



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 253**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/79 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99935241 .2**
(86) Fecha de presentación : **06.07.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1095061**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2001**

(54) Título: **Péptidos basados en la secuencia de la lactoferrina humana y sus usos.**

(30) Prioridad: **06.07.1998 SE 9802441**
17.07.1998 SE 9802562
29.12.1998 SE 9804614

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

(73) Titular/es: **PharmaSurgics in Sweden AB.**
Arvid Wallgrens Backe 20
413 46 Göteborg, SE

(72) Inventor/es: **Hanson, Lars, A.;**
Mattsby-Baltzer, Inger;
Baltzer, Lars y
Dolphin, Gunnar, T.

(74) Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 299 253 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos basados en la secuencia de la lactoferrina humana y sus usos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos péptidos y al uso de los mismos, en particular para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, inflamaciones y/o tumores.

10 **Arte anterior**

Durante mucho tiempo se ha conocido que la leche humana es de varias maneras antiinflamatoria debido al hecho de que es pobre en iniciadores y mediadores de la inflamación pero rica en agentes antiinflamatorios (véase por ejemplo Goldman A. S., y otros, Anti-inflammatory properties of human milk, *Acta Paediatr. Scand.* 75:689-695, 15 1986). La leche humana también contiene varios componentes antiinfectantes solubles, tales como lactoferrina (véase por ejemplo a Hanson L. Å., y otros, Protective factors in milk and the development of the immune system, *Pediatrics* 75:172-176, 1983).

La lactoferrina es una glicoproteína aglutinadora de metales de una sola cadena con un peso molecular de 77 kd. Ha sido encontrado que el dominio estructural de la lactoferrina responsable de las propiedades bactericidas es un fragmento separado de la pepsina llamado lactoferricina (véase por ejemplo Bellamy W., y otros, Identification of the bactericidal domain of lactoferrin, *Biochim. Biophys. Acta* 1121:130-136, 1992, y Bellamy W., y otros, Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin, *J. Appl. Bact.* 73:472-479, 1992).

Los receptores de lactoferrina son encontrados en muchos tipos de células incluyendo monocitos y macrófagos, linfocitos de sangre humana periférica estimulados con lectina, células de borde en cepillo, y líneas de células tumorales.

30 Varias publicaciones de patente describen el posible uso de la lactoferrina para el tratamiento de infecciones o inflamaciones. En la WO 98/06425, por ejemplo, es descrito que la lactoferrina y la lactoferricina pueden ser usadas para el tratamiento y prevención de infecciones, inflamaciones y tumores.

La EP-A-0 629 347 describe un agente antimicrobiano que contiene (A) hidrolizado de lactoferrina y/o uno o más péptidos antimicrobianos derivados de lactoferrinas, y (B) uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en proteína metal quelante, tocoferol, ciclodextrina, éster de ácido graso de glicerina, alcohol, EDTA o una sal del mismo, ácido ascórbico o una sal del mismo, ácido cítrico o una sal del mismo, ácido polifosfórico o una sal del mismo, quitosán, cisteína, y ácido cólico como componentes efectivos del mismo. Este agente antimicrobiano está concebido para el tratamiento de productos, y especialmente para el tratamiento seguro por ejemplo de alimentos y medicinas. El agente de acuerdo con esta publicación es por tanto un nuevo conservante. En la publicación son presentadas varias secuencias de péptidos y algunas de ellas se asemejan a los péptidos de acuerdo con la invención, aunque hay varias diferencias importantes descritas más detalladamente a continuación.

45 La US 5,304,633 describe péptidos antimicrobianos aislados a partir de hidrolizados de lactoferrina humana y bovina. Específicamente es descrito el aislamiento de péptidos que corresponden a los aminoácidos 12 a 47, y 17 a 41 de la lactoferrina humana.

La JP 7145196 describe la preparación de péptidos antibióticos mediante la hidrólisis de la lactoferrina. Específicamente es descrita la preparación de un péptido que corresponde a los aminoácidos 17 a 41 de la lactoferrina humana.

55 La JP 8040925 describe composiciones farmacéuticas que contienen péptidos derivados de la lactoferrina y su uso en el tratamiento de daños en la córnea, especialmente la queratitis. Específicamente son descritos los péptidos que corresponden a los aminoácidos 17 a 41, 12 a 58, y 19 a 38, de la lactoferrina humana.

LA JP 7274970 describe la producción recombinante de péptidos derivados de la lactoferricina antibacteriana, específicamente los péptidos que corresponden a los aminoácidos 18 a 42 de la lactoferrina humana.

60 La JP 8143468 describe péptidos derivados de la lactoferrina y su uso como medicamentos antiúlceras, específicamente es descrito un péptido que corresponde a los aminoácidos 19 al 33 de la lactoferrina humana.

Aunque la lactoferrina y la lactoferricina humanas nativas han demostrado tener propiedades antiinflamatorias, antiinfecciosas y antitumorales deseadas, las mismas no pueden ser usadas clínicamente de manera amplia puesto que son sustancias muy costosas debido a los altos costos de producción.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar nuevos péptidos que puedan ser usados para los mismos propósitos que la lactoferrina y/o la lactoferricina y que tengan iguales, o mejores, efectos aun cuando sean mucho más baratos de producir.

El objetivo de los estudios que conducen a la presente invención era diseñar nuevos péptidos que pudieran ser absorbidos en los intestinos. Se ha demostrado que los seres humanos tienen receptores en su membrana en borde de cepillo que pueden unirse a la lactoferrina humana (véase por ejemplo Lönnnerdal B., Lactoferrin receptors in intestinal brush border membranes, Adv. Exp. Med. Biol., 1994, 357:171-175). También se ha demostrado que la lactoferrina bovina no se une a estos receptores. Por tanto los nuevos péptidos deben asemejarse a la lactoferrina humana o la lactoferricina humana pero también deben ser más fáciles y especialmente más baratos de producir. Además, deben ser esencialmente tan eficientes como, o preferiblemente más eficientes que, la lactoferrina humana o la lactoferricina humana en el tratamiento y la prevención de infecciones, inflamaciones y tumores.

Fue encontrado que los péptidos formados por las secuencias constituidas por todos o algunos de los aminoácidos 12-40 de la lactoferrina humana contados desde el extremo terminal N, y preferiblemente versiones modificadas de los mismos descritas en más detalles a continuación, tienen las propiedades deseadas.

De acuerdo con una primera realización de la invención, es mostrado que los péptidos formados por las secuencias constituidas por los aminoácidos 16-40 y aminoácidos 18-40 desde el extremo terminal N de la lactoferrina humana, con algunas alteraciones descritas en más detalles a continuación, tienen las propiedades deseadas. También fue encontrado que las secuencias con solo 14 residuos, que se corresponden aproximadamente con los residuos 18-31 de la lactoferrina humana, tienen iguales, e incluso mejores, propiedades.

De acuerdo con una segunda realización de la invención, es mostrado que el péptido formado por los aminoácidos en las posiciones 12-31, contadas desde el extremo terminal N, en la secuencia que constituye la lactoferrina humana, tiene las propiedades deseadas.

De acuerdo con una tercera realización de la invención es mostrado que los péptidos consisten en los aminoácidos 11-17 que corresponden a las secuencias que comienzan con uno de los aminoácidos en las posiciones 15-21 y terminan con el aminoácido en la posición 31, contadas desde el extremo terminal N, en la secuencia que constituye la lactoferrina humana, así como modificaciones de los mismos.

De acuerdo con una cuarta realización de la invención es mostrado que los péptidos modificados que consisten en 12 aminoácidos basados en la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 20-31 en la lactoferrina humana, contadas desde el extremo terminal N, producen resultados aún mejores para los propósitos de la presente invención.

Un mecanismo plausible para la absorción de estos nuevos péptidos en el cuerpo humano es que los péptidos sean absorbidos en el intestino uniéndose a los receptores específicos antes mencionados de la lactoferrina y luego sean transportados a través de la circulación. Sin embargo, la invención no está limitada de ninguna manera a este mecanismo.

Por tanto, la presente invención se refiere a nuevos péptidos con las secuencias presentadas en el listado de secuencias adjuntado.

Además, la invención se refiere a productos medicinales y alimentos, especialmente alimento preparado para lactantes, que comprenden dichos péptidos.

La invención también se refiere al uso de dichos péptidos para la producción de productos medicinales para el tratamiento y la prevención de infecciones, e inflamaciones.

Los péptidos de acuerdo con la invención son fungicidas y bactericidas, y pueden ser usados por tanto para otras aplicaciones cuando son deseadas sustancias con tales propiedades. Por ejemplo pueden ser usados como conservantes.

Los elementos que caracterizan la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones adjuntadas.

Descripción detallada de la invención

Así, la presente invención se refiere a péptidos que comprenden - aminoácido basado en un fragmento de la proteína lactoferrina humana (hLF). El fragmento de hLF que es usado como base para la invención está constituido por los aminoácidos en las posiciones 12-40, cuya secuencia es:

V-S-Q-P-E-A-T-K-C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R-G-P-P-V-S-C-I-K-R
(SEQ. ID. NO. 100)

ES 2 299 253 T3

En la descripción son usados símbolos de una sola letra para denotar los aminoácidos, mientras en el listado de secuencias adjuntado son usados símbolos de tres letras. Estos símbolos, que son bien conocidos por el especialista en el arte, tienen el siguiente significado: A = Ala = alanina, C = Cys = cisteína, D = Asp = ácido aspártico, E = Glu = ácido glutámico, F = Phe = fenilalanina, G = Gly = glicina, I = Ile = isoleucina, K = Lys = lisina, M = Met = metionina, N = Asn = asparagina, P = Pro = prolina, Q = Gln = glutamina, R = Arg = arginina, S = Ser = serina, T = Thr = treonina, V = Val = valina, W = Trp = triptófano y X = Xaa = un aminoácido variable. Ac y NH₂ en algunas de las secuencias denotan un grupo acetilo (CH₃CO-) y un grupo amino, respectivamente, que han sido usados para modificar los terminales amino y carboxilo de los péptidos.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden tener una forma ya sea lineal o cíclica, la cual es explicada en más detalles a continuación.

Todas las secuencias mencionadas aquí con SEQ. ID. NO. 1-99 son presentadas en el listado de secuencias adjuntado.

La primera realización de la invención se refiere a péptidos cuya secuencia es:

Ac-X-X-T-K-X-F-X-W-Q-R-X-M-R-K-V-R-X-X-X-X-X-X-X-X-NH₂

(SEQ. ID. NO. 1)

donde X en la posición 1 es E o ningún aminoácido, X en la posición 2 es A o ningún aminoácido, X en la posición 5 es C, X en la posición 7 es Q, X en la posición 11 es N y X en las posiciones 17-25 son -G-P-P-V-S-C-I-K-R. Las secuencias para los péptidos de acuerdo con la primera realización de las invenciones son las SEQ. ID. NO. 2-5 en el listado de secuencias adjuntado.

En una versión preferida de la primera realización de la invención X en la posición 1 es E, X en la posición 2 es A, X en la posición 5 es C, X en la posición 7 es Q, X en la posición 11 es N, y X en las posiciones 17-25 son -G-P-P-V-S-C-I-K-R, lo cual produce un péptido cuya secuencia es SEQ. ID. NO. 2. La forma lineal es obtenida mediante la protección de las cadenas laterales de la cisteína por grupos acetamidometilo CH₃CONHCH₂-.

Otra versión preferida de la primera realización de la invención es una forma cíclica de SEQ. ID. NO. 2, obtenida mediante la creación de un enlace disulfuro entre las dos cisteínas en las posiciones 5 y 22, que da como resultado el péptido cíclico cuya secuencia es la SEQ. ID. NO. 3. La creación del enlace disulfuro tiene que ser realizada de manera controlada para evitar la formación de polímeros.

Otra versión preferida de la primera realización de la invención es un péptido algo más corto donde X en la posición 1 en la SEQ. ID. NO. 1 no es ninguno, X en la posición 2 no es ninguno, X en la posición 5 es C, X en la posición 7 es Q, X en la posición 11 es N, y X en las posiciones 17-25 son -G-P-P-V-S-C-I-K-R, lo que da como resultado un péptido cuya secuencia es la SEQ. ID. NO. 4.

