQRGSVNSRSKTYKSGTKAPPGFYFNFWYA	92
F351	39	QAVARENGWNGNMKDLPLDVAKAIYKKQYWTAPRFDQVNA-----VSSAVAE	86
F347	7	-----	6
F344	48	EAVARTNGFKGNMKDLPLDVAKAIYKKQYWTAPRFDQVNV-----ISSLVAEE	95
F340	33	KWLKDLKSSWLDDETAWCCTFVAHCLQTAGFQRGSVNSRSKTYKSGTKAPPGFYFNFWYA	92
F338	121	KWLSELKAWWADDETAWCCTFVAHCLKSAGIA-----YPKHWYR	159
F336	121	KWLSELKAWWADDETAWCCTFVAHCLKSAGIA-----YPKHWYR	159
F334	121	KWLSELKAWWADDETAWCCTFVAHCLKSAGIA-----YPKHWYR	159
F332	121	KWLSELKAWWADDETAWCCTFVAHCLKSAGIA-----YPKHWYR	159
F330	113	KWLSELKAWWADDETAWCCTFVAHCLKSAGIA-----YSKHWYR	151
F328	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F324	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F321	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F320	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F315	45	GSTSYENGTKVKMTDKPITKERAQVIAKAHIA-----KDE	79

FIG. 5 Cont.

F306	45	GSTSYENGTKVKMTDKPITKERAVQIAKAHIA-----KDE	79
F303	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F301	65	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	112
F309	34	EAVARENGYKGNMKDLPLDVAKAIYRKQYWIEPRFDQVNT-----LSSAVAE	81
F311	34	GTIKYPNGVRVKKGDICTESQAEGYLRNDLVA-----FEN	68
F307	69	AINR--LVKVPLNQNF DALASFTYNLG-----EGNLSISTLLKKLNAKDYKGAAAEFP	120
F376	93	ALEYIKEGGVKLXKPCYGCVAVKSREGGGHVTFVVGKTP-TGKLICLGGNQSNKVCFAVY	151
F351	87	LLDTGVNCGTGFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLEV DGVYGSATLGALKTYLS	140
F347	7	-----AELSQT EYDLYLDFTYQYG-----VPTFAKSSMLKHLKAGQYKAACDSLL	51
F344	96	LLDTGVNCGTGFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGWPDLTVDGIYGPATLNALKTYLA	149
F340	93	ALEYIKEGGVKLDKPCYGCVAVKSREGGGHVTFVVGKTP-TGKLICLGGNQSNKVCFAVY	151
F338	160	ALDYVNYG-TKLAKPAYGCVAIKTRKGGGHVCFVVGGRDKKSGKLVCLGGNQSNKVCYALY	218
F336	160	ALDYVNYG-TKLAKPAYGCVAIKTRKGGGHVCFVVGGRDKKSGKLVCLGGNQSNKVCYALY	218
F334	160	ALDYVNYG-TKLAKPAYGCVAIKTRKGGGHVCFVVGGRDKKSGKLVCLGGNQSNKVCYALY	218
F332	160	ALDYVNYG-TKLAKPAYGCVAIKTRKGGGHVCFVVGGRDKKSGKLVCLGGNQSNKVCYALY	218
F330	152	ALDYVNYG-TKLAKPAYGCVAIKTRKGGGRVCFVVGGRDKKSGKLVCLGGNQSNKVCYALY	210
F328	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F324	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F321	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F320	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F315	80	VAFRKS LQGVRLTQTEYDVYLD FVYNYG-----QANWNGSSMLRNLKAGQYKQACASLL	133
F306	80	VAFRKS LQGVRLTQTEYDVYLD FVYNYG-----QANWNGSSMLRNLKAGQYKQACASLL	133
F303	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F301	113	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYADLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	166
F309	82	LLDTGVNCGINFAKPLLQRALNLLNNQG-----KAGYTDLKVDGVYGSNTLGALKTYLA	135
F311	69	AINR--LVKVPLNQNF DALASFTYNLG-----EGNLSKSTLLKKLNAKDYKGAAAEFP	120
F307	121	KWNKAGGR-----VLAGLVKRRKAEMELFLK-----	146
F376	152	DVSAFEAFMWYGKTSKPAAHRYDLPVLKIVSVTSVSEA-----	189
F351	141	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNPKQE QFFYGWIANRIG-----	185
F347	52	KYKYVAKRDCS-----VRKNGCYGVWTRQVERHAKCIGA Q-----	86
F344	150	KRGKDGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNPSQE QFFYGWIANRVVI-----	195
F340	152	DVSAFEAFMWYGKTSKPAAHRYDLPVLKIVSVTSVSEA-----	189
F338	219	NDSDFQEFRWYGRTTQPASKRYTLPQLKGV TATRVLEA-----	256
F336	219	NDSDFQEFRWYGRTTQPASKRYTLPQLKGV TATRVLEA-----	256
F334	219	NDSDFQEFRWYGRTTQPAGKRYTLPQLKGV TATRVLEA-----	256
F332	219	NDSDFQEFRWYGRTTQPASKRYTLPQLKGV TATRVLEA-----	256
F330	211	NDSDFQEFRWYGRTTQPASKRYTLPQLKGV TATRVLEA-----	248

FIG. 5 Cont.

