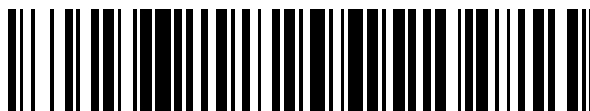


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2003 PCT/NL2003/00389**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2003 WO03099862**

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

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **16.11.2016 EP 1507798**

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

30 Prioridad:

24.05.2002 EP 02077060
07.02.2003 US 360101

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
01.06.2017

73 Titular/es:

MORPHOSYS AG (100.0%)
Lena-Christ-Strasse 48
82152 Planegg-Martinsried, DE

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Exportación y modificación de poli(péptidos) de tipo lantibiótico

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

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

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

25 No deterioran el ambiente y no son tóxicos para los animales o el hombre y encuentran, o pueden encontrar, aplicaciones como bioconservantes en la preparación de alimentos y bebidas, pero también como agente bactericida en productos cosméticos, veterinarios y médicos. Dado que el creciente número de microorganismos patógenos resistentes a fármacos múltiples ha creado la amenaza de otra "era preantibiótica" para muchas enfermedades bacterianas, se espera que los lantibióticos también puedan servir como un nuevo compuesto principal para remediar este problema alarmante. Principalmente por estas razones, en la década anterior, los lantibióticos han experimentado un notable aumento en actividades de investigación aplicada y básica, lo que

30 conduce a un aumento extraordinario en cuanto al conocimiento acerca de sus propiedades estructurales y funcionales, sus mecanismos de acción y de los genes y componentes proteicos implicados en su biosíntesis y secreción. Por ejemplo, los lantibióticos se han convertido actualmente en objeto de proyectos de "modificación por ingeniería genética de proteínas", con el objetivo de alterar, mediante mutagénesis dirigida a sitio, su actividad, estabilidad y espectro de células diana susceptibles. En la presente descripción se realiza un enfoque sobre los lantibióticos lineales (tipo A) ya que hasta el momento se dispone de muy poca información específica acerca de los lantibióticos circulares (tipo B).

40 Los lantibióticos subtilina y nisina pertenecen a, y son representativos de, antibióticos peptídicos o lantibióticos de tipo A. Contienen los aminoácidos poco frecuentes deshidroalanina (Dha), deshidrobutirina (Dhb), *meso*-lantionina y 3-metillantionina, y los puentes tioéter característicos. La nisina es el lantibiótico más destacado y se usa como un conservante alimenticio debido a su alta fuerza contra determinadas bacterias Gram-positivas. Las cepas de *Lactococcus lactis* que pertenecen al grupo serológico N producen nisina. Las fuertes actividades bactericidas de la nisina, y de muchos otros lantibióticos, se basan en su capacidad para permeabilizar la membrana citoplasmática de bacterias diana. La degradación del potencial de membrana comienza por la

45 formación de poros a través de los cuales se liberan moléculas de bajo peso molecular. Además, la nisina inhibe la síntesis de la pared celular uniéndose al lípido II, un precursor de la síntesis del peptidoglucano, modula la actividad de enzimas autolíticas e inhibe el desarrollo de esporas (véase también Breukink y de Kruijf, Biochem. Biophys. Acta 1462:223-234, 1999).

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

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

60

Debido a su fácil análisis genético *B. subtilis* se convierte en un organismo modelo muy adecuado para la identificación y caracterización de genes y proteínas implicados en la biosíntesis de lantibióticos. La ruta mediante la cual se produce la nisina es muy similar a la de la subtilina, y las proteínas implicadas comparten