Aún otra versión preferida de la primera realización de la invención es una forma cíclica de la SEQ. ID. NO. 4 obtenida mediante la creación de un enlace disulfuro de la misma manera que para la SEQ. ID. NO. 3, lo que da como resultado la SEQ. ID. NO. 5.

En todos esos cuatro péptidos los extremos terminales amino y carboxilo han sido cubiertos, es decir el grupo NH₂ libre en el extremo terminal amino ha sido reaccionado con acetilimidazol para formar la amida CH₃CONH- o AcNH- y el COOH libre en el extremo terminal carboxilo ha sido transformado en CONH₂.

Como es evidente a partir de las secuencias que aparecen anteriormente todos los cuatro péptidos de acuerdo con la primera realización de la invención comprenden los residuos K y R en los extremos terminales carboxilo. Estos residuos son cargados positivamente en condiciones fisiológicas y son capaces de interacciones fuertes y específicas con los receptores. Por tanto son una parte importante de los péptidos de acuerdo con la invención. El residuo T en el extremo terminal amino de todos los péptidos de acuerdo con la invención también puede ser una parte importante en la unión del receptor.

La segunda realización de la invención se refiere al péptido cuya secuencia es:

V-S-Q-P-E-A-T-K-C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R

(SEQ. ID. NO. 8)

y a fragmentos del mismo. Las secuencias para los péptidos de acuerdo con la segunda realización de las invenciones son SEQ. ID. NO. 8, 31 - 32, 34 - 38 en el listado de secuencias adjuntado.

Los péptidos de acuerdo con esta segunda realización de la invención contienen al menos 12 aminoácidos. Péptidos más cortos no tienen los efectos deseados.

La ventaja de los péptidos de acuerdo con la segunda realización de la invención es que forman la parte del fragmento de la lactoferricina de la proteína lactoferrina humana, o una versión modificada de la misma, que los inventores han encontrado como activa en lo que respecta a la invención.

- 5 La tercera realización de la invención se refiere a péptidos consistentes en 11-17 aminoácidos, que comprenden la secuencia:

F-X-W-X-R-X-M-R-K-X-R

10 (SEQ. ID. NO. 43)

Las secuencias para los péptidos de acuerdo con la tercera realización de las invenciones son la SEQ. ID. NO. 47, 49, 51, 63, 67 en el listado de secuencias adjuntado.

- 15 En esta secuencia, los aminoácidos denotados por X o Xaa son glutamina (Q o Gln), asparagina (N o Asn), o valina (V o Val).

- 20 Un grupo preferido de péptidos de acuerdo con la segunda realización de la invención consiste en 14 aminoácidos. Esos péptidos corresponden esencialmente a la secuencia formada por los aminoácidos en las posiciones 18-31, contadas desde el extremo terminal N, en la secuencia que constituye la lactoferrina humana, donde han sido modificados algunos aminoácidos. El péptido en este grupo tiene la secuencia SEQ. ID. NO. 51.

- 25 El péptido de acuerdo con esta realización que se corresponde sobre todo con esta parte de la lactoferrina humana es el péptido con la SEQ. ID. NO. 50 presentada en el listado de secuencias adjuntado. La versión cubierta de esta secuencia tiene la SEQ. ID. NO. 51.

- 30 El aminoácido en la posición 3 en esta secuencia, es decir una cisteína (Co Cys) puede ser substituido por una alanina (A o Ala) o un lisina, el aminoácido en la posición 5, una glutamina, puede ser substituido por una lisina, el aminoácido en la posición 9, una asparagina, puede ser substituido por un ácido aspártico o una lisina, y el aminoácido en la posición 13, una valina, puede ser substituido por un ácido aspártico.

- 35 Cuando el péptido de acuerdo con esta realización comprende una cisteína, puede ser ventajoso substituir esta cisteína por una acetamidometil-cisteína para evitar que el péptido forme un enlace disulfuro con otro péptido que comprende una cisteína. Sin embargo, los aminoácidos glutamina y valina entonces no pueden ser substituidos como fue descrito anteriormente.

- 40 Una ventaja importante de los péptidos de acuerdo con esta realización es que forman la parte, o una versión modificada de la misma, del fragmento de lactoferricina de la proteína lactoferrina humana que los inventores han encontrado como activa en lo que respecta a la invención.

Otra ventaja de los péptidos de acuerdo con esta realización es que son relativamente cortos lo que significa que son más baratos y más fáciles de producir que los péptidos más largos, tales como la propia lactoferrina.

- 45 La cuarta realización de la invención se refiere a péptidos consistentes en 12 aminoácidos. Estos péptidos están basados en una modificación de la secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 20-31 en la lactoferrina humana, contadas desde el extremo terminal N, que corresponde a la SEQ. ID. NO. 46. Las secuencias para los péptidos de acuerdo con la tercera realización de las invenciones son las SEQ. ID. NO. 70, 72 - 76, 80 - 83, 87 - 97 en el listado de secuencias adjuntado. En la secuencia general, la SEQ. ID. NO. 99, Xaa en la posición 3 es preferiblemente Gln o Ala, Xaa en la posición 4 es preferiblemente Trp o Leu, Xaa en la posición 5 es preferiblemente Gln, Lys, Orn, Ala o Nle, Xaa en la posición 6 es preferiblemente Arg, Lys o Ala, Xaa en la posición 7 es preferiblemente Asn, Orn, Ala, o Nle, Xaa en la posición 8 es preferiblemente Met o Leu, y Xaa en la posición 9 es preferiblemente Arg o Lys. En algunos casos puede ser ventajoso dejar que esta secuencia esté precedida por la secuencia Thr-Lys o la secuencia más larga Glu-Ala- Thr-Lys.

- 55 Las variantes preferidas de la cuarta realización de la invención son las SEQ. ID. NO. 70 y SEQ. ID. NO. 74 donde el aminoácido en la posición 3 y la posición 7, respectivamente, en la SEQ. ID. NO. 46 ha sido substituido por una alanina, las SEQ. ID. NO. 81 y SEQ. ID. NO. 83 donde el aminoácido en la posición 6 y la posición 9, respectivamente, en la SEQ. ID. NO. 46 ha sido substituido por una lisina, y las SEQ. ID. NO. 87 y SEQ. ID. NO. 89 donde el aminoácido en la posición 5 y la posición 7, respectivamente, en la SEQ. ID. NO. 46 ha sido substituido por una ornitina. También es posible y en algunos casos preferible, usar versiones cubiertas de estas secuencias de acuerdo con la invención.

- 65 Los péptidos de acuerdo con la invención pueden ser de origen natural, por ejemplo derivados de la lactoferrina humana, o producidos sintéticamente.

En ocasiones los péptidos de acuerdo con la invención son "cubiertos", de manera tal que los terminales amino y carboxilo de los péptidos sean convertidos en amidas, como fue descrito anteriormente. La ventaja de las versiones cubiertas, es decir las secuencias en las cuales los extremos terminales amino y carboxilo han sido reaccionados con el

acetilimidazol para formar la amida $\text{CH}_3\text{CONH-}$ o AcNH- y el COOH libre en el extremo terminal carboxilo ha sido transformado en CONH_2 , es que estos péptidos son neutrales y no cargados y por tanto han cambiado drásticamente las propiedades electrostáticas. Si se asume que los receptores se unen a las secuencias correspondientes de la lactoferrina humana donde no hay cargas terminales N y C, los péptidos cubiertos deben unirse mejor puesto que los mismos en este sentido se asemejan más a la proteína nativa que a los péptidos no cubiertos. En condiciones fisiológicas a un pH de aproximadamente 7, los terminales amino y carboxilo libres serían ionizados y por tanto el péptido llevaría una carga positiva y una negativa.

En algunos casos solo se ha presentado la forma cubierta de una secuencia en el listado de secuencias adjuntado. Sin embargo, también es posible, de acuerdo con la invención, utilizar las formas no cubiertas.

Los péptidos de acuerdo con la invención son convenientes para el tratamiento y/o la prevención de infecciones, y/o inflamaciones. El término “tratamiento” usado aquí se refiere a curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos deletéreos de un estado de la enfermedad, la progresión de la enfermedad u otra condición anormal, y el término “prevención” usado aquí se refiere a minimizar, reducir o suprimir el riesgo de desarrollar un estado de la enfermedad o una progresión u otras condiciones anormales o deletéreas.

Las infecciones tratables con los péptidos o productos medicinales de acuerdo con la invención incluyen las infecciones causadas por todas las clases de patógenos, tales como bacterias, virus, hongos, etc.

También es posible tratar diferentes tipos de inflamaciones. La inflamación es un fenómeno complejo marcado por “enrojecimiento” anormal e hinchazón de tejidos y órganos, dolor y calor en las áreas afectadas, dilatación capilar, infiltración de leucocito, etc. La inflamación es causada sobre todo por la exposición a agentes bacterianos y otros agentes nocivos y lesión física. La inflamación tiene muchas formas y es mediada por una variedad de diferentes citocinas y otras señales químicas. Estos mediadores de la inflamación incluyen el factor α de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), y varios factores estimulantes de colonias (CSFs).

Como fue declarado anteriormente, los péptidos de acuerdo con la invención también son convenientes para el tratamiento de tumores.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden ser usados como tal o incluidos en un producto medicinal o una preparación farmacéutica. El producto medicinal o una preparación farmacéutica de acuerdo con la invención también pueden comprender sustancias usadas para facilitar la producción de la preparación farmacéutica o la administración de las preparaciones. Tales sustancias son bien conocidas por las personas especialistas en el arte y pueden por ejemplo ser coadyuvantes, portadores y conservantes farmacéuticamente aceptables.

Los péptidos o productos medicinales de acuerdo con la invención pueden ser administrados a un paciente sistémica o localmente. El término “paciente” usado aquí se refiere a cualquier persona con riesgo de o que sufre un estado de la enfermedad, progresión de la enfermedad u otra condición anormal o deletérea.

La administración sistémica es conveniente por ejemplo para el tratamiento de la infección en el tracto urinario, colitis y tumores. La administración sistémica puede ser realizada por vía oral, nasal, intravenosa, intraarterial, intracavidad, intramuscular, subcutánea, transdérmica, en supositorios (incluyendo rectales) u otras vías conocidas por los especialistas en el arte. Es preferida la administración oral.

La administración local es conveniente por ejemplo para el tratamiento de infecciones de la piel, de todas las infecciones e inflamaciones en las membranas mucosas etc. La administración local puede ser realizada por vía tópica, oral, nasal, vaginal u orofaríngea. Para el tratamiento de infecciones o inflamaciones locales en la piel o las membranas mucosas los péptidos o productos medicinales de acuerdo con la invención pueden por ejemplo ser incluidos en un gel, una crema, un ungüento, o una pasta.

En el método de acuerdo con la invención una cantidad efectiva de un péptido de acuerdo con la invención es administrada a un paciente. El término “cantidad efectiva” usado aquí se refiere a una cantidad suficiente para tratar o prevenir un estado de la enfermedad, la progresión de la enfermedad u otras condiciones anormales o deletéreas.

Los péptidos o productos medicinales y los métodos de acuerdo con la invención son particularmente bien adecuados para el tratamiento y/o la prevención de la infección en el tracto urinario y la colitis, pero varias otras enfermedades inflamatorias e infecciosas también pueden ser tratadas de acuerdo con la presente invención, tales como enfermedades inflamatorias del intestino, la artritis reumatoide, las condiciones causadas por el virus VIH-1, las condiciones causadas por el virus CMV, y las condiciones causadas por los hongos *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Cryptococcus neoformans*. Este listado no limita de ninguna manera el alcance de la invención.

Los péptidos, los productos medicinales y los métodos de acuerdo con la invención también son bien adecuados para la asistencia médica preventiva reduciendo el riesgo de desarrollar la infección del tracto urinario u otras enfermedades inflamatorias o infecciosas en pacientes con un riesgo creciente de atraer tales complicaciones.

Los péptidos, los productos medicinales y los métodos de acuerdo con la invención pueden ser usados solos, en combinación uno con otro o en combinación con terapia convencional.