F328	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNKSQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F324	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNKSQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F321	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNKSQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F320	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNPKQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F315	134	KYKYVAKRDCS-----IRSNGCYGVWTRQQDCYSKCMVQ-----	168
F306	134	KYKYVAKRDCS-----IRSNGCYGVWTRQQDRYSKCMVQ-----	168
F303	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNPKQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F301	167	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNKSQEQQFFYGWIANRIG-----	211
F309	136	KRGKEGEKVLVRVLNIMQGQRYIEICERNPKQEQQFFYGWIANRIG-----	180
F311	121	KWNKAGGR-----VLAGLVKRRKAEMELFLK-----	146

FIG. 6

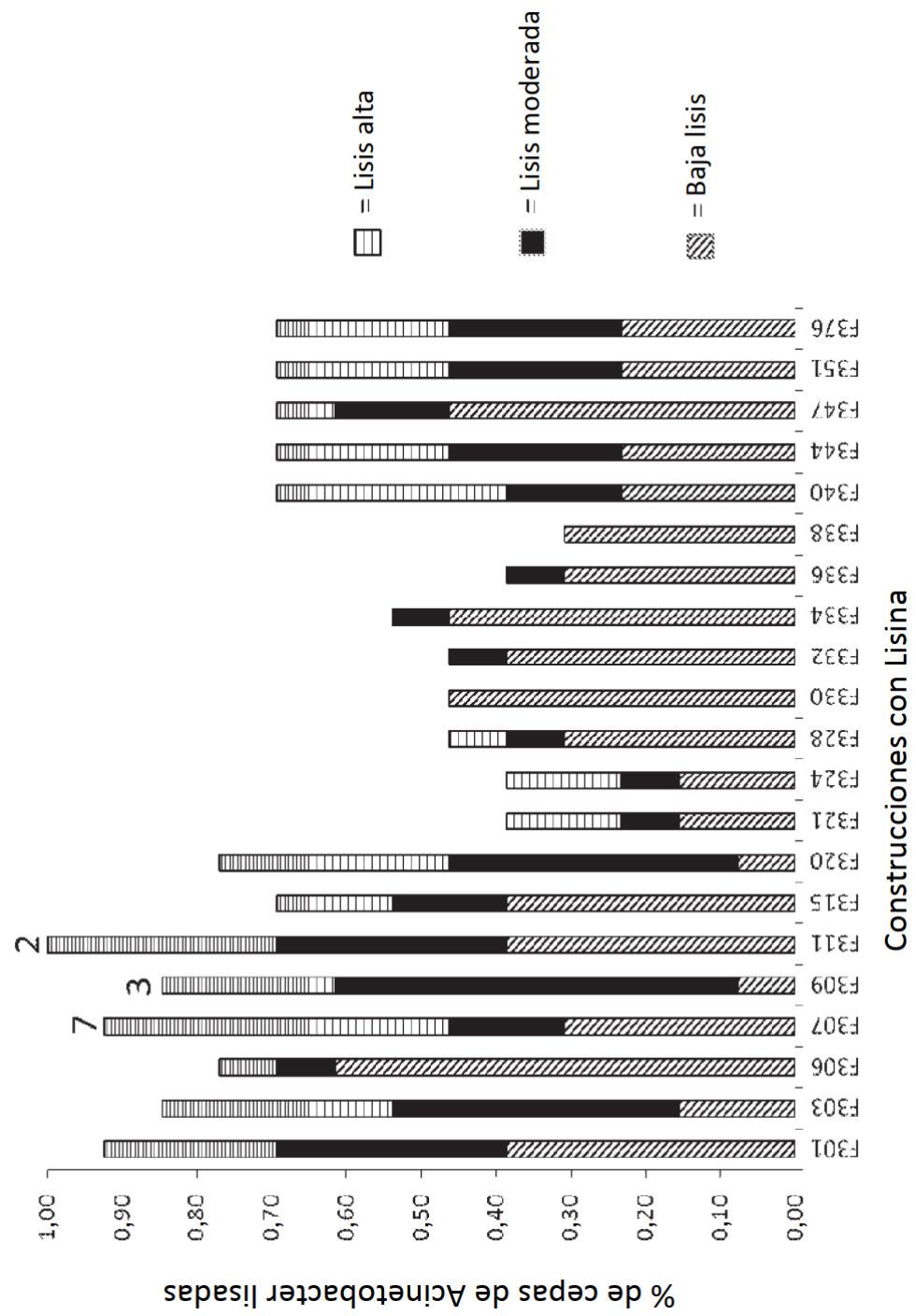


FIG. 7A

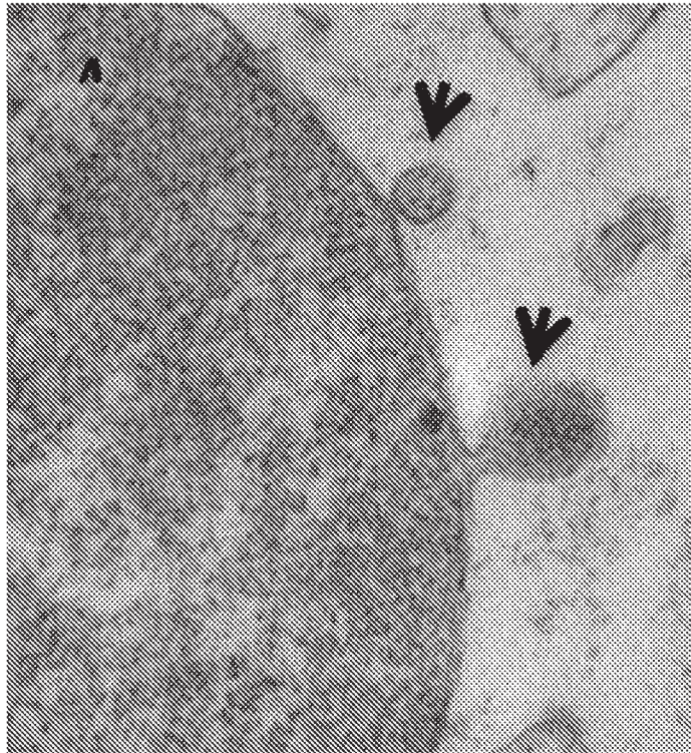


FIG. 7B

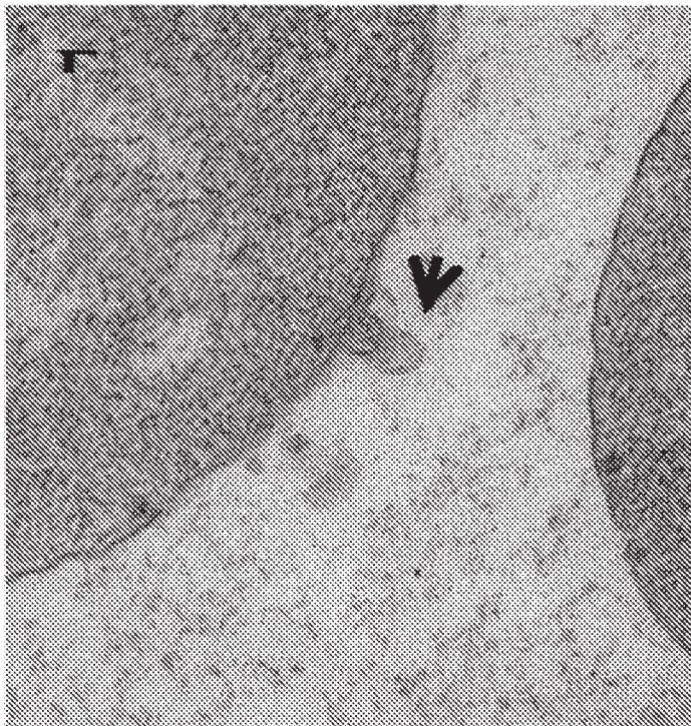
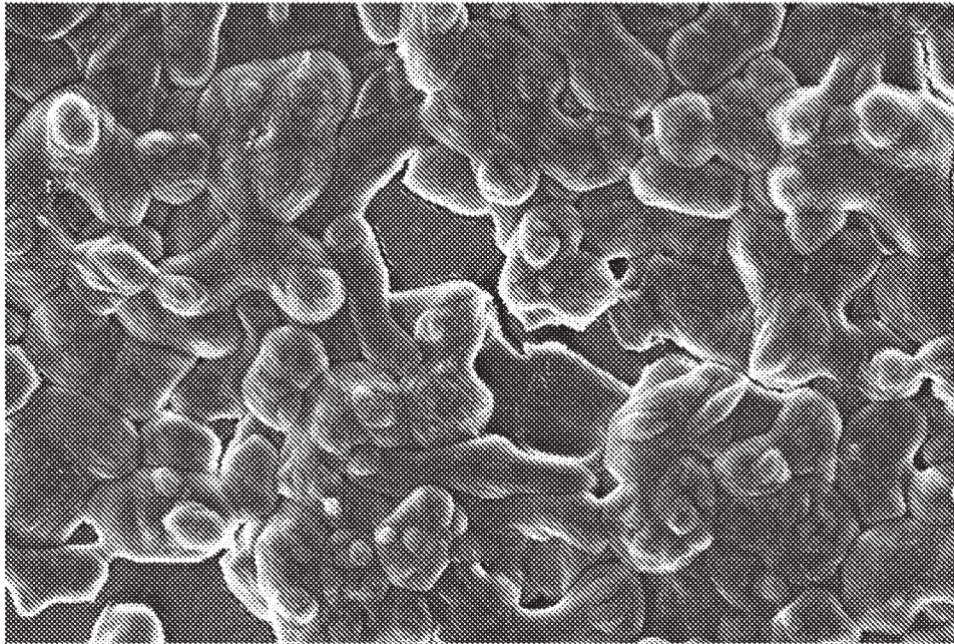