65 homologías significativas sobre las proteínas completas (para una revisión véase también De Vos et al., Mol. Microbiol. 17:427-437, 1995).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Donde anteriormente se pensaba normalmente que LanB y LanC actuaban en concierto para modificar el péptido sólo antes de que se translocase, en el presente documento se proporciona adicionalmente que después del transporte, el péptido no modificado extracelularmente como tal puede experimentar su modificación postraducciona específica conduciendo a la deshidratación y a la formación de puentes tioéter, llevando la función de la proteína transportadora a la fase central para modificar un (poli)péptido de tipo lantibiótico, siendo esto un requisito previo para presentar el péptido no modificado a la maquinaria de modificación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En una realización adicional preferida, la invención proporciona un método en el que la célula hospedadora productora del (poli)péptido deseado está esencialmente desprovista de actividad peptidasa líder (LanP), permitiendo por tanto la producción y el recogida extracelular - usando antibióticos anti-líder - del (poli)péptido deseado que está aún esencialmente acoplado a su péptido líder. Además, de esta manera, se reducen posibles efectos tóxicos intracelulares del (poli)péptido deseado provisto de puentes tioéter. Por supuesto también es suficiente diseñar un péptido líder que no pueda escindir la peptidasa líder de la célula hospedadora usada. En ambos casos, el (poli)péptido deseado puede obtenerse posteriormente libre del péptido líder, por ejemplo, por escisión proteolítica específica, usando LanP añadida, o mediante cualquier proteasa adecuada capaz de escindir el péptido líder del (poli)péptido deseado. Además, en el presente documento se ha previsto que en un

(poli)péptido deseado, un serina o más serinas, que están localizadas en el extremo N de cisteínas se deshidratan y acoplan a más cisteínas localizadas en el extremo C. Como también se ilustra en el presente documento en la descripción detallada, una secuencia (poli)peptídica con una serina y una cisteína "S – C" contiene (preferentemente después de la formación de puentes tioéter) alaninas en dichas posiciones de la serina y cisteína: "A – A". Estas alaninas están acopladas por - además de la estructura peptídica –un puente tioéter.

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

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

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

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

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

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

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

En otra realización preferida, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, y un (poli)péptido de acuerdo con la invención en el que dicho (poli)péptido deseado se selecciona del grupo de péptidos o fragmentos biológicos activos de estos péptidos y/u hormonas o análogos de estos péptidos y/o péptidos con acciones similares tales como guamilina, helospectina I, fragmento antigénico de la superficie del virus de la hepatitis B, molécula de adhesión intercelular, taquipesina I, fragmento peptídico antigénico (gp120), fragmento I

peptídico antigénico (gp 41) del VIH, péptido antigénico 5 del VIH, inhibidores de proteasa del VIH, IGF II 69-84, fragmento 8 de interleucina, fragmento 2 de interleucina (60-70), leucoquinina I, leucopiroquinina, mastoparén, hormona concentradora de melanina, melitina y péptidos relacionados con el oncogén ras.

- 5 Considerando que la formación de lantionina entre, por ejemplo, deshidrobutirina y cisteína es energéticamente posible a temperatura ambiente y que también puede producirse espontáneamente, el (poli)péptido transportado puede formar puentes tioéter espontáneamente o cuando se coloca en proximidad funcional a LanC localizado extracelular para la formación de puentes tioéter inducida enzimáticamente. Como alternativa, dicho transportador transporta el polipéptido a modificar a través de la membrana de la célula huésped cuando se
10 coloca en proximidad funcional a LanM localizado extracelular para la deshidratación de LanM y posterior formación de puentes tioéter.

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

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

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

funcional de al menos uno de los otros productos génicos derivados del grupo génico *Nis*, tales como *NisB*, *NisC* o *NisP*.

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

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

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

Con respecto al sitio de escisión peptidasa existen al menos dos tipos de péptidos líder a partir de los cuales puede obtenerse orientación para diseñar mejor péptidos o proteínas escindibles. Una clase necesita la serina proteasa de tipo subtilina LanP para la escisión, que se produce después de Pro-Gln, Pro-Arg, Ala-Asp, Ala-Glu.

5 En el caso de nisina, parece ser necesario un resto cargado positivamente en la posición -1 y un resto hidrófobo en la posición -4 para la interacción con NisP. Esta serina proteasa de tipo subtilina LanP actúa en los prepéptidos de, por ejemplo, Pep5, Epilancina K7, Nisina A, Nisina-Z, Epidermina, Gallidermina.

10 En las otras clases los péptidos líder se escinden después de las secuencias Gly-Gly, Gly-Ala o Gly-Ser. Lo último se mantiene para muchos otros péptidos líder de bacteriocina no lantibióticos. Las proteasas de tipo subtilina no son conocidas por escindir estas secuencias, por tanto un tipo diferente de proteasa escinde estos péptidos líder. Se ha demostrado que en algunas bacteriocinas, tanto lantibióticos como no lantibióticos, esta segunda proteasa es un dominio del sistema de transporte LanT. Este tipo de peptidasa líder actúa, por ejemplo, en prepéptidos de Lacticina-481, Variacina, Mutacina-II, Streptococina-A-FF22, Salivaricina-A y Sublancina.