De acuerdo con la presente invención también es posible incluir los péptidos, en una cantidad efectiva, en cualquier tipo de alimento o bebida destinados a reducir infecciones e inflamaciones en los pacientes que corren un riesgo creciente de tales condiciones debido a una enfermedad subyacente, a un bajo peso al nacer o a un tratamiento médico. Por ejemplo, es posible incluir los péptidos, en una cantidad efectiva, en un alimento preparado para lactantes destinado a inhibir efectos dañinos de bacterias, tales como pérdida de peso causada por inflamación inducida por bacterias, virus u hongos en niños. Cuando los péptidos de acuerdo con la invención son para ser usados en productos alimenticios, por ejemplo para fines nutricionales, es especialmente preferido usar péptidos de origen natural.

Puesto que los péptidos de acuerdo con la invención tienen efectos antimicrobianos también pueden ser usados como conservantes en diferentes productos alimenticios y productos medicinales tales como geles, cremas, ungüentos, pastas, soluciones, emulsiones etc.

La invención ahora será explicada más detalladamente en los ejemplos siguientes. Estos ejemplos han sido concebidos solo para ilustrar la invención y de ninguna manera deben ser considerados como limitantes del alcance de la invención.

Breve descripción de los dibujos

En los ejemplos que aparecen a continuación, se hace referencia a los dibujos adjuntados en los cuales:

La Fig. 1 muestra el número de bacterias (CFU) presentes en el riñón en ratones con infección en el tracto urinario tratados con dos péptidos de acuerdo con la invención, el péptido 3 y el péptido 4, con la lactoferrina humana, hLF, y con agua, respectivamente.

La Fig. 2 ilustra las concentraciones necesarias del péptido 3 en forma lineal y cíclica, el péptido 4 en forma lineal y cíclica, y el péptido 7 comparado con un péptido de referencia en forma lineal y cíclica para matar el 99% de *C. albicans* con diferente pH.

La Fig. 3 muestra el número de *C. albicans* (CFU) presente en el estómago en ratones, que fueron tratados por vía oral con dos péptidos de acuerdo con la invención, el péptido 3 y el péptido 4, con lactoferrina humana (hLF) y con agua (control), respectivamente, después de la administración intragástrica de *C. albicans*.

La Fig. 4 ilustra el resultado del tratamiento por vía oral de ratones con colitis experimental con el péptido 3 y el péptido 4, y con hLF comparados con el tratamiento con agua (control). La Fig. 4A muestra la ocurrencia de sangre oculta en heces, la Fig. 4B muestra la cantidad de IL-1 β en suero, la Fig. 4C muestra la ocurrencia de sangrado rectal, y la Fig. 4D muestra la longitud del colon.

La Fig. 5A ilustra el número de células positivas CD8 en secciones del tejido del colon distal de los ratones tratados de acuerdo con la Fig. 4.

La Fig. 5B ilustra la expresión de MHC clase II en secciones del tejido del colon distal de los ratones tratados de acuerdo con la Fig. 4.

Ejemplos

En los ejemplos a continuación el péptido 2 denota el péptido de acuerdo con la invención con SEQ. ID. NO. 2, el péptido 3 denota el péptido de acuerdo con la invención con SEQ. ID. NO. 3, etc.

Morinaga 10, Morinaga 11, Morinaga 12, Morinaga 13, Morinaga 24 y Morinaga 25 denotan los péptidos descritos en la EP-A-0 629 347; Morinaga 10 es F-Q-W-Q-R-N (SEC. NO. 10 en la EP-A-0 629 347), Morinaga 11 es F-Q-W-Q-R (SEC. NO. 11 en la EP-A-0 629 347), Morinaga 12 es Q-W-Q-R (SEC. NO. 12 en la EP-A-0 629 347), Morinaga 13 es W-Q-R (SEC. NO. 13 en la EP-A-0 629 347), Morinaga 24 es el péptido cíclico con secuencia K-C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R-G-P-P-V-S-C-I (SEC. NO. 24 en la EP-A-0 629 347), y Morinaga 25 es K-C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R-G-P-P-V-S-C-I (SEC. NO. 25 en la EP-A-0 629 347).

hLF denota lactoferrina humana.

En los ejemplos, las concentraciones microbicidas mínimas (MMC) y las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) fueron determinadas como sigue, a menos que se especifique lo contrario en los ejemplos. Las cepas bacterianas o fungicidas fueron cultivadas en medio BHI durante la noche a 37°C. Un volumen del cultivo fue transferido a un tubo nuevo con BHI e incubado durante dos horas más. Posteriormente las células fueron hechas girar y los pellets fueron suspendidos en medio BHI diluido 1/100 (BHI 1%). La concentración de células bacterianas o fungicidas fue determinada de manera espectrofotométrica a 650 nm. Las concentraciones microbianas también fueron determinadas por conteos viables. Los péptidos diluidos en serie en BHI 1% en dos o diez pasos fueron agregados por triplicado a las cavidades de una placa de microtitulación (200 μ l por cavidad). Las soluciones de células bacterianas o fungicidas fueron agregadas en volúmenes de 10 μ l para obtener una concentración final de aproximadamente 1-5 x 10⁵ células por ml en la cavidad. La microplaca fue incubada a 37°C en una cámara húmeda durante dos horas. Posteriormente fueron extraídos 5 μ l de cada cavidad y agregados como una gota sobre una placa agar sangre y luego incubada durante la noche a 37°C. La microplaca fue incubada durante otras 20 horas a 37°C y luego analizada de manera

ES 2 299 253 T3

espectrofotométrica a 650 nm en un lector de microplaca (Emax, Molecular Devices, E.E.U.U.). La concentración del péptido que causa una reducción del 99% del inóculo después de 2 horas de incubación fue definida como la $MMC_{99\%}$. El valor MIC fue definido como la concentración que no produce ningún aumento en el valor de la absorbencia por encima del nivel base después de 20 horas de incubación.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la síntesis de la fase sólida del péptido 2, el péptido 3, el péptido 4 y el péptido 5 de acuerdo con la invención, y también de los péptidos Morinaga 24 y Morinaga 25 usados en los ejemplos que aparecen a continuación.

Las síntesis fueron realizadas mediante una estrategia de flujo continuo Fmoc en un sintetizador de péptidos automatizado Biosearch Pioneer. Los péptidos fueron sintetizados en una escala de 0.1-0.2 mmol con las resinas PAC-PEG-PS, 0.21 mmol/g para los ácidos de péptidos y Fmoc-PAL-PEG-PS, 0.20 mmol/g para las amidas de péptidos.

Las cadenas laterales de los péptidos de acuerdo con la invención fueron protegidas por grupos tert-butil piperidina estable (para serina y treonina), éster tert-butilo (para ácido glutámico), tert-butiloxycarbonilo (para lisina y triptófano), trifenilmetilo (para asparagina, cisteína, glutamina e histidina), acetamidometilo (para cisteína), y 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofurano-5-sulfonilo (para arginina).

Para los péptidos Morinaga 24 y Morinaga 25, la anexión de isoleucina a la resina PAC-PEG-PS fue realizada usando el anhídrido simétrico de la isoleucina. La resina (1 g, 0.21 mmol) fue dejada hincharse en 3 ml de formamida de dimetilo (DMF). Fmoc-I (10 eq, 2.1 mmol) fue disuelto en 5 ml de diclorometano (DMC) y 5 gotas de DMF. Carbodiimida de diisopropilo (DIPCDI) (5 eq, 1.05 mmol) fue agregada a la solución de aminoácidos después de lo cual fue dejada durante 20 minutos a 0°C. El DCM fue eliminado a presión reducida y el aceite restante fue disuelto en DMF y añadido a la resina. Dimetilaminopiridina (DMAP) (1 eq) fue agregada a la resina y la mezcla fue dejada a temperatura ambiente con arremolinamiento ocasional durante 1 hora. Después de lavada con DCM la resina estuvo lista para la síntesis peptídica.

La eliminación del grupo de protección α -amino (Fmoc) fue realizada con piperidina 20% en DMF durante 7 minutos. Todos los acoplamientos tuvieron lugar en DMF, usando en 4 veces un exceso de aminoácido activado sobre el péptido y 4 eq de tetrafluoroborato de benzotriazolil tetrametiluronio de (TBTU): etilamina de diisopropilo (DIPEA) (1:2, mol/mol). Un exceso de seis veces de hidroxibenzotriazol (HOBt) fue añadido a los acoplamientos de los residuos de cisteína (acetamidometilo y trifenilmetilo).

El péptido 2, el péptido 3, el péptido 4, y el péptido 5 fueron acilados en el terminal amino usando una solución 0.3 M del anhídrido acético en DMF.

La desprotección final y la separación del péptido de la resina fueron realizados durante 2 horas a temperatura ambiente usando una mezcla de 9.25 ml de ácido trifluoro acético (TFA), 250 μ l de agua, 250 μ l de etanoditiolo y 250 μ l de triisopropilsilano por g de resina peptídica. La resina fue eliminada por filtración. El péptido fue precipitado mediante el uso de dietiléter frío, centrifugado y suspendido de nuevo en dietiléter fresco dos veces más para extraer los depuradores y TFA. Los péptidos fueron disueltos en agua y liofilizados.

La ciclación de los péptidos enlazados al disulfuro, péptido 3 y péptido 5, fue realizada en material sin purificar. Aproximadamente 200 mg del péptido fueron disueltos en 1 l de agua desgasificada. Fue agregado hidrógeno carbonato de amonio hasta que el pH estuvo en el rango de 6-7 y la mezcla fue dejada con agitación y en contacto con el aire durante alrededor de 1 día, y finalmente fue liofilizada.

Los péptidos fueron purificados por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa eluyendo con mezclas isocráticas de isopropanol (IPA 12-16%) y TFA 0.1%. Fueron usadas dos columnas diferentes, Microsorb, C-8 41.4x250 mm, 8 μ m (columna A), e Hichrom, C-8 25x250 mm, 7 μ m (columna B). Los péptidos eluyeron como picos amplios con los tiempos de retención (R) presentados en la tabla 1 a continuación. La identificación fue hecha por ES-MS. MW denota en la tabla el peso molecular.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la síntesis en fase sólida del péptido 6 y del péptido 7 de acuerdo con la invención.

Las síntesis fueron realizadas como fue descrito en el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones del procedimiento sintético. Las cadenas laterales de la lactama que forman los aminoácidos K en la posición 5 y D en la posición 9 fueron protegidas por 1(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-ilideno)etilo (Dde) y éster de 4-{N-[1(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil]-amino}bencilo (ODmab), respectivamente.

Después de completada la síntesis de la secuencia cubierta, los grupos Dde y ODmab fueron eliminados por hidracina 2% (v/v) en DMF durante 10 minutos. La resina fue lavada con DHF, DIPEA 1M en DMF y finalmente por DMF.

ES 2 299 253 T3

En el caso del péptido 7 la formación de lactama entre las cadenas laterales fue dejada proceder durante 8 horas después de la adición de un exceso de cuatro veces de hexafluorofosfato de azabenzotriazolil tetrametiluronio (HATU): DIEPEA, 1:2 en DMF. La resina fue lavada con los siguientes solventes/soluciones: DMF, piperidina 20% en DMF, metanol y DCM. La resina fue secada al vacío, y el péptido fue separado de la resina como fue descrito anteriormente.

El péptido 7 eluyó como un pico amplio con los tiempos de retención (R) presentados en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Péptido	Columna	% IPA	Flujo (ml/min)	R (min.)	MW (encontrado/calc.)
Péptido 2	B	14	15	11	3201/3204.7
Péptido 3	A	13	80	16	3057.1/3060.7
Péptido 4	A	14	80	12	3002.4/3004.0
Péptido 5	B	14	15	10	no determinado
Péptido 7	B	12	18	12	no determinado
Morinaga 24	B	16	15	20	2575/2576.0
Morinaga 25	B	16	15	18	3430/3432.0

Ejemplo 3

En este ejemplo la actividad bactericida de los péptidos de acuerdo con la invención fue probada y comparada con la actividad bactericida de la lactoferrina humana.

La lactoferrina humana (hLF), el péptido 3, y el péptido 4, respectivamente, fueron incubados con dos cepas diferentes de *E. coli*, *E. coli* O14 (experimento I) y O6K5 (experimento II), en medio de cultivo diluido (1/100 BHI - infusión cerebro corazón) durante 2 horas. Los péptidos también fueron incubados con *E. coli* O14 en KCl 0.05 mM de (pH 7) sin ningún medio de cultivo (experimento III). Fueron probadas diferentes concentraciones de los péptidos.