FIG. 8

Tiempo 0



30 Min

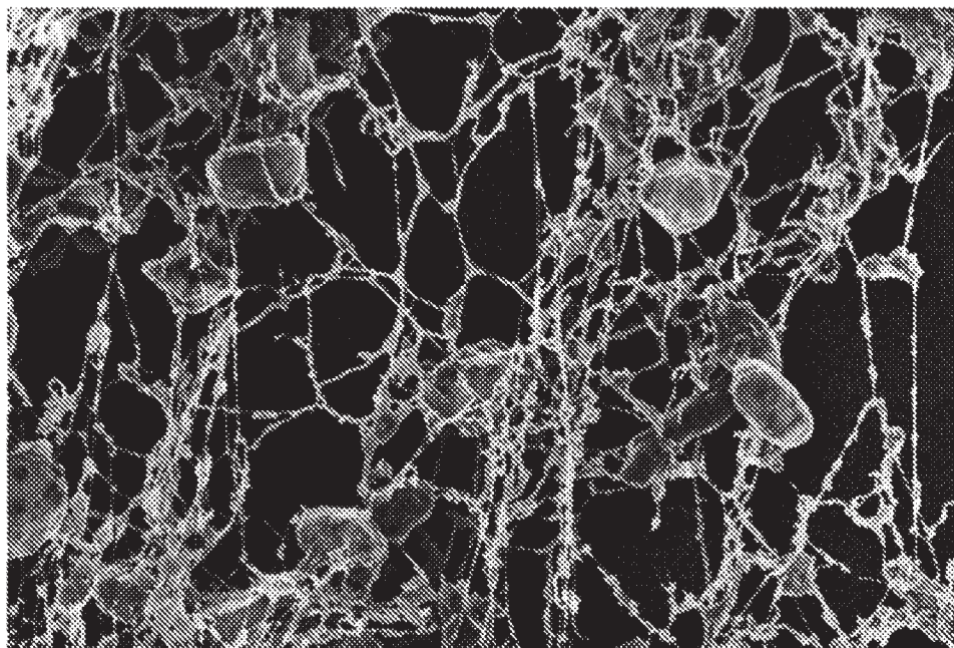


FIG. 9

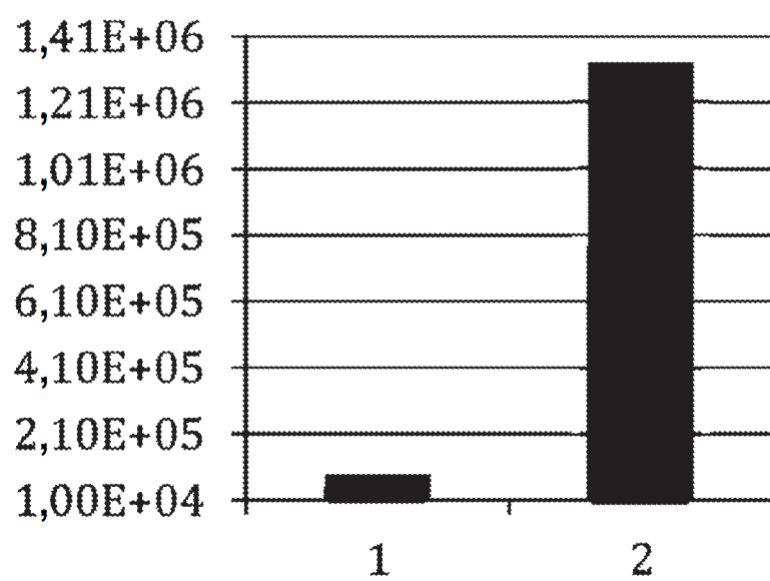


FIG. 10

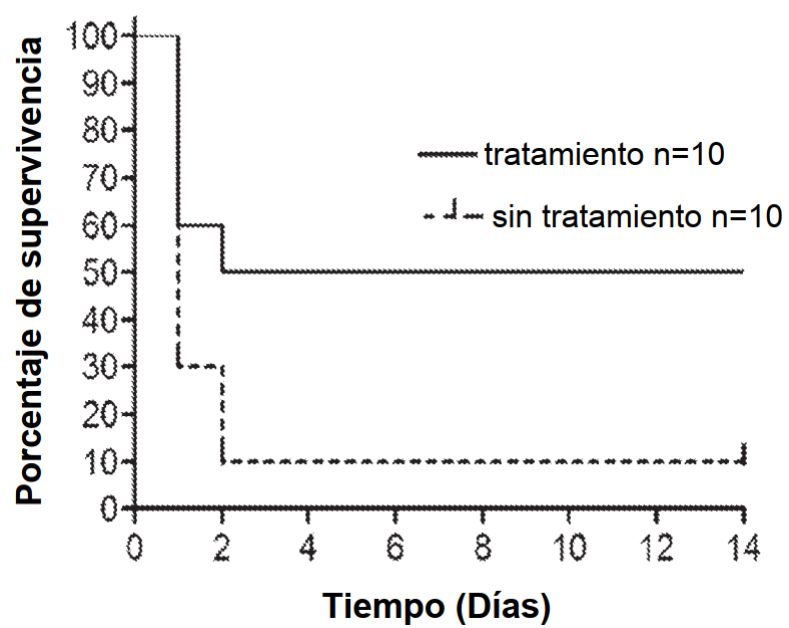


FIG. 11

F307

VKTSNPGVDL IKGFEGLRLK AYDDGVGVWT IGFGTIKYPN GVRVKKGDTC TESQAEEYLR
 NDLVVFESAI NRLVKVPLNQ NQFDALASFT YNLGEGNLSI STLLKKL **NAK DYKGAAAEFP**
KWNKAGGRVL AGLVKRRKAE MELFLK (SEQ ID NO:1)

P307- NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLAGLVKRRK -- 3.4 kDa (SEQ ID
 NO:43)

P307Ex - NAKDYKGAAAEFPKWNKAGGRVLAGLVKRRKSQSRESQC -- 4.3 kDa (SEQ ID
 NO:45)

FIG. 12

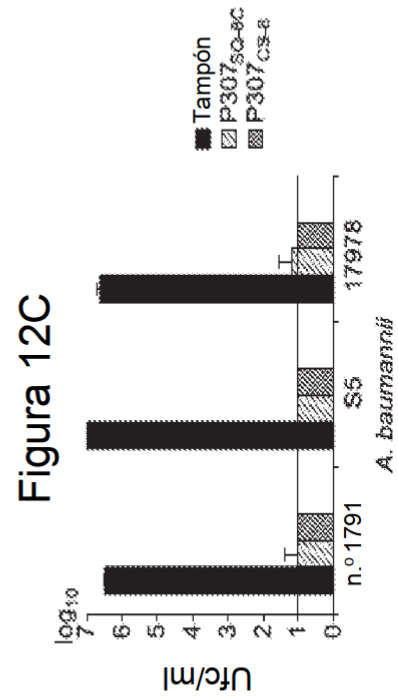
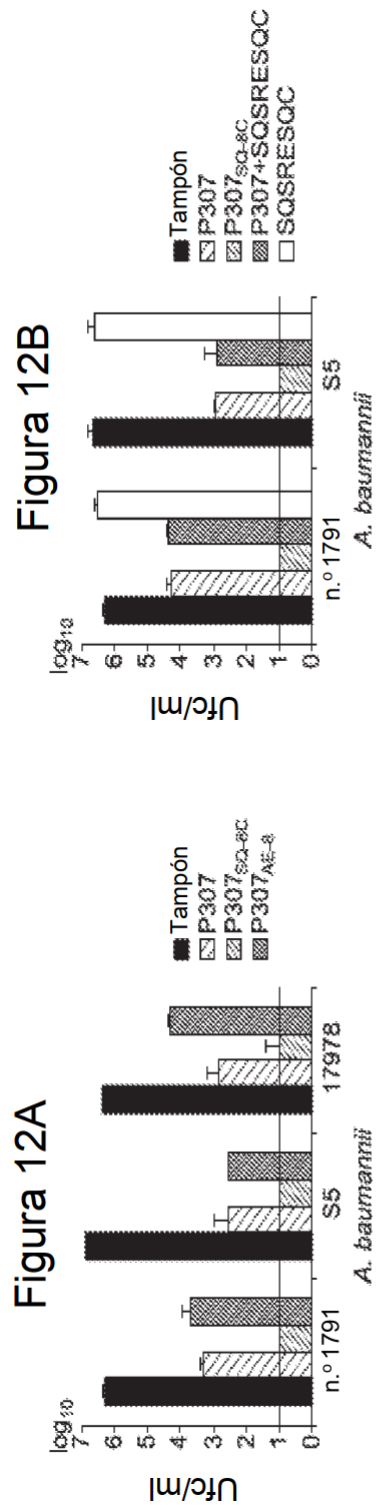