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

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

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

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

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

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

60 Además, la invención proporciona un ácido nucleico recombinante que comprende un primer fragmento de ácido nucleico que codifica un péptido líder y un segundo fragmento de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido deseado, mediante lo cual dicho primer y segundo fragmento se encuentran dentro de la misma fase de lectura abierta de dicho ácido nucleico y dicho péptido líder es al menos funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado con el prepéptido de un lantibiótico, y en el que dicho (poli)péptido deseado es de origen esencialmente eucariota o viral. Además, la invención proporciona una sustancia proteínica que comprende un polipéptido codificado por un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Dicha sustancia proteínica puede
65 recogerse, o modificarse de acuerdo con un procedimiento como se proporciona en el presente documento. En el presente documento también se proporciona el uso de una célula hospedadora o un ácido nucleico o sustancia

proteica de acuerdo con la invención para la producción de un (poli)péptido deseado, y su uso en la producción de una composición farmacéutica. En particular, la invención proporciona un (poli)péptido de origen procariota Gram-negativo o eucariota (en la Tabla 1 pueden encontrarse ejemplos) en el que una serina o una treonina se ha deshidratado o que se ha proporcionado con un puente tioéter. La ventaja de dicho polipéptido, subyace, por ejemplo, en la creación de variantes de fármacos conocidos, basados en péptidos o en proteínas, en el que, por ejemplo, la dosis o frecuencia de administración puede reducirse, disminuyendo de esta manera el coste del tratamiento, el tiempo del tratamiento y la incomodidad para el paciente; la creación de variantes de nuevos fármacos basados en proteínas o en péptidos donde el fármaco puede no haber sido eficaz o haberse admitido para su uso en una forma no estabilizada y la creación de nuevas entidades de por sí terapéuticas.

La invención se explica adicionalmente en la descripción detallada.

Leyenda de las figuras

Figura 1 estructura peptídica de nisina y subtilina madura

Figura 2 organización genómica de genes implicados en la biosíntesis de subtilina y nisina

Figura 3 modelo para la biosíntesis de nisina en el que la modificación se produce intracelularmente

Figura 4 modelo para la biosíntesis de nisina en el que la modificación se produce extracelularmente

El prepéptido nisina se exporta por NisT ("T"), se deshidrata por NisB (B) extracelular y se somete a cierre de anillo tioéter por NisC (C) extracelular.

La peptidasa líder extracelular, NisP (P) se escinde del péptido líder. La nisina interacciona con una histidina quinasa NisK (K) unida a membrana que fosforila un regulador de respuesta NisR (R), que en su giro activa la transcripción de los genes *nis* (+, +). Las células productoras se protegen contra nisina mediante la acción concertada del lipopéptido NisI y el sistema transportador NisEFG.

Figura 5

Detección del péptido líder lantibiótico directamente del medio de cultivo por MALDI-TOFMS.

Usando la combinación de cultivo en medio mínimo y ziptipping el sobrenadante de este cultivo, se obtuvieron muestras de suficiente pureza para MALDI-TOFMS a alta resolución. Esto permitió medir más significativamente el péptido líder nisina. Según lo que se sabe, esto nunca se ha publicado. La detección del péptido líder lantibiótico puede usarse por tanto para averiguar la exploración del (poli)péptido acoplado a este líder lantibiótico, es decir, en aquellos casos en los que la peptidasa líder actúa extracelularmente. Generalmente este método permite un alto nivel de detección para medir (poli)péptidos (lantibióticos) directamente del sobrenadante de cultivo.

Figura 6

Transporte de prepéptido nisina no modificado mediante el transportador de nisina NisT. (Ejemplo 1)

Figura 7

Transporte mediante NisT de una variante de angiotensina 1-7 fusionada al extremo C del líder de nisina. (Ejemplo 2)

Figura 8

Transporte mediante NisT de una variante de vasopresina fusionada con al extremo C del líder de nisina. (Ejemplo 3)

Figura 9

Transporte y deshidratación por NisBT del prepéptido de nisina. (Ejemplo 4)

Figura 10AB

Transporte, deshidratación y formación de anillo en el prepéptido de nisina por células de *Lactococcus lactis* que tienen el plásmido pNGnis-ABTC.