Después de la incubación, fueron tomadas muestras para el cultivo bacteriano sobre placa. Fueron usadas disoluciones seriadas de cinco y cuatro pasos en los experimentos I y II, respectivamente, y dos pasos en el experimento III.

Las concentraciones de los diferentes péptidos requeridos para matar 100% (experimentos I y II) o 90% (experimento III) de las bacterias son mostradas en la tabla 2.

TABLA 2

Exp.	Agente	Concentración del agente para matar 100%/90% (µg/ml)
I	hLF	400
I	péptido 3	4.4
I	péptido 4	4.4
II	hLF	2000
II	péptido 4	≤ 7.8
III	hLF	> 4000
III	péptido 3	12.5
III	péptido 4	3.2

ES 2 299 253 T3

De la tabla 2 es evidente que los péptidos de acuerdo con la invención fueron mucho más eficientes como agentes bactericidas que la lactoferrina humana.

5 Ejemplo 4

En este ejemplo la actividad fungicida de los péptidos de acuerdo con la invención fue probada y comparada con la actividad fungicida de la lactoferrina humana. Diferentes concentraciones de hLF, del péptido 3 y del péptido 4 fueron incubadas con diferentes cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei* durante 1-2 horas a 37°C en KCL 0.05 mM a pH 7.0 en dos ocasiones diferentes - experimento I y II, respectivamente. Después de la incubación fueron tomadas muestras para el cultivo sobre placa en placas Saboroud. Las concentraciones de los diferentes péptidos requeridos para matar 99% de los hongos son mostradas en la tabla 3.

15 TABLA 3

Exp.	Cepas de <i>Candida</i>	Concentración de agentes para matar 99% ((µg/ml)			proporción hLF/	
		hLF	péptido 3	péptido 4	/pep. 3	/pep. 4
I	<i>C. albicans</i> ATCC 64549	> 50	0.6	1.25	> 83	> 40
I	<i>C. albicans</i> CCUG 90028	> 50	0.6	1.25	> 83	> 40
I	<i>C. krusei</i> CCUG 35849	12.5	0.6	1.25	21	10
I	<i>C. krusei</i> CCUG 969	25	1.25	2.5	20	10
II	<i>C. albicans</i> ATCC 64549	> 200	1.5	1.5	> 133	> 133
II	<i>C. albicans</i> CCUG 599	> 200	1.5	1.5	> 133	> 133
II	<i>C. albicans</i> CCUG 1759	> 200	1.5	1.5	> 133	> 133

La resultados en la tabla 3 muestran que los péptidos de acuerdo con la invención fueron agentes fungicidas mucho más eficientes que la lactoferrina humana.

Ejemplo 5

En este ejemplo fue realizada una prueba *in vitro* para estudiar la actividad antiinflamatoria de los péptidos de la actividad de acuerdo a la invención. Más exactamente, el efecto inhibitor de los péptidos de acuerdo con la invención en la respuesta a IL-6 inducida por LPS en una línea celular monocítica (THP-1) fue estudiado y comparado con el efecto de la lactoferrina humana por medio del método descrito por I. Mattsby-Baltzer y otros, *Pediatr. Res.* 40:257-262, 1996. La respuesta a IL-6 en las células THP-1 fue inducida por la adición de LPS. La hLF, el péptido 3 y el péptido 4, respectivamente, fueron agregados 30 minutos después del LPS. Una inhibición significativa fue obtenida con el péptido 4, como es mostrado en la tabla 3 a continuación. La actividad inhibidora del péptido 3 fue similar a la actividad inhibidora de la lactoferrina humana.

TABLA 4

Agente	% de inhibición de la respuesta a LPS
hLF	15
péptido 3	17
péptido 4	39

Ejemplo 6

El péptido 3 y el péptido 4 de acuerdo con la invención también fueron probados en un estudio en vivo para demostrar su efecto sobre la infección del tracto urinario.

La *E. coli* O6K5 fue instilada en la vejiga urinaria de ratones. 30 minutos después de la instilación los diferentes agentes especificados en la tabla 5 fueron administrados oralmente en una cantidad de 500 μ g por ratón y 24 horas después de la instilación fue determinado el número de bacterias (CFU) presentes en la vejiga y el riñón. El resultado es mostrado en la tabla 5.

El grupo de control consistió en 10 animales en el experimento I y 23 animales en el experimento II. A los animales de los grupos de control se les suministró agua del grifo en lugar de péptido o hLF.

TABLA 5

Exp.	Agente	Cepa de ratón	No. de animales	Comparación estadística* del grupo de tratamiento con el grupo de control del número de bacterias, CFU, presentes en el riñón
I	péptido 4	CH/HeN	11	p= 0.0137
II	péptido 3	C3H/Tif	23	p= 0.0574
II	péptido 4	C3H/Tif	23	p= 0.0102
II	hLF	C3H/Tif	23	p= 0.006

* Mann-Whitney

Los resultados del experimento II también son ilustrados en la figura 1.

Así, los péptidos de acuerdo con la invención son capaces de reducir el número de las bacterias en el riñón.

Ejemplo 7

En este ejemplo fue realizada una prueba *in vitro* para comparar la actividad bactericida y fungicida de los péptidos de acuerdo con la invención con péptidos descritos en la EP-A-0 629 347. El péptido usado de acuerdo con la invención fue el péptido 4, y los péptidos de acuerdo con la EP-A-0 629 347 llamados Morinaga 10, Morinaga 11, Morinaga 12, y Morinaga 13.

Los péptidos fueron incubados con *E. coli* O14 y *Candida albicans*. Fueron probadas dos concentraciones células de levadura de *C. albicans*, $5 \cdot 10^6$ y $5 \cdot 10^3$ por ml. Fueron probadas diferentes concentraciones de los péptidos.

Después de la incubación, fueron tomadas muestras para el cultivo bacteriano sobre placa. Disoluciones seriales de diez pasos fueron usadas en los experimentos marcados con I en la tabla 5 y de dos pasos en los experimentos marcados con II.

Las concentraciones de los diferentes agentes requeridos para matar 100% de las bacterias son mostradas en la tabla 6.

TABLA 6

Agente	Concentración de agente para matar 100% ($\mu\text{g/ml}$)			
	E. coli O14		C. albicans	
			I	
	I	II	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^3$
péptido 4	> 10, <100	12	> 10, <100	10
hLF	Nd	nd	> 1000	> 2000
Morinaga 10	> 500	1000	> 2000	> 2000
Morinaga 11	> 500	nd	> 2000	> 2000
Morinaga 12	> 500	nd	> 2000	> 2000
Morinaga 13	> 500	nd	> 2000	> 2000

nd = no determinado

De la tabla 6 es evidente que el péptido de acuerdo con la invención es un agente bactericida mucho más eficiente que los péptidos cortos descritos en la EP-A-0 629 347 y la lactoferrina humana.

Ejemplo 8

La actividad fungicida e inhibidora del péptido 2, el péptido de 3, el péptido 4, y el péptido 7 de acuerdo con la invención fue comparada con los péptidos descritos en la EP-A-0 629 347 que más se asemejan a los péptidos de acuerdo con la invención, es decir, Morinaga 24 y Morinaga 25.

La *Candida albicans* ATCC 64549 ($1 \cdot 10^5/\text{ml}$) fue incubada en presencia de los péptidos durante 2 horas a 37°C en medio de cultivo diluido (BHI, disoluciones seriales dobles comenzando con $50 \mu\text{g/ml}$). La actividad fungicida fue medida cultivando $5 \mu\text{l}$ de cada cavidad de incubación en las placas agar de Saboroud. Las concentraciones de los diferentes agentes requeridos para matar 100% de las bacterias son mostradas en la tabla 7.

La inhibición del crecimiento fue medida de manera espectrofotométrica después de 20 horas de incubación. La concentración del agente necesaria para la inhibición del crecimiento es mostrada en la tabla 7.

TABLA 7

Agente	Concentración del agente para matar 100% ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración del agente para la inhibición del crecimiento ($\mu\text{g/ml}$)
Péptico 2	6.2	6.2
Péptico 3	6.2	6.2
Péptico 4	6.2	6.2
Péptico 7	3.1	1.5
Moringa 24	12.5	12.5
Moringa 25	6.2	6.2

Este ejemplo muestra que el péptido 2, el péptido 3, y el péptido 4 de acuerdo con la invención son más eficientes con respecto a la actividad fungicida e inhibidora que el péptido lineal Morinaga 24 y que el péptido 7 de acuerdo con la invención es incluso un mejor agente fungicida e inhibidor del crecimiento de hongos.

Ejemplo 9

La actividad bactericida e inhibidora del péptido 2, del péptido 3, del péptido 4, y del péptido 7 de acuerdo con la invención fue también comparada con las actividades de Morinaga 24 y Morinaga 25.

La *E. coli* O14 fue incubada como fue descrito anteriormente en presencia de los péptidos durante 2 horas. La actividad bactericida fue medida del mismo modo descrito anteriormente. Las concentraciones de los diferentes agentes requeridos para matar 100% de las bacterias son mostradas en la tabla 8.

La inhibición del crecimiento fue medida de manera espectrofotométrica después de la incubación durante 20 horas. La concentración del agente necesario para la inhibición del crecimiento es mostrada en la tabla 8.

TABLA 8

Agente	Concentración del agente para matar 100% ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración del agente para la inhibición del crecimiento ($\mu\text{g/ml}$)
Péptido 2	25	6.2
Péptido 3	12.5	3.1
Péptido 4	12.5	3.1
Péptido 7	12.5	≤ 1.5
Morinaga 24	25	6.2
Morinaga 25	12.5	3.1

Este ejemplo muestra que el péptido 2, el péptido 3 y péptido 4 de acuerdo con la invención tienen efectos bactericidas e inhibidores que son aproximadamente iguales que aquellos para Morinaga 24 y Morinaga 25, pero que el péptido 7 es mucho más eficiente en lo que respecta a la inhibición del crecimiento de bacterias.

ES 2 299 253 T3

Ejemplo 10

En este ejemplo, la actividad microbicida y microbiostática de los péptidos de acuerdo con la invención fue probada y comparada con los dos péptidos de referencia.

La *C. albicans* (ATCC64549) y *E. coli* O6, respectivamente, fueron incubadas con los diferentes péptidos. Los experimentos fueron realizados con 1, 10, 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$ del péptido. Los resultados son mostrados en la tabla 9.

TABLA 9

Péptido	C. albicans		E. coli	
	MMC _{99%}	MIC	MMC _{99%}	MIC
Péptido 44	10	10	10	10
Péptido 46	10	10	10	10
Péptido 48	10	10	10	10
Péptido 50	10	10	10	10
Péptido 51	10	10	10	10
Péptido 53	10	10	10	10
Péptido 57	25	10	10	10
Péptido 61	10	10	10	10
Péptido 63	10	10	10	10
Péptido 64	25	10	10	10
Péptido 67	10	10	10	10
Péptido 40	25	25	> 25	> 25
Péptido 33	100	10	25	10

De la tabla, es evidente que los péptidos de acuerdo con la invención tienen actividad microbicida y microbiostática muy buena, aunque el péptido más corto, el péptido 40, y el péptido más largo, el péptido 33, no muestran tan buenos resultados como los otros péptidos.

Ejemplo 11

En este ejemplo fueron estudiadas las actividades de los péptidos de acuerdo con la invención en la matanza de *C. albicans* y en la inhibición del crecimiento de *C. albicans*.

Células de levadura *C. albicans* (ATCC64549) fueron incubadas durante 2 horas a pH 4.5 en medio BHI diluido a 1% de la concentración original que contenía 25 $\mu\text{g/ml}$ del péptido. Posteriormente las soluciones fungicidas fueron cultivadas sobre placas agar sangre. OD₆₅₀ fue medido después de la incubación durante 18 horas adicionales.