FIG. 13

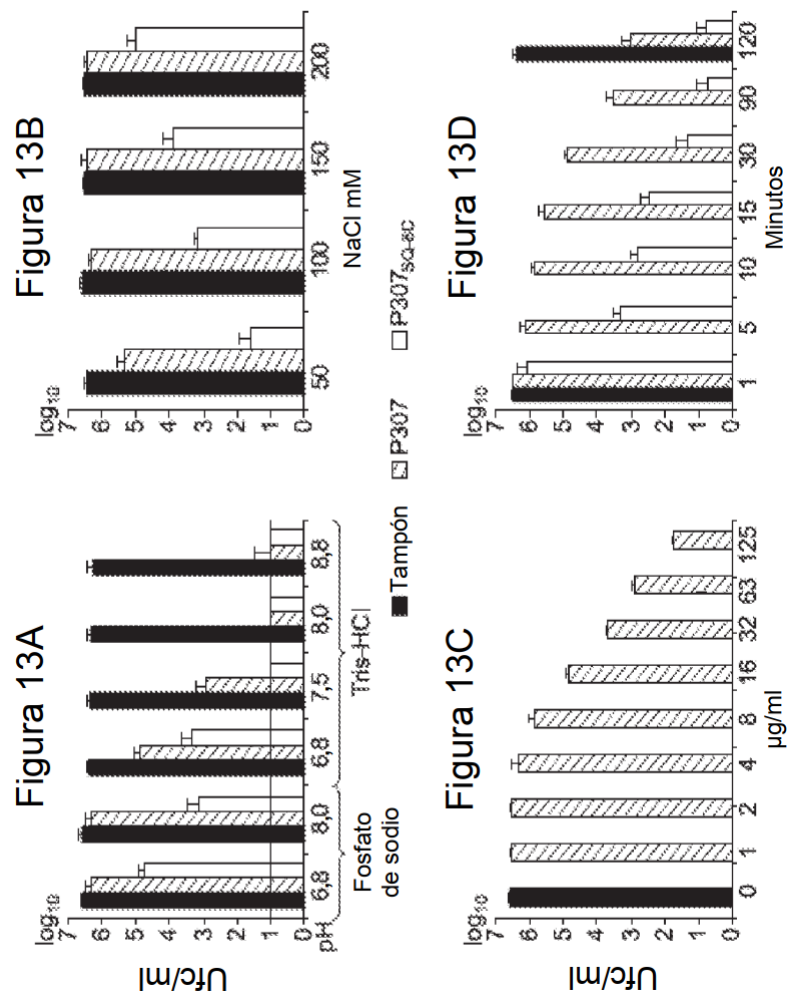


FIG 14

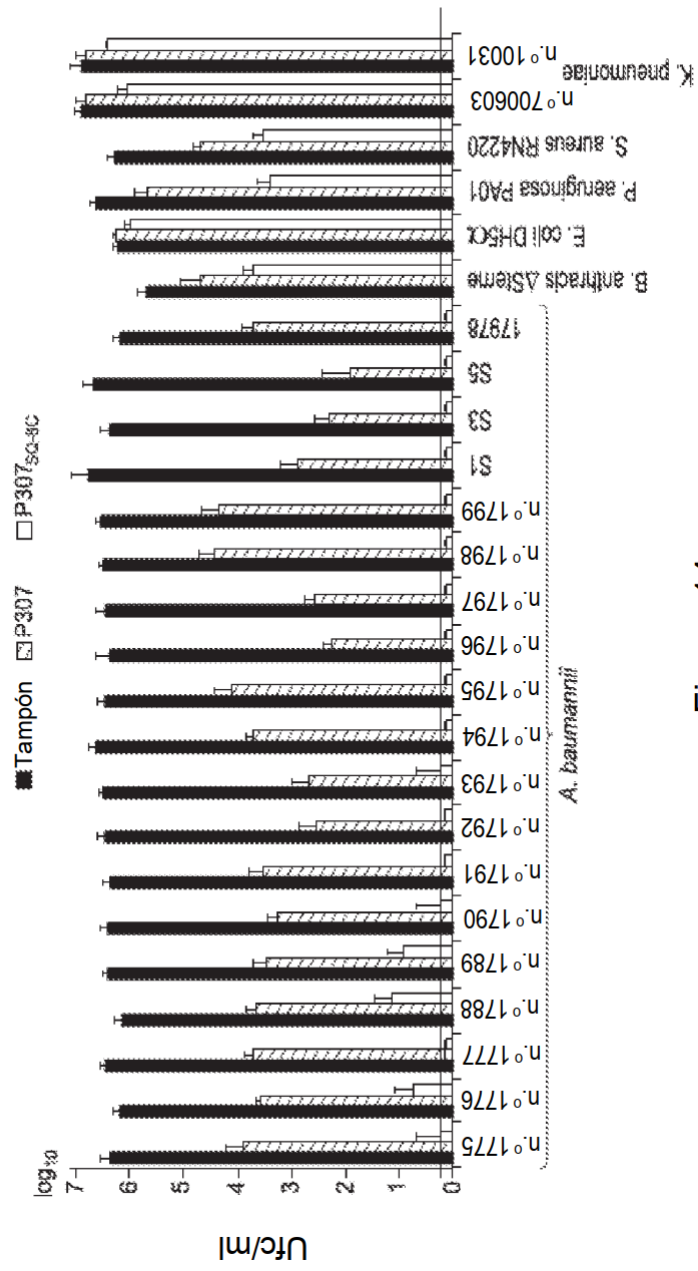


Figura 14

FIG 15

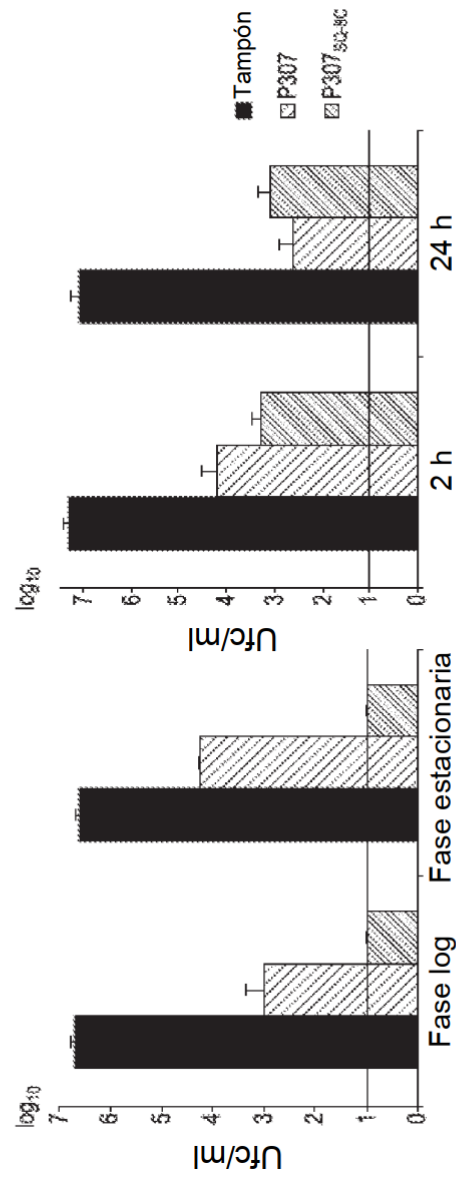


Figura 15B