Figura 10A: sin inducción, Figura 10B: con inducción (Ejemplo 6)

Figura 11

Transporte mediante NisT del prepéptido de nisina no modificado, extendido en el extremo C con una variante de encefalina. (Ejemplo 13).

Se diluyeron cultivos de una noche de la bacteria *Lactococcus lactis* NZ9700, productora de nisina, que crecía en caldo M17 complementado con glucosa al 0,5 % a 1/100. A una densidad óptica de 660 nm igual a 0,4, las células se centrifugaron y el medio se sustituyó por medio mínimo (Jensen y Hammer, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4363-4366) que contenía 1/1000 de sobrenadante de *Lactococcus lactis* NZ9700 de una noche

filtrado con poros de 0,4 mm. Después de incubación durante una noche el medio se sometió a ziptipping usando ziptips de C18 (Millipore). Como una matriz para el análisis MALDI-TOFMS se utilizó ácido ciano cinamínico.

La figura muestra un pico a 2349,6 correspondiente al péptido líder nisina (valor teórico de 2351,2). Dos subpicos, de 2372,5 y de 2388, correspondientes a aductos de sodio y potasio respectivamente. Un pico de 2482,2 corresponde al péptido líder nisina con la primera metionina aún unida (el valor teórico es idéntico: 2482,2). A una mayor masa los picos 3352,5, 3372,6 y 3390,1 corresponden a nisina, a un aducto de sodio y a un aducto de potasio respectivamente.

10 Descripción detallada

Las enzimas de lantibióticos son especiales. No hay fuerte homología, o ninguna en absoluto, con otras enzimas. Se muestran secuencias de ADN o de aminoácidos de muchas enzimas de lantibióticos, pero sus estructuras no se han determinado. Los genes implicados en la biosíntesis, procesamiento y exportación de lantibióticos están presentes en un grupo *lanA B C / M (D) P R K T F E G I*. No hay orden uniforme u orientación de los genes en los diferentes grupos lo que indica que los reordenamientos se han producido en la evolución. Las lantioninas son los restos más típicos formados postraduccionalmente en antibióticos. Se forman en dos etapas. En primer lugar las serinas y treoninas del propéptido se deshidratan dando lugar a deshidroalaninas y deshidrobutirinas respectivamente. Se ha propuesto que LanB desempeña una función en la deshidratación, dado que tiene una escasa homología con IlvA, una treonina deshidratasa de *E.coli*. Además, se ha observado que la sobreexpresión de NisB aumenta la aparición de la deshidratación de serina 33 en nisina A, del 10 % en la situación normal hasta el 50 % en el caso de NisB sobreexpresada. La proteína LanB consta de aproximadamente de 1000 restos. LanB son proteínas asociadas a membrana. Se piensa que LanC es responsable de la adición posterior de grupos SH cisteína a los deshidro aminoácidos, que da como resultado los anillos tioéter. En el caso de PepC, datos experimentales apoyan esta idea. Las proteínas LanC actualmente conocidas se componen de aproximadamente 400 restos. En los lantibióticos de tipo A la parte N-terminal de los restos de lantionina y metillantionina se forman por los restos de deshidroalanina o deshidrobutirina, mientras que la mitad C-terminal se forma por los restos de cisteína.

Las deshidroalaninas y deshidrobutirinas son esenciales en diversos (poli)péptidos para la actividad del (poli)péptido específico. Los restos deshidro son, por ejemplo, esenciales para la inhibición mediada por nisina del crecimiento de esporas bacterianas (Liu y Hansen 1996. Appl Environ. Microbiol. 59: 648-651), para un antagonista del receptor de neuroquinina (Lombardi et al 1998. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 8: 1153-1156), para la fenilalanina amonio ligasa (Schuster y Rétey 1995 PNAS 92: 8433-8437) para un inhibidor de tripeptidilpeptidasa II (Tomkinson et al., 1994. Archives of Biochemistry and Biophysics 314: 276-279), para un péptido inhibidor de proteasa del VIH-1 (Siddiqui et al. 2001. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 38: 90-95), para la actividad de péptidos contra bacterias Gram-negativas (Ferrari et al 1996 2: 4- Journal of Antibiotics) y para la actividad de péptidos antifúngicos (Kulanthaivel et al WO 2000063240). Los (poli)péptidos que contienen restos deshidro pueden producirse por células que tienen LanT y LanB o LanT en la parte N-terminal de lanM que es equivalente a LanB. Las actividades anteriormente mencionadas pueden ser de importancia económica significativa. Por ejemplo la inhibición de la tripeptidil peptidasa II es de relevancia en la lucha contra la obesidad. Esto es obvio por el hecho de que la tripeptidil peptidasa II degrada el octapéptido colcistoquinina-8, un agente saciante endógeno.