El efecto fungicida de los péptidos en *C. albicans* fue determinado como la capacidad del péptido de matar respectivamente 100% y 99% de los hongos, mientras el efecto inhibidor del crecimiento fue determinado midiendo el OD₆₅₀. Existió un efecto inhibidor cuando no se registró ningún aumento en OD₆₅₀. Los resultados son mostrados en la tabla 10.

TABLA 10

Péptido	C. albicans		
	matanza:		inhibición:
	100%	99%	
Péptido 44	-	-	-
Péptido 46	+	+	+
Péptido 48	+	+	+
Péptido 50	+	+	+
Péptido 51	+	+	+
Péptido 6	-	+	-
Péptido 57	+	+	+
Péptido 61	-	+	+
Péptido 62	-	+	+
Péptido 64	-	+	+
Péptido 66	-	+	+
Péptido 40	-	-	-
Péptido 33	-	-	-

matanza: + = 100/99% de las bacterias son matadas
 - = menos de 100/99% de las bacterias son matadas

inhibición: + = no se aprecia ningún aumento en OD₆₅₀
 - = OD₆₅₀ continúa aumentando

De la tabla, es evidente que los péptidos de acuerdo con la invención, especialmente los Péptidos 46, 48, 50, 51, y 57, tienen mejor efecto en la matanza y la inhibición del crecimiento de *C. albicans* que los péptidos de referencia.

Ejemplo 12

En este ejemplo, los péptidos de acuerdo con la invención fueron usados para estudiar el efecto en la matanza de diferentes bacterias. Las diferentes bacterias usadas son mostradas en la tabla 11.

Los péptidos fueron usados en una concentración de 25 µg/ml.

Los resultados son mostrados en la tabla 11.

TABLA 11

Péptido	Bacterias				
	E. faecalis	S. epidermis	S. aureus	K. pneumoniae	P. aeruginosa
Péptido 44	+	+	+	-	-
Péptido 46	+	+	+	+	+
Péptido 48	+	+	+	+	+
Péptido 50	+	+	+	+	+
Péptido 51	+	+	+	+	+
Péptido 6	+	+	+	+	+
Péptido 57	+	+	+	+	+
Péptido 61	+	+	+	+	+
Péptido 62	+	+	+	+	+
Péptido 64	+	+	+	-	-
Péptido 66	+	+	+	-	-
Péptido 40	-	+	-	-	-
Péptido 33	+	+	+	-	-

+ = 99% de las bacterias son matadas

- = menos del 99% de las bacterias son matadas

De la tabla, es evidente que los péptidos de acuerdo con la invención, especialmente los Péptidos 46-62, tienen efecto muy bueno en la matanza de bacteria, aunque el péptido más corto, péptido 40, y el péptido más largo, péptido 33, no muestran tan buenos resultados como los otros péptidos.

Ejemplo 13

En este ejemplo las concentraciones necesarias de tres péptidos de acuerdo con la invención para matar 99% de *C. albicans* a diferente pH fueron comparadas con un péptido de referencia. Los péptidos de acuerdo con la invención fueron el péptido 2 (lineal), péptido 3 (cíclico), péptido 4 (lineal), péptido 5 (cíclico) y péptido 7 (con enlace lactama), todos cubiertos. Los péptidos de referencia usados fueron una forma cíclica descubierta y una forma lineal descubierta de un péptido Morinaga, Morinaga 24 y 25. Los resultados son ilustrados en la Fig. 2. De la figura es evidente que los péptidos lineales cubiertos 3 y 4 así como el péptido 7 que contiene el enlace lactama tienen mejores efectos que los péptidos cíclicos cubiertos de acuerdo con la invención, y que todos los péptidos lineales cubiertos de acuerdo con la invención además del péptido 7 tienen mejores efectos que los péptidos lineales y cíclicos, descubiertos de referencia (Morinaga 24 y 25) a pH 4.5. El péptido más efectivo a todos los diferentes pH fue el péptido 7.

Ejemplo 14

En este ejemplo fue estudiada la prevención de la colonización de *C. albicans* en el estómago administrando a los ratones por vía oral lactoferrina humana (HLF), el péptido con SEQ. ID. NO. 3 y el péptido con SEQ. ID. NO. 4. Una dosis de 10^8 de *C. albicans* fue administrada intragástricamente a los ratones. Tres días después la HLF o el péptido fueron administrados dos veces al día (en un total de 1 mg por día) durante tres días, y al cuarto día se les dio muerte a los ratones. El número de *C. albicans* en el estómago fue determinado cultivando y contando las unidades de formación de colonias (CFU por ml). Los resultados son ilustrados en la figura 3. A partir de los resultados es evidente que los péptidos reducen con eficiencia el crecimiento de *C. albicans* en el estómago.

Ejemplo 15

En este ejemplo fueron estudiados los efectos antiinflamatorios de los péptidos de acuerdo con la invención en colitis experimental en ratones. Colitis aguda fue inducida en ratones C57B1/6J administrando dextranosulfato (5%) a través del agua potable (ad lib). El péptido 3 y el péptido 4, así como la lactoferrina humana (hLF), fueron administrados por vía oral a los ratones al comenzar el tratamiento con dextranosulfato. Los animales fueron matados al día 2.

Fue encontrado que la sangre en heces de ratones tratados con los péptidos de acuerdo con la invención ocurrió en menos animales en comparación con el grupo de control tratado con agua dos días después del tratamiento, como es mostrado en la Fig. 4 A.

Otra indicación del hecho de que los péptidos de acuerdo con la invención son antiinflamatorios, son las reducidas concentraciones de citocina inflamatoria IL-1 β presente en sueros de los ratones tratados de acuerdo con la invención, como es ilustrado en la Figura 4 B, así como la reducida ocurrencia de sangrado rectal, como es mostrado en la Fig. 4C.

Otra medición de la inflamación en el colon es la longitud del colon - un colon acortado es inductivo de inflamación. Fue encontrado, como es mostrado en la Fig. 4D, que el colon de los ratones tratados de acuerdo con la invención era más largo que el colon de los ratones en el grupo de control.

Posteriormente el número de células positivas CD8 y MHC clase II fue estudiado en secciones del tejido del colon distal de los ratones, y los resultados son mostrados en la Fig. 5. De la Fig. 5A, está claro que el número de células T positivas CD8 en secciones del tejido del colon distal de los ratones tratados con los péptidos de acuerdo con la invención es perceptiblemente más bajo que el del grupo de control tratado con agua.

De la Fig. 5B está claro que la ocurrencia de células que expresan MHC clase II (macrófagos, células dendríticas y células B) en secciones del tejido del colon distal de los ratones tratados con los péptidos de acuerdo con la invención es más alto que para el grupo de control no tratado, y similar al de animales sanos sin colitis aguda. Estos resultados indican que los ratones tratados con los péptidos de acuerdo con la invención disminuyen o retrasan su respuesta celular local.

Así, los péptidos de acuerdo con la invención son eficaces en la reducción de la inflamación misma así como los síntomas clínicos.

Ejemplo 16

En este ejemplo la actividad fungicida de uno de los péptidos de acuerdo con la invención, el péptido con SEQ. ID. NO. 7, fue comparada con los agentes antimicóticos convencionales flucitosina y fluconazol, y también con la lactoferrina humana (hLF). Los agentes antimicóticos fueron probados en *C. albicans* (ATCC 64549) en una concentración de 2×10^5 células/ml. Las pruebas fueron realizadas en medio BHI diluido 1/100. Los resultados son mostrados en la tabla 12.

TABLA 12

Agente antimicóticos	MMC _{99%} (μ g/ml)	MIC (μ g/ml)
Flucitosina ^{*)}	> 500	250
Fluconazol	> 500	> 500
hLF	> 1000	1000
Péptido 7	6.2	6.2

*) Esto puede ser inhibido por medios no sintéticos, no obstante una disolución de 1/100 del medio usado aquí disminuye este riesgo.

Es evidente por los resultados de la tabla 12 que el péptido de acuerdo con la invención es claramente más efectivo que las otras sustancias.

ES 2 299 253 T3

Ejemplo 17

También en este ejemplo uno de los péptidos de acuerdo con la invención - esta vez el péptido con SEQ. ID. NO. 4, fue comparado con un fungicida convencional, anfotericina. Fue estudiada la actividad antimicótica contra *C. albicans*. Fueron usadas disoluciones dobles seriales con una concentración inicial de 20 µg/ml. Como medio de cultivo fue usado BHI diluido 1/100.

TABLA 13

Agente fungicida	MMC _{99%} (µg/ml)	MIC (µg/ml)
Péptido 4	5.0	5.0
Anfotericina	2.5	0.6

Es evidente de la tabla 13 que la actividad del péptido de acuerdo con la invención es comparable con el fungicida convencional.

Ejemplo 18

En este ejemplo fue estudiada la actividad bactericida de dos de los péptidos de acuerdo con la invención en una prueba con un *S. aureus* multiresistente. Fue usada una solución bacteriana con una concentración de 5.0×10^5 *S. aureus* bacteriano por ml. La concentración de cada péptido necesaria para matar 99% de las bacterias (MMC_{99%}) fue determinada después de 2 horas y después de 24 horas de incubación a 37°C. Los resultados son ilustrados en la tabla 14 a continuación.

TABLA 14

SEQ. ID. NO.	MMC _{99%} (µg/ml)	
	2 horas	24 horas
4	5.0	≤ 0.32
48	5.0	≤ 0.32

Ejemplo 19

En este ejemplo la actividad bactericida de tres de los péptidos de acuerdo con la invención fue estudiada en una prueba con una cepa de referencia de *S. aureus*. Fue usada una solución bacteriana con una concentración de 5.0×10^5 *S. aureus* bacteriano por ml. La concentración de cada péptido necesario para matar 99% de las bacterias (MMC_{99%}) fue determinada después de 2 horas de incubación a 37°C. La concentración más baja probada fue de 6.25 µg/ml. Los resultados son ilustrados en la tabla 15 a continuación.

TABLA 15

SEQ. ID. NO.	MMC _{99%} (µg/ml) 2 horas
36	< 6.25
98	< 6.25
7	< 6.25

Ejemplo 20

En este ejemplo fue realizada una llamada exploración de alanina del péptido con SEQ. ID. NO. 46, C-F-Q-W-Q-R-N-M-R-K-V-R. En esta exploración de alanina cada aminoácido fue substituido uno a uno por una alanina, dando como resultado los péptidos ilustrados en la tabla 16 a continuación.

TABLA 16

Exp. No.	aminoácido en la posición												SEQ. ID. NO.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	A	F	Q	W	Q	R	N	M	R	K	V	R	68
2	C	A	Q	W	Q	R	N	M	R	K	V	R	69
3	C	F	A	W	Q	R	N	M	R	K	V	R	70
4	C	F	Q	A	Q	R	N	M	R	K	V	R	71
5	C	F	Q	W	A	R	N	M	R	K	V	R	72
6	C	F	Q	W	Q	A	N	M	R	K	V	R	73
7	C	F	Q	W	Q	R	A	M	R	K	V	R	74
8	C	F	Q	W	Q	R	N	A	R	K	V	R	75
9	C	F	Q	W	Q	R	N	M	A	K	V	R	76
10	C	F	Q	W	Q	R	N	M	R	A	V	R	77
11	C	F	Q	W	Q	R	N	M	R	K	A	R	78
12	C	F	Q	W	Q	R	N	M	R	K	V	A	79

Ejemplo 21

En cada uno de los experimentos en este ejemplo uno de los aminoácidos en las posiciones 4, 6, 8 y 9 en el péptido con SEQ. ID. NO. 46 fue substituido por un aminoácido similar. En el experimento 1 el triptófano en la posición 4 fue substituido por una leucina, en el experimento 2 la arginina en la posición 6 fue substituida por una lisina, en el experimento 3 la metionina en la posición 8 fue substituida por una leucina, y en el experimento 4 la arginina en la posición 9 fue substituida por una lisina. Los péptidos resultantes son ilustrados en la tabla 17.