Figura 15A

FIG. 16

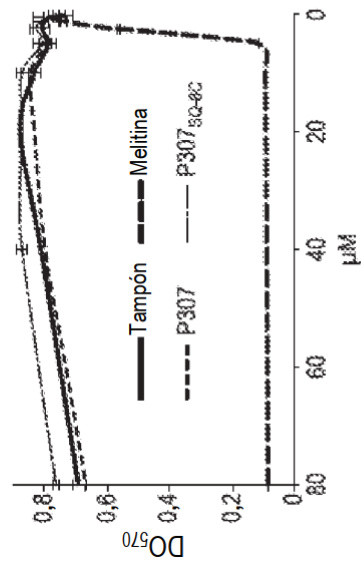


Figura 16A

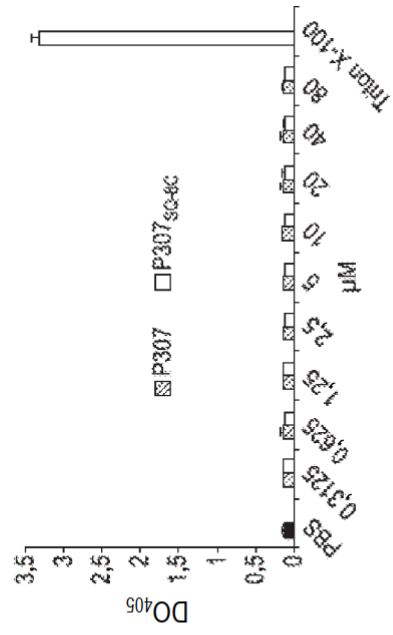


Figura 16B

FIG. 17

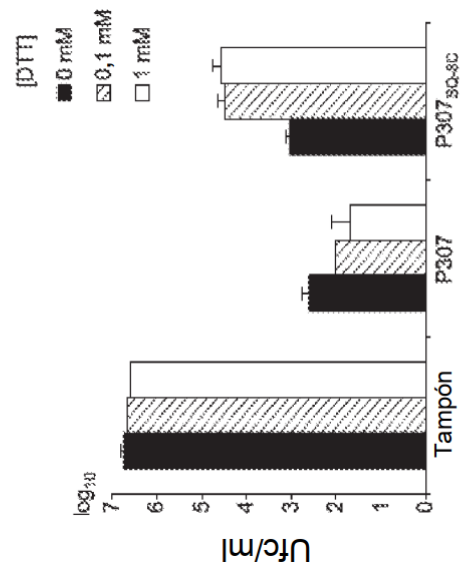