La formación de lantionina entre deshidrobutirina y cisteína es energéticamente posible a temperatura ambiente y puede también producirse espontáneamente.

La maduración y secreción del lantibiótico se piensa que se produce en el complejo multimérico lantionina sintetasa asociado a membrana que consta de las proteínas LanB, LanC y las moléculas transportadoras ABC LanT. Al menos dos moléculas de LanC y dos moléculas de LanT forman parte del complejo de modificación y transporte. Algunos lantibióticos no tienen el gen *lanB*, pero tienen un gen *lanM* mucho más grande, cuyo producto tiene cierta homología en el extremo C con el producto génico *lanC*. Dado que ningún homólogo de *lanB* está presente en grupos productores de LanM la parte N-terminal de la proteína LanM podría realizar la reacción de deshidratación típicamente realizada por LanB. La síntesis química de los lantibióticos es posible pero es extremadamente costosa y requiere mucho tiempo. Muchos lantibióticos mutantes que contienen sustituciones de aminoácidos se han obtenido por modificación con ingeniería genética. Sin embargo, a pesar de muchos estudios, hasta ahora solo se ha obtenido en el lantibiótico Pep5 un anillo de lantionina en una nueva posición.

Como se ha dicho, los sistemas exportadores de lantibióticos, LanT, (cuyas secuencias ya se conocen) se piensa en general que están dedicados al transporte del lantibiótico completamente modificado. De hecho se ha comunicado que las dos enzimas implicadas en la formación de lantionina en nisina (NisB y NisC) se localizan intracelularmente en un complejo asociado a membrana NisBCT (Siegers et al., 1996). Dicha localización intracelular sugiere que los prepéptidos están deshidratados por LanB después de lo cual, se forman los anillos por LanC seguido de la exportación por LanT. Además, si las enzimas formadoras de anillos tioéter, NisB (responsables de la deshidratación, que es la primera etapa en la formación de anillos) o NisC (responsable de la

formación de anillos entre restos deshidro y cisteína) están inactivadas por delección en fase de 61 aa o por inserción plasmídica, respectivamente, ya no se exporta ningún péptido. Esto último sugiere que la ausencia de metil(lantioninas) impide la exportación.

- 5 Sin embargo, sorprendentemente ahora se ha medido que el prepéptido, tal como el prepéptido nisina, puede transportarse a través del transportador de nisina. Este resultado se obtuvo usando una cepa con dos plásmidos, uno que codificaba el prepéptido nisina y uno que codificaba el transportador de nisina. No se observó producción de prepéptido en un experimento de control en el que se utilizó una cepa solo con el plásmido que codificaba el prepéptido. Algunos lantibióticos contienen serinas/treoninas deshidratadas que no participan en la
- 10 formación de anillos tioéter. A partir de lo anterior, en combinación con la observación de que el péptido no modificado se exporta, puede formularse la teoría de que la translocación del prepéptido sin anillos tioéter también es posible pero con restos deshidro. Se sabe que la segunda etapa en la formación de anillos de lantionina es menos difícil de realizar dado que también puede producirse espontáneamente a temperatura ambiente. Por lo tanto, después de la producción de prepéptidos con restos deshidro pueden formarse anillos de lantionina extracelularmente.
- 15

Para impedir incompatibilidades celulares con (poli)péptidos recién formados que contienen tioéter y/o restos deshidro, puede realizarse síntesis *in vitro* de (poli)péptidos con tioéter. Al revés, vesículas de membrana con LanB o LanBC o LanBT o LanBCT o LanMT, obtenidas por células sometidas a prensa francesa, pueden