TABLA 17

Exp. No.	aminoácido en la posición												SEQ. ID. NO.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	C	F	Q	L	Q	R	N	M	R	K	V	R	80
2	C	F	Q	W	Q	K	N	M	R	K	V	R	81
3	C	F	Q	W	Q	R	N	L	R	K	V	R	82
4	C	F	Q	W	Q	R	N	M	K	K	V	R	83

Ejemplo 22

En cada uno de los experimentos en este ejemplo uno de los aminoácidos en las posiciones 5, 6, y 7 en el péptido con SEQ. ID. NO. 46 fue substituido por un aminoácido cargado negativamente. En el experimento 1 la glutamina en la posición 5 fue substituida por ácido glutámico, y en el experimento 2 la arginina en la posición 6 fue substituida por ácido glutámico, y en el experimento 3 la asparagina en la posición 7 fue substituida por ácido glutámico. Los péptidos resultantes son ilustrados en la tabla 18.

ES 2 299 253 T3

TABLA 18

Exp. No.	aminoácido en la posición												SEQ. ID. NO.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	C	F	Q	W	E	R	N	M	R	K	V	R	84
2	C	F	Q	W	Q	E	N	M	R	K	V	R	85
3	C	F	Q	W	Q	R	E	M	R	K	V	R	86

Ejemplo 23

En cada uno de los experimentos en este ejemplo un aminoácido neutral en el péptido con SEQ. ID. NO. 46 fue remplazado por un aminoácido cargado positivamente o uno neutral. En el experimento 1 la glutamina en la posición 5 fue remplazado por una ornitina, en el experimento 2 la glutamina en la posición 5 fue remplazada por una norleucina, en el experimento 3 la asparagina en la posición 7 fue remplazada por una ornitina, y en el experimento 4 la asparagina en la posición 7 fue remplazada por una norleucina. Los péptidos resultantes son ilustrados en la tabla 19.

TABLA 19

Exp. No.	aminoácido en la posición												SEQ. ID. NO.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	C	F	Q	W	Orn	R	N	M	R	K	V	R	87
2	C	F	Q	W	Nle	R	N	M	R	K	V	R	88
3	C	F	Q	W	Q	R	Orn	M	R	K	V	R	89
4	C	F	Q	W	Q	R	Nle	M	R	K	V	R	90

Ejemplo 24

En cada uno de los experimentos en este ejemplo uno o varios de los aminoácidos en el péptido con SEQ. ID. NO. 46 fueron remplazados por otros aminoácidos. En el experimento 1 la glutamina en la posición 5 fue remplazada por una lisina, en el experimento 2 la glutamina en la posición 5 fue remplazada por una lisina y la asparagina en la posición 7 fue remplazada por una alanina, en el experimento 3 la glutamina en la posición 3 fue remplazada por una alanina y la glutamina en la posición 5 fue remplazada por una lisina, en el experimento 4 la glutamina en la posición 3 y la asparagina en la posición 7 fueron remplazadas por alaninas, en el experimento 5 el triptófano en la posición 4 fue remplazada por una leucina, y las argininas en la posición 6 y la posición 9 fueron remplazadas por lisinas, y en el experimento 6 la glutamina en la posición 3 y la asparagina en la posición 7 fueron remplazadas por alaninas, el triptófano en la posición 4 fue remplazado por una leucina, y la glutamina en la posición 5 y las argininas en las posiciones 6 y 9 fueron remplazadas por lisinas. Los péptidos resultantes son ilustrados en la tabla 20.

TABLA 20

Exp. No.	aminoácido en la posición												SEQ. ID. NO.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	C	F	Q	W	K	R	N	M	R	K	V	R	91
2	C	F	Q	W	K	R	A	M	R	K	V	R	92
3	C	F	A	W	K	R	N	M	R	K	V	R	93
4	C	F	A	W	Q	R	A	M	R	K	V	R	94
5	C	F	Q	L	Q	K	N	M	K	K	V	R	95
6	C	F	A	L	K	K	A	M	K	K	V	R	96

ES 2 299 253 T3

Ejemplo 25

En este ejemplo fueron estudiados los efectos fungicidas, y bactericidas de los diversos péptidos obtenidos en los ejemplos 18-21. *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, fueron incubados en medio BHI diluido 1/100, con un pH de aproximadamente 6.7-6.9. Fue determinada la concentración de cada péptido necesario para matar 99% de los microorganismos (MMC_{99%}). Los resultados son ilustrados en la tabla 21 a continuación.

TABLA 21

SEQ. ID. NO.	MMC _{99%}		
	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
46	12	12	7
68	12	>25	28
69	12	12	14
70	6	6	7
71	12	25	14
72	12	12	7
73	12	12	7
74	6	6	3.5
75	25	12	7
76	25	25	7
77	25	12	7
78	25	12	7
79	25	12	7
80	6	12	7
81	6	6	7
82	6	12	7
83	6	6	7
84	12	25	14
85	>50	>25	>28
86	25	25	14
87	3	6	≤3.5
88	6	12	3.5
89	6	6	3.5
90	12	12	3.5

ES 2 299 253 T3

Ejemplo 26

En este ejemplo fueron estudiados los efectos fungicidas, y bactericidas de los diversos péptidos obtenidos en el ejemplo 22. *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, fueron incubados en medio de BHI diluido 1/100, con un pH de aproximadamente 6.7-6.9. Fue determinada la concentración de cada péptido necesaria para matar 99% de los microorganismos (MMC_{99%}). Los resultados son ilustrados en la tabla 22 a continuación.

TABLA 22

SEQ. ID. NO.		MMC _{99%}	
	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
46	12	6	12
91*)	6	6	6
93	12	6	6
94	12	6	6
95	12	6	6
96	12	6	12
97	12	6	6

*) El péptido con SEQ. ID. NO. 91 fue probado dos veces, y los resultados fueron iguales en ambas ocasiones.

Ejemplo 27

En este ejemplo fue estudiada la actividad fungicida de tres de los péptidos de acuerdo con la invención, y probada contra tres hongos diferentes. Los hongos fueron incubados en medio de BHI diluido 1/100. Fue determinada la concentración de cada péptido necesario para matar 99% de los hongos (MMC_{99%}). Los resultados son ilustrados en la tabla 23 a continuación.

TABLA 23

SEQ. ID. NO.		MMC _{99%}	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. neoformans</i>
4	6.3	>50	≤3.1
46	12.5	50	ND
87	6.3	>50	3.1

Ejemplo 28

En este ejemplo fue estudiada la actividad microbica de ocho de los péptidos de acuerdo con la invención, y probada contra *E. coli* O6K5 y *C. albicans*.

En este ejemplo, fue usado un péptido con SEQ. ID. NO. 55, que no ha sido descrito anteriormente. Este péptido es una modificación del péptido con SEQ. ID. NO. 7 donde la Asp en la posición 9 es sustituida por una Glu.

ES 2 299 253 T3

Fue determinada la concentración de cada péptido necesario para matar 99% de los microorganismos (MMC_{99%}). Los resultados son ilustrados en la tabla 24 a continuación.

TABLA 24

SEQ. ID. NO.	MMC _{99%}	
	E. coli	C. albicans
4	20	5
7	> 20	5
55	5	5
46	10	10
87	5	5
88	5	10
91	5	5
93	5	5

La conclusión de los resultados de las tablas 21-24 es que la secuencia del péptido puede ser modificada en varias posiciones y con ello aumenta o mantiene la actividad microbicida comparada con la secuencia natural. Estas secuencias modificadas también reducen los costos para la síntesis de los péptidos. Las posiciones en las cuales los aminoácidos pueden ser cambiados con resultados mejores o iguales son las denotadas Xaa en la SEQ. ID. NO. 99.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que comprende la SEQ. ID. NO. 99 y seleccionado del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO. 2-5, 8, 31-32, 34-38, 47, 49, 51, 63, 67, 70, 72-76, 80-83, y 87-97.
2. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO. 2, 37 y 93.
- 10 3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO. 70, 72-76, 80-83, y 87-97.
4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO. 8, 31-32, 34-38, 47, 49, 51, 63, y 67.
- 15 5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en las SEQ. ID. NO. 2-5.
6. Un producto medicinal que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 20 7. Un producto medicinal de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento y/o prevención de infecciones y/o inflamaciones.
8. Un producto medicinal de acuerdo con la reivindicación 7, para el tratamiento y/o prevención de la infección del tracto urinario.
- 25 9. Un producto medicinal de acuerdo con la reivindicación 7, para el tratamiento y/o prevención de la colitis.
10. Un producto medicinal de acuerdo con la reivindicación 7, para el tratamiento de una infección por candida en una membrana mucosa.
- 30 11. Un producto medicinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10 formulado para administración oral.
12. Un producto medicinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-10 formulado para administración parenteral.
- 35 13. Un producto medicinal de acuerdo con la reivindicación 12 formulado para administración tópica.
14. Un producto medicinal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13 formulado para administración en las membranas mucosas.
- 40 15. Producto alimenticio que comprende un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
16. Producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 15 que es un alimento preparado para lactantes.
- 45 17. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para la producción de un producto medicinal para el tratamiento y/o la prevención de infecciones y/o inflamaciones.
18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde el producto medicinal está concebido para el tratamiento y/o prevención de la infección del tracto urinario.
- 50 19. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde el producto medicinal está concebido para el tratamiento y/o prevención de la colitis.
20. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, donde el producto medicinal está concebido para el tratamiento de una infección por candida en una membrana mucosa.
- 55 21. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-20, donde el producto medicinal es formulado para administración oral.
- 60 22. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-20, donde el producto medicinal es formulado para administración parenteral.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 22, donde el producto medicinal es formulado para administración tópica.
- 65 24. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-23, donde el producto medicinal es formulado para administración en las membranas mucosas.

ES 2 299 253 T3

25. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, donde el producto medicinal constituye o se incluye en un producto alimenticio.

26. Uso de acuerdo con la reivindicación 25, donde el producto alimenticio es un alimento preparado para lactantes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