Figura 17A

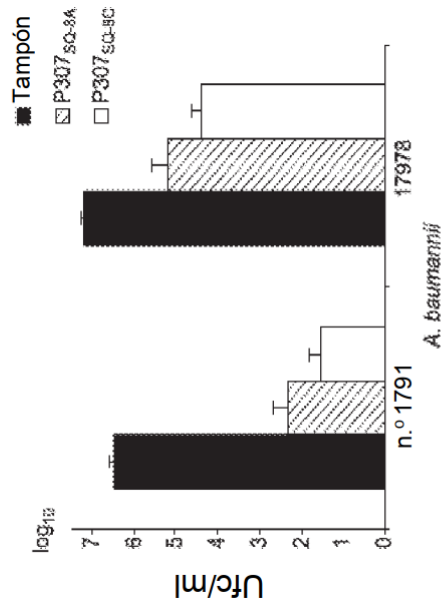


Figura 17B

FIG. 18

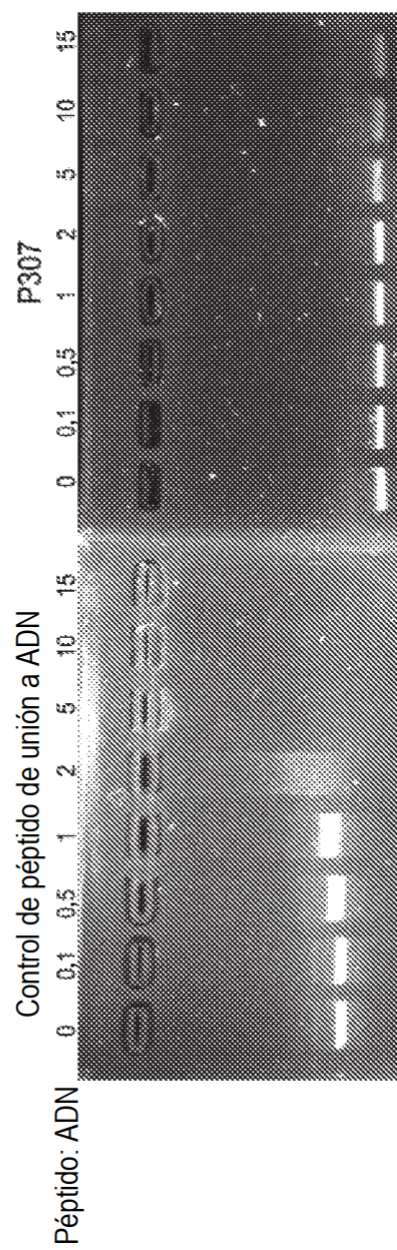


Figura 18

FIG. 19

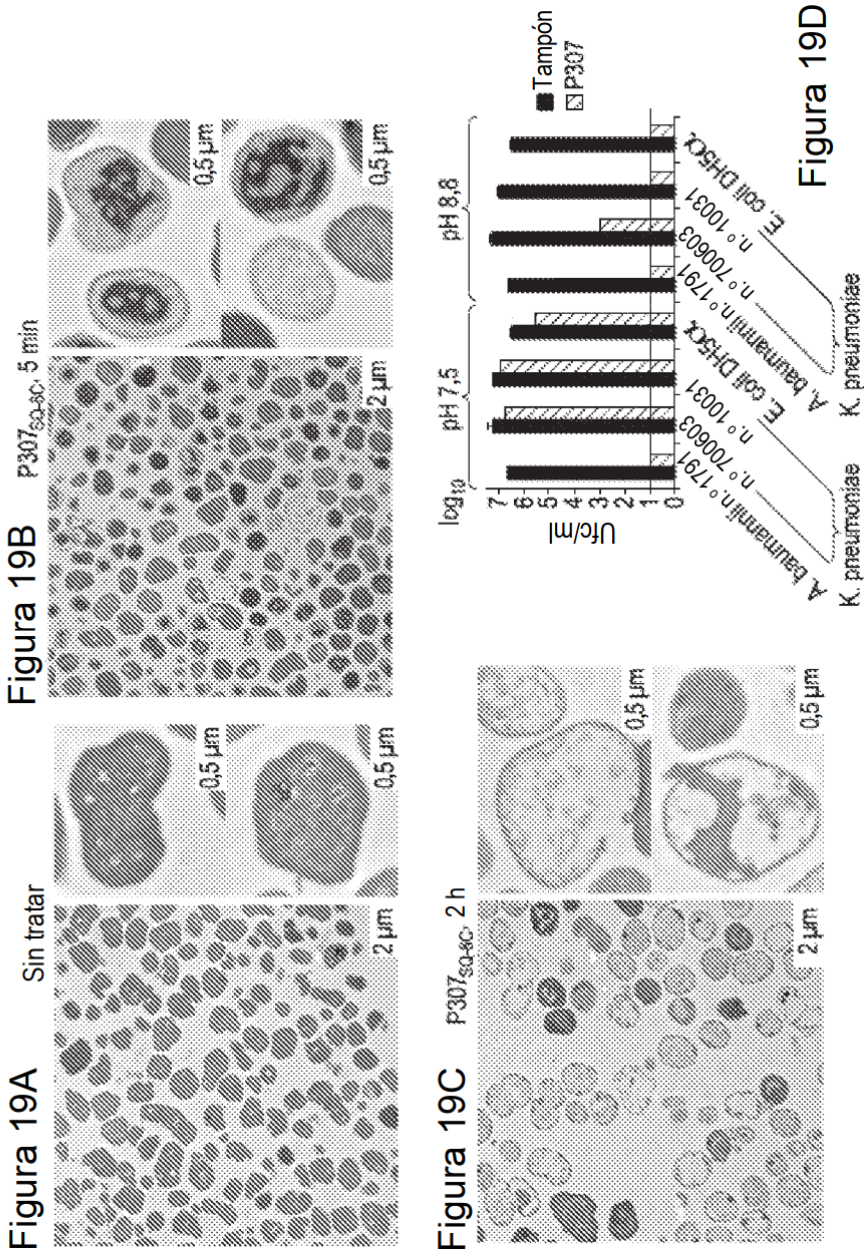


FIG. 20