20 mezclarse con un extracto celular, obtenido sometiendo a ultrasonidos un sedimento celular y centrifugando, con ATP y un sistema generador de ATP, con inhibidores de proteasa y con una fusión (poli)péptido-líder con serinas/treoninas y cisteínas en posiciones adecuadas. En el caso de vesículas que contienen LanC o LanCT péptidos con restos deshidro pueden cerrarse por LanC para formar enlaces tioéter estereoespecíficamente. Después de someter a agitación vorticial con un volumen de cloroformo y centrifugación el sobrenadante

25 contiene el péptido de fusión con anillos tioéter y/o restos deshidro como se muestra por análisis Maldi TOF del sobrenadante sometido a ziptipping. La formación de anillos se deduce de la masa observada después de peroxidación dado que la peroxidación hace que se produzca a una adición de tres oxígenos a cisteínas libres, mientras que solo 1 o 2 átomos de oxígeno forman puentes tioéter.

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

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

35

El presente hallazgo proporciona la posibilidad de fabricar nuevos lantibióticos y por tanto estabilizar péptidos / proteínas mediante anillos tioéter, D-alaninas u otros restos formados por enzimas de lantibióticos. Antes de la

40 formación de (metil)lantionina, típicamente la distancia de los restos deshidro a cisteínas es de 2-5 restos pero también son posibles distancias mucho más largas. Las (metil)lantioninas pueden formarse a partir de restos deshidro localizados más N-terminalmente o localizados más C-terminalmente. Además el sistema transportador de lantibióticos puede usarse para la exportación de otras proteínas insertando la secuencia que codifica el péptido líder delante de la secuencia de ADN de proteína.

45

También pueden obtenerse (poli)péptidos cortos con restos deshidro y/o anillos tioéter incorporándoles una secuencia de ADN lantibiótico. Por ejemplo en un péptido eucariota específico de 10 aminoácidos un anillo tioéter puede modificarse con ingeniería genética de la siguiente manera. Basándose en un lantibiótico de 20

50 aminoácidos con un anillo tioéter entre la posición 13 y 16 puede diseñarse una secuencia de ADN que codifique los 10 primeros aminoácidos del lantibiótico seguido de los 10 aminoácidos del péptido eucariota con una serina en la posición 13 y una cisteína en la posición 16. Introduciendo genéticamente un sitio de escisión (químico) el péptido híbrido resultante, exportado en el medio, puede escindirse y el péptido eucariota con anillo tioéter se libera.

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

También es posible generar un (poli)péptido que contenga lantionina y/o restos deshidro omitiendo un fragmento C-terminal de una secuencia de lantibiótico y añadiendo un fragmento más largo a la secuencia de lantibiótico

65 restante. Por ejemplo la secuencia del lantibiótico nisina de 34 aminoácidos puede reemplazarse por los 30 primeros aminoácidos N-terminales y extenderse en el extremo C en 6 aminoácidos: KYSGFC. Después de la

deshidratación y formación de anillo tioéter por células con NisBTC, y tratamiento extracelular con tripsina, se produce una variante de encefalina lantionina. En este caso el resto Ser33 de nisina forma parte de la molécula de encefalina recién formada después de la deshidratación y formación de lantionina. La tripsina libera la encefalina por escisión detrás del resto de lisina que reemplaza la histidina en nisina. Se conocen variantes de encefalina lantionina activas (Svenssen et al 2003. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 304: 827-832).

Ya se han previsto diversos usos. Por ejemplo, fármacos basados en péptidos/proteínas que se degradan rápidamente en el plasma sanguíneo pueden protegerse contra la proteólisis mediante anillos tioéter. Además, los nuevos antibióticos pueden usarse como antibióticos especialmente contra bacterias Gram-positivas. Esto es útil dado que hay una creciente y propagada resistencia contra antibióticos clásicos. Además, los nuevos antibióticos pueden usarse como aditivos (alimentarios) para impedir el crecimiento bacteriano y aumentar la vida útil de los productos (alimentarios). El dominio de la síntesis enzimática de anillos tioéter proporciona adicionalmente la posibilidad de sintetizar una amplia diversidad de nuevos péptidos antimicrobianos, que ofrecen muchas posibilidades para evadir la resistencia. Los antibióticos tienen diversas actividades antimicrobianas: permeabilización de membranas, inhibición de síntesis de paredes celulares, modulación de actividades enzimáticas, inhibición del crecimiento de esporas. Los nuevos péptidos o proteínas de tipo antibiótico son más estables (es decir, menos propensos a escisión proteolítica) y pueden tener actividad modulada o un espectro de actividad diferente. En el presente documento se proporciona una selección de dichos péptidos o proteínas en los ejemplos que continuación se ofrecen. Pueden modificarse genéticamente deshidropéptidos que pueden usarse para bloquear la actividad enzimática, especialmente actividad proteasa.