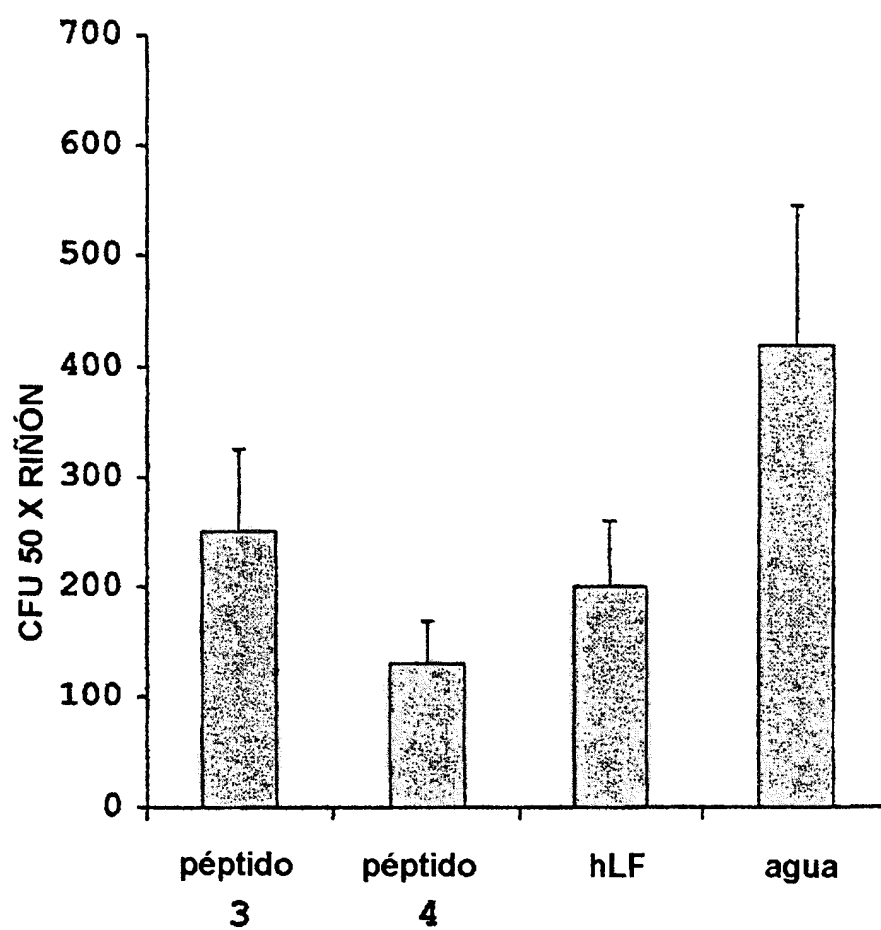


Figura 1

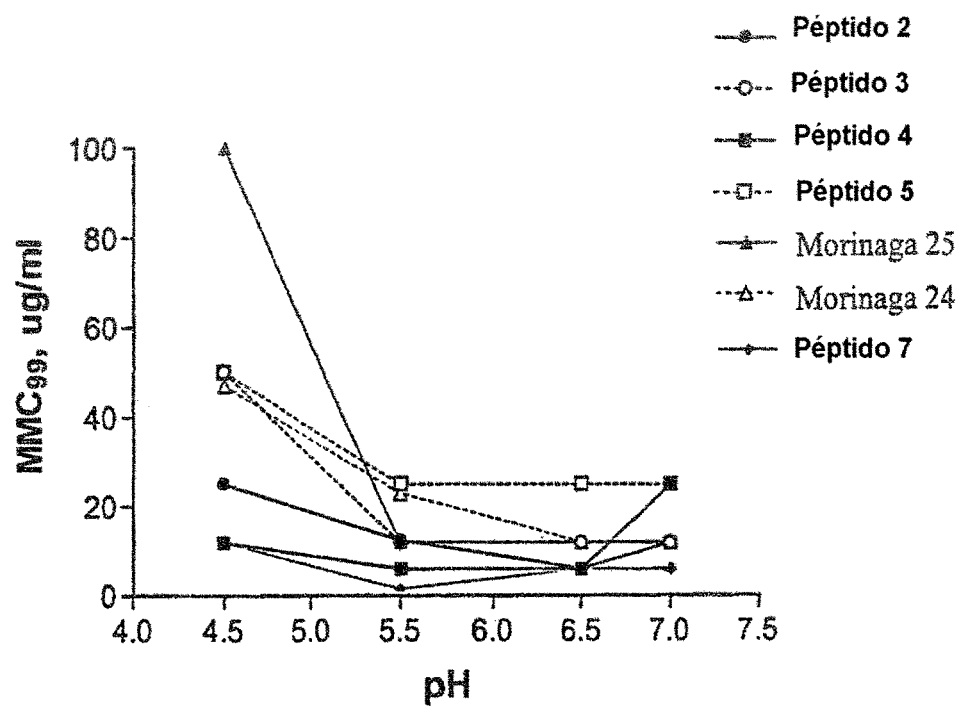


Fig. 2

C. albicans en el estómago

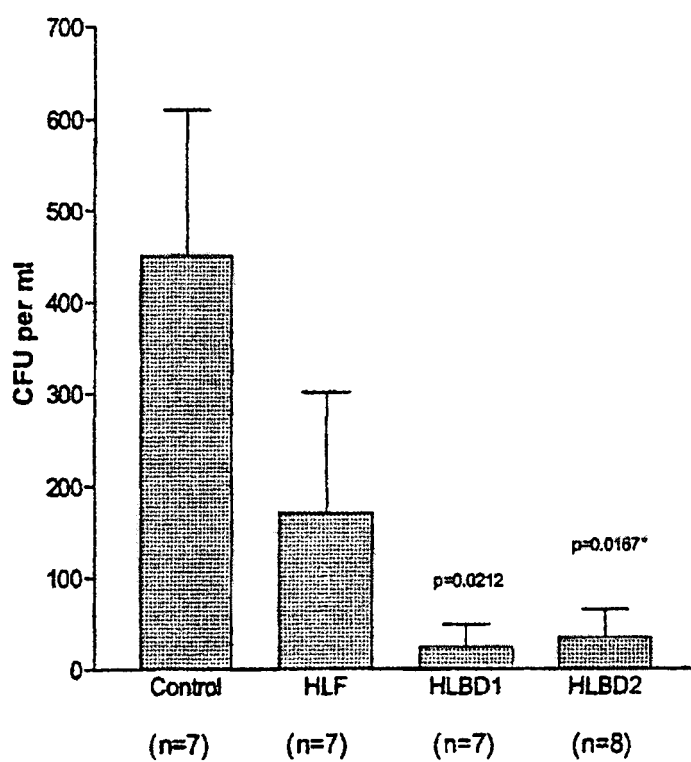


Fig. 3

Colitis en ratones C57Bl/6

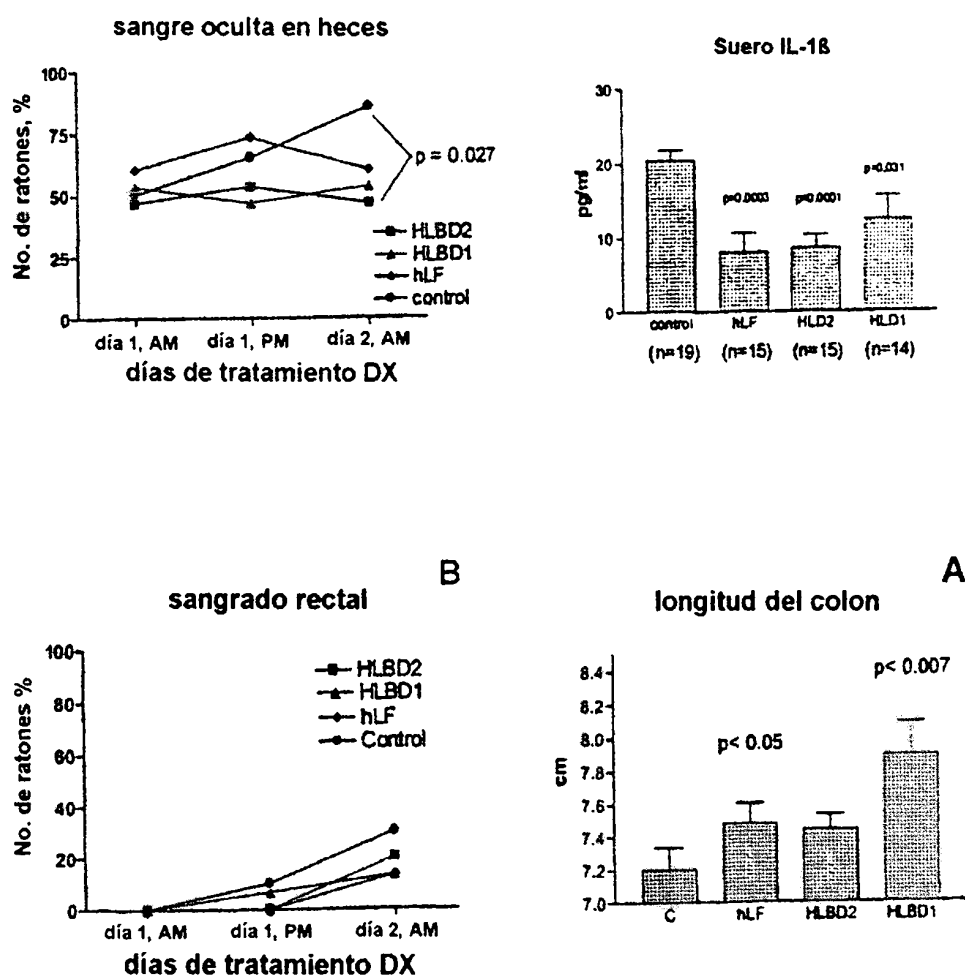


Fig. 4

Colitis CD8, día 2

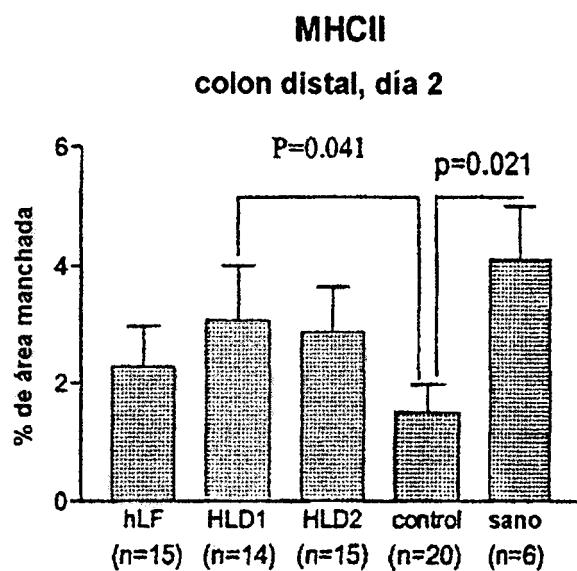
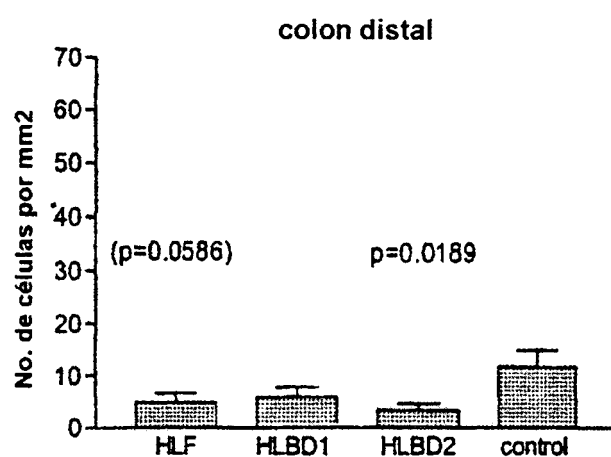


Fig. 5

ES 2 299 253 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> A+ Science Invest AB
Mattsby-Baltzer, Inger
5 Hanson Å, Lars
Dolphin T, Gunnar

<120> NUEVOS PÉPTIDOS Y USO DE LOS MISMOS
10
<130> p2996317

<140>
15 <141>

<150> 9802441-7
<151> 1998-07-06
20
<150> 9802562-0
<151> 1998-07-17

<150> 9804614-7
25 <151> 1998-12-29

<160> 100
30
<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
35 <211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
secuencia que consiste en los aa 16-40 en la lactoferrina humana

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)

50 <223> ACETILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
55 <222> (25)
<223> AMIDACIÓN

<400> 1
60

Xaa	Xaa	Thr	Lys	Xaa	Phe	Xaa	Trp	Gln	Arg	Xaa	Met	Arg	Lys	Val	Arg
1				5				10					15		

65

Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa							
				20				25							

ES 2 299 253 T3

<210> 2
 <211> 25
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 10 secuencia que consiste en los aa 16-40 en la lactoferrina humana

 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (25)
 <223> AMIDACIÓN
 25
 <400> 2

 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 30 1 5 10 15

 Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg
 35 20 25

 <210> 3
 <211> 25
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 16-40 en la lactoferrina humana

 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)
 60 <223> AMIDACIÓN

 <220>
 <221> DISULFURO
 65 <222> (5) .. (22)

ES 2 299 253 T3

<400> 3

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10 15

5

Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg
20 25

10 <210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-40 en la lactoferrina humana

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

25

<223> ACETILACIÓN

<220>

30

<221> MOD_RES

<222> (23)

<223> AMIDACIÓN

35 <400> 4

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
1 5 10 15

40

Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg
20

45 <210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-40 en la lactoferrina humana

55

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ACETILACIÓN

60

<220>

<221> MOD_RES

65

<222> (23)

<223> AMIDACIÓN

ES 2 299 253 T3

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> (3) .. (20)
 5 <400> 5
 Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 10 1 5 10 15
 Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg
 20
 15 <210> 6
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 30 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN
 40 <400> 6
 Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Asp Met Arg Lys Val Arg
 1 5 10
 45 <210> 7
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana, una lactama es formada entre los aa 5 y 9
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 60 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 65 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

ES 2 299 253 T3

 $\langle 220 \rangle$

<221> UNIÓN

<222> (5)..(9)

5 <223> LACTAMA

<400> 7

Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Asp Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 8

 $\langle 211 \rangle$ 20

15 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 12-31 en la lactoferrina humana

<400> 8

25 Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met
1 5 10 15

30 Arg Lys Val Arg
20

<210> 9

 $\langle 211 \rangle$ 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 12-18 en la lactoferrina humana

<400> 9

45 Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr
1 5

 $\langle 210 \rangle$ 10

50 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 13-19 en la lactoferrina humana

60 $\langle 400 \rangle$ 10

Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys
1 5

65 $\langle 210 \rangle$ 11

<211> 7

<212> PRT

ES 2 299 253 T3

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 14-20 (SEQ. ID. 11) o 19-31 (SEQ. ID. 37) en la lactoferrina humana