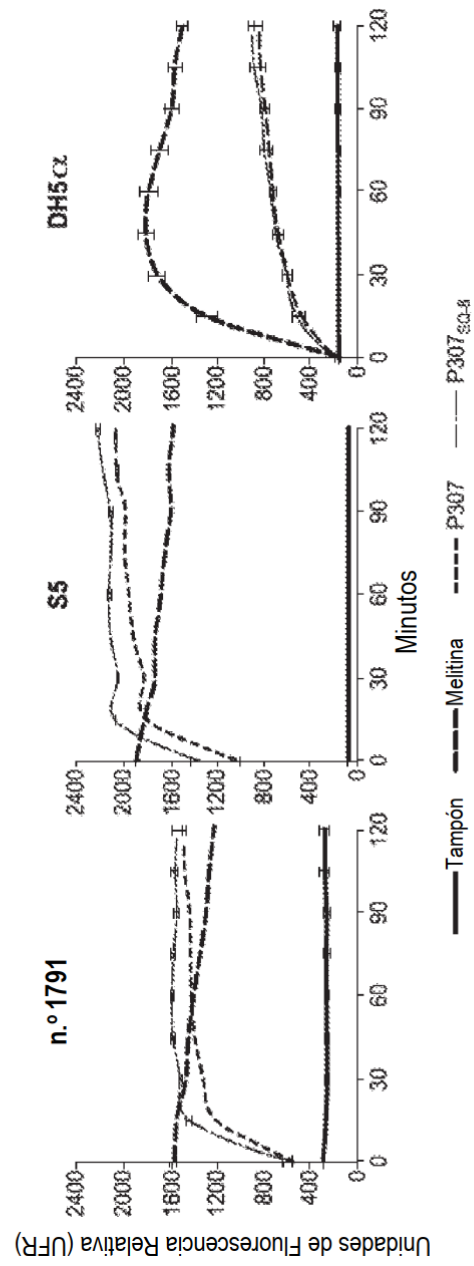


Figura 20

FIG. 21

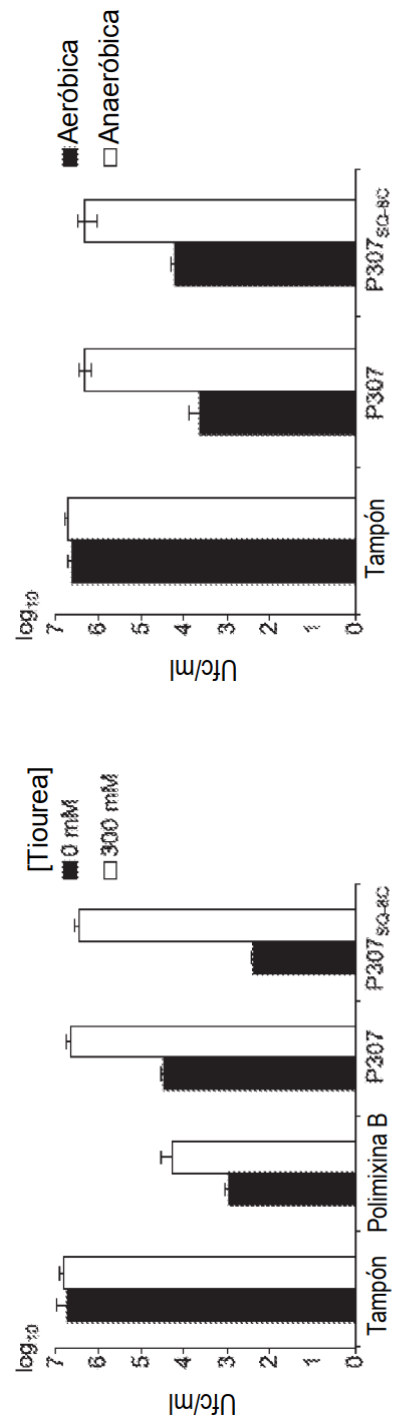


Figura 21A

Figura 21B

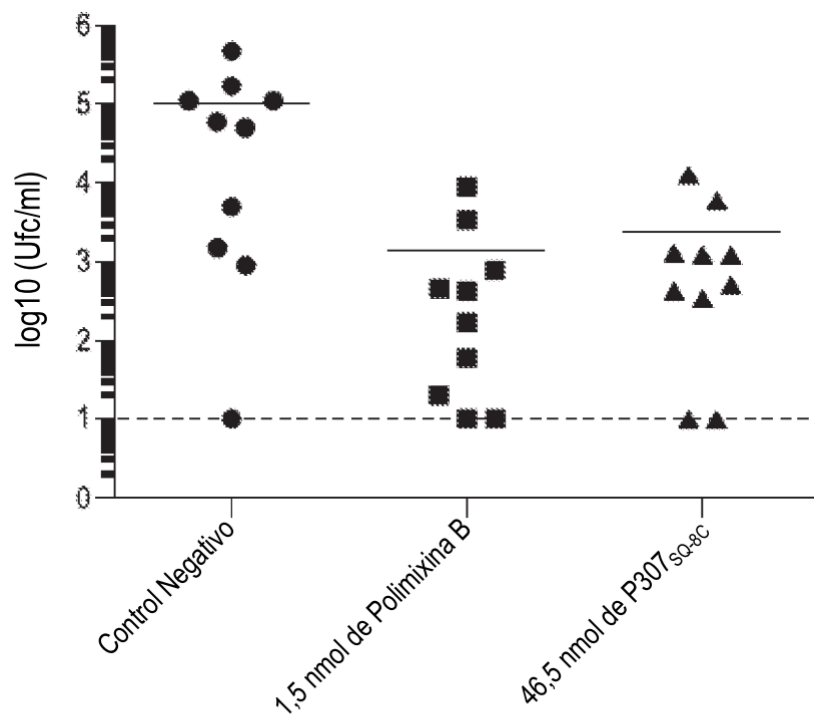


FIG. 22