<400> 11

	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys
10	1				5		

<210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 15-21 en la lactoferrina humana

<400> 12

	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe
25	1				5		

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-22 en la lactoferrina humana

<400> 13

	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln
	1				5		

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 17-23 en la lactoferrina humana

<400> 14

	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp
60	1				5		

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 18-24 en la lactoferrina humana

5

<400> 15

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln

10

1

5

<210> 16

<211> 7

15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 19-25 en la lactoferrina humana

<400> 16

25

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg

1

5

<210> 17

30

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-26 en la lactoferrina humana

40

<400> 17

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn

45

1

5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 21-27 en la lactoferrina humana

<400> 18

60

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met

1

5

<210> 19

65

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 22-28 en la lactoferrina humana

5

<400> 19

Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg

1

5

10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 23-29 en la lactoferrina humana

20

<400> 20

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys

1

5

25

<210> 21

30

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 24-30 en la lactoferrina humana

40

<400> 21

Gln Arg Asn Met Arg Lys Val

1

5

45

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 25-31 en la lactoferrina humana

55

<400> 22

Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1

5

60

<210> 23

65

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-23 en la lactoferrina humana

5

<400> 23

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp

1

5

10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-24 en la lactoferrina humana

<400> 24

25

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln

1

5

<210> 25

30

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-25 en la lactoferrina humana

40

<400> 25

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg

1

5

10

45

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-26 en la lactoferrina humana

<400> 26

60

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn

1

5

10

<210> 27

65

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-27 en la lactoferrina humana

5

<400> 27

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met
1 5 10

10

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-28 en la lactoferrina humana

<400> 28

25

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg
1 5 10

<210> 29

30

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-29 en la lactoferrina humana

40

<400> 29

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
1 5 10

45

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-30 en la lactoferrina humana

<400> 30

60

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5 10 15

<210> 31

65

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-31 en la lactoferrina humana

5

<400> 31

Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

10

1

5

10

15

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 13-31 en la lactoferrina humana

<400> 32

25

Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg

1

5

10

15

Lys Val Arg

30

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

35

<213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 14-31 en la lactoferrina humana

<400> 33

Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys

45

1

5

10

15

Val Arg

50

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

55

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 15-31 en la lactoferrina humana

60

<400> 34

Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val

65

1

5

10

15

Arg

ES 2 299 253 T3

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste
 10 en los aa 17-31 en la lactoferrina humana

 <400> 35

 Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 15 1 5 10 15

 <210> 36
 <211> 14
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste
 en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

 <400> 36
 30 Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 1 5 10

 <210> 37
 35 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste
 en los aa 14-20 (SEQ. ID. 11) o 19-31 (SEQ. ID. 37) en la lactoferrina humana

 45 <400> 37
 Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 1 5 10

 <210> 38
 50 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste
 en los aa 20-31 en la lactoferrina humana

 60 <400> 38
 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 1 5 10

 65 <210> 39
 <211> 11

ES 2 299 253 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 21-31 en la lactoferrina humana

10 <400> 39

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 40

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 22-31 en la lactoferrina humana

25 <400> 40

Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

30 <210> 41

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 23-31 en la lactoferrina humana

40

<400> 41

Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5

45

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 24-31 en la lactoferrina humana

55

<400> 42

Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5

60

<210> 43

<211> 11

65

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 21-31 en la lactoferrina humana

5

<400> 43

Phe Xaa Trp Xaa Arg Xaa Met Arg Lys Xaa Arg
1 5 10

10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 21-31 en la lactoferrina humana

20

<400> 44

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

25

<210> 45

<211> 11

30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 21-31 en la lactoferrina humana

35

<400> 45

40

Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

45

<210> 46

<211> 12

<212> PRT

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana

55

<400> 46

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

60

<210> 47

<211> 12

65

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

10

<223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

15

<222> (12)

<223> AMIDACIÓN

20

<400> 47

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1

5

10

25

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 19-31 en la lactoferrina humana

<400> 48

40

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1

5

10

45

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 19-31 en la lactoferrina humana

55

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

60

<223> ACETILACIÓN

<220>

65

<221> MOD_RES

<222> (13)

<223> AMIDACIÓN

ES 2 299 253 T3

<400> 49

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

5 <210> 50

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<400> 50

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

<210> 51

<211> 14

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<220>

35 <221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ACETILACIÓN

40 <220>

<221> MOD_RES

<222> (14)

45 <223> AMIDACIÓN

<400> 51

Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

<210> 52

<211> 14

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<400> 52

Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Asp Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

ES 2 299 253 T3

<210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 10 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN
 25
 <400> 53

 Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Glu Met Arg Lys Val Arg
 30 1 5 10

 <210> 54
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana, una lactama es formada entre los aa 5 y 9

 <220>
 45 <221> UNIÓN
 <222> (5)..(9)
 <223> LACTAMA
 50
 <400> 54

 Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Asp Met Arg Lys Val Arg
 55 1 5 10

 <210> 55
 <211> 14
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana, una lactama es formada entre los aa 5 y 9

ES 2 299 253 T3

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 5 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

 15 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (5)..(9)
 20 <223> LACTAMA

 <400> 55

 Thr Lys Ala Phe Lys Trp Gln Arg Glu Met Arg Lys Val Arg
 25 1 5 10

 <210> 56
 <211> 14
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

 <400> 56

 Thr Lys Lys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 40 1 5 10

 <210> 57
 45 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN
 60
 <220>
 <221> MOD_RES
 65 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

ES 2 299 253 T3

<400> 57

Thr Lys Lys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg

1 5 10

<210> 58

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<400> 58

Thr Lys Lys Phe Gln Trp Asp Arg Lys Met Arg Lys Asp Arg

1 5 10

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)

<223> AMIDACIÓN

<400> 59

Thr Lys Lys Phe Gln Trp Asp Arg Lys Met Arg Lys Asp Arg

1 5 10

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana; lactamas formadas entre los aa 3 y 7, y 9 y 13

ES 2 299 253 T3

<220>
 <221> UNIÓN
 <222> (3) .. (7)
 5 <223> LACTAMA

 <220>
 10 <221> UNIÓN
 <222> (9)..(13)
 <223> LACTAMA

 15 <400> 60
 Thr Lys Lys Phe Gln Trp Asp Arg Lys Met Arg Lys Asp Arg
 1 5 10

 20 <210> 61
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la
 secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana; lactamas formadas entre los aa 3 y 7, y 9 y
 30 13

 <220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (1)
 <223> ACETILACIÓN

 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (14)
 <223> AMIDACIÓN

 45 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (3) .. (7)
 50 <223> LACTAMA

 <220>
 55 <221> UNIÓN
 <222> (9) .. (13)

 <400> 61
 60 **Thr Lys Lys Phe Gln Trp Asp Arg Lys Met Arg Lys Asp Arg**
 1 5 10

 <210> 62
 65 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 17-31 en la lactoferrina humana

5

<400> 62

	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
10	1				5					10					15

<210> 63

<211> 15

15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 17-31 en la lactoferrina humana

<220>

25

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ACETILACIÓN

30

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)

35

<223> AMIDACIÓN

<400> 63

40

	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
	1				5					10					15

45

<210> 64

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 16-31 en la lactoferrina humana

55

<400> 64

	Glu	Ala	Thr	Lys	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
60	1				5					10					15	

<210> 65

65

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 16-31 en la lactoferrina humana

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)

10

<223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> AMIDACIÓN

15

<400> 65
 Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
 1 5 10 15

20

<210> 66
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 15-31 en la lactoferrina humana

30

<400> 66
 Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
 1 5 10 15
 Arg

35

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 15-31 en la lactoferrina humana

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)

50

<223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)
 <223> AMIDACIÓN

65

ES 2 299 253 T3

<400> 67

Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5 10 15

5

Arg

<210> 68

<211> 12

10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 68

20

Ala Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

25

<210> 69

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

35

<400> 69

Cys Ala Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

40

<210> 70

<211> 12

<212> PRT

45

<213> Secuencia Artificial

<220>

50

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 70

Cys Phe Ala Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

55

<210> 71

<211> 12

60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

ES 2 299 253 T3

<400> 71

Cys Phe Gln Ala Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
5 1 5 10

<210> 72

 $\langle 211 \rangle$ 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 72

20
Cys Phe Gln Trp Ala Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 73

25 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

35 <400> 73

Cys Phe Gln Trp Gln Ala Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 74

 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

 $\langle 220 \rangle$

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 74

55 Cys Phe Gln Trp Gln Arg Ala Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 75

60 $\langle 211 \rangle$ 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 $\langle 220 \rangle$

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

ES 2 299 253 T3

<400> 75

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Ala Arg Lys Val Arg

1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 76

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Ala Lys Val Arg

1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 77

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Ala Val Arg

1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 78

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Ala Arg

1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

ES 2 299 253 T3

<400> 79

	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Ala
5	1				5					10		

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 80

	Cys	Phe	Gln	Leu	Gln	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
20	1				5					10		

<210> 81

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

35 <400> 81

	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Lys	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
40	1				5					10		

<210> 82

<211> 12

<212> PRT

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 82

	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Asn	Leu	Arg	Lys	Val	Arg
55	1				5					10		

<210> 83

<211> 12

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

ES 2 299 253 T3

<400> 83

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Lys Lys Val Arg
1 5 10

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 84

Cys Phe Gln Trp Glu Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 85

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 85

Cys Phe Gln Trp Gln Glu Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<400> 86

Cys Phe Gln Trp Gln Arg Glu Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 87

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

<220>

<223> Xaa en la posición 5 es Orn

ES 2 299 253 T3

<400> 87

	Cys	Phe	Gln	Trp	Xaa	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
	1				5					10		

5 <210> 88
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

15 <220>
 <223> Xaa en la posición 5 es Nle

20 <400> 88

	Cys	Phe	Gln	Trp	Xaa	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
	1				5					10		

25 <210> 89
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

35 <220>
 <223> Xaa en la posición 7 es Orn

40 <400> 89

	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Xaa	Met	Arg	Lys	Val	Arg
	1				5					10		

45 <210> 90
 <211> 12
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

55 <220>
 <223> Xaa en la posición 7 es Nle

60 <400> 90

	Cys	Phe	Gln	Trp	Gln	Arg	Xaa	Met	Arg	Lys	Val	Arg
	1				5					10		

65 <210> 91
 <211> 12

ES 2 299 253 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

10 <400> 91

Cys	Phe	Gln	Trp	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
1				5					10		

15 <210> 92

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana donde un aa ha sido substituido

25

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

30

<223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

35

<222> (12)

<223> AMIDACIÓN

40 <400> 92

Cys	Phe	Gln	Trp	Lys	Arg	Asn	Met	Arg	Lys	Val	Arg
1				5					10		

45 <210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde algunos aa han sido substituidos

55

<400> 93

Cys	Phe	Gln	Trp	Lys	Arg	Ala	Met	Arg	Lys	Val	Arg
1				5					10		

60

<210> 94

<211> 12

<212> PRT

65

<213> Secuencia Artificial

ES 2 299 253 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde algunos aa han sido substituidos

5

<400> 94

Cys Phe Ala Trp Lys Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

10

<210> 95

<211> 12

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde algunos aa han sido substituidos

20

<400> 95

Cys Phe Ala Trp Gln Arg Ala Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

25

<210> 96

<211> 12

30

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana donde algunos aa han sido substituidos

35

<400> 96

Cys Phe Gln Leu Gln Lys Asn Met Lys Lys Val Arg
1 5 10

40

<210> 97

45

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana

55

<400> 97

Cys Phe Ala Leu Lys Lys Ala Met Lys Lys Val Arg
1 5 10

60

<210> 98

<211> 14

<212> PRT

65

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 299 253 T3

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 18-31 en la lactoferrina humana

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)

<223> ACETILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (14)

<223> AMIDACIÓN

<400> 98

Thr Lys Lys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10

<210> 99

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: de origen natural o artificial, correspondiente a una modificación de la secuencia que consiste en los aa 20-31 en la lactoferrina humana

<400> 99

Cys Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Val Arg
1 5 10

<210> 100

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: un fragmento de lactoferrina humana que consiste en los aa 12-40

<400> 100

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met
1 5 10 15

Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg
20 25