EJEMPLO 1

El transportador NisT puede transportar el prepéptido nisina no modificado

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

Materiales y métodos:

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

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

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

Cultivar las cepas de *L. lactis* NZ9000 o PA1001 (un derivado de NZ9000 que carece de actividad AcmA para anular la lisis celular (Buist et al. 1995. J. Bacteriol. 177: 1554-1563) y que carece de HtrA para disminuir la actividad proteolítica extracelular (Poquet et al. 2000. Mol. Microbiol. 35: 1042-1051) con *pNG-nisT* (Cm) y *pNG-nisA* (Em) en medio basado en M17 (Terzaghi y Sandine. 1975. Appl. Microbiol. 29: 807-813) a una DO₆₀₀ de 0,4. Recoger las células por centrifugación y resuspender en el mismo volumen de Medio Mínimo (Jensen y Hammer, 1993. Appl. Environ. Microbiol. 59: 4363-4366) e inducir para la expresión del prepéptido NisT y NisA por adición de nisina como se ha descrito anteriormente (Kuipers et al. 1997. Tibtech. 15: 135-140). Después de inducción durante una noche y posterior centrifugación, pipetear los sobrenadantes de cultivo hacia arriba y abajo en ziptips C18 (Millipore): dos veces con 10 µl de acetonitrilo al 50%, seguido de dos veces con 10 µl de agua desmineralizada, seguido de ocho veces con 10 µl de sobrenadante, seguido de lavado 2 veces con 10 µl de

agua desmineralizada, seguido de elución usando 2 veces 10 µl de acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 %. Secar al vacío el eluyente final y conservar a -20 °C hasta análisis por espectrometría de masas. Antes del análisis resuspender el material seco en 2,5 µl de acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 % y aplicar 1 µl a la diana. Después de secar, aplicar 1 µl de matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxycinnámico 10 mg/ml completamente disuelto (calentando suavemente y sometiendo a agitación vortical) en acetonitrilo al 50 % que contiene TFA al 0,1 %) a la diana. Usar los siguientes ajustes laser (modo lineal) MALDI-TOFMS: energía ordinaria 100 %, fina 50 %, fuente 20 KV, extra 19800, fuerza 15000, supresión 500, tiempo de impulso 40, tensión de pulso 2200, velocidad de muestreo 500 MHz, sensibilidad 50 mV, disparos 15.

10 Resultados

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

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

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

EJEMPLO 2

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

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

Materiales y métodos.

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

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

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

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

Resultado

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

60 EJEMPLO 3

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

Este ejemplo muestra la exportación fuera de *Lactococcus lactis* PA1001 mediante NisT de una fusión del líder de nisina ampliado en el extremo C con una variante de vasopresina. La vasopresina es una hormona antidiurética peptídica de 9 aminoácidos (aa). Tiene cisteínas en la posición 1 y 6: CYFQNCPRG que forman un

enlace disulfuro interno. Este ejemplo implica una variante de vasopresina C1S. Este ejemplo implica fusión precisa de vasopresina modificada con serina (SerVaso) en el péptido líder NisA de nuevo por modificación genética.

5 Materiales y métodos

Para obtener una fusión exacta y en marco de SerVaso con el péptido líder NisA, convertir primero un vector de expresión pNZ8048 derivado del plásmido *pNG-nisI-SC3*, que contiene SC3 detrás del líder de nisina en un vector de secreción líder-péptido NisA general. Introducir sitios de restricción adecuados y eliminar las secuencias c-myc-SC3 por amplificación PCR de todo el plásmido usando los cebadores: pLP.1 (5'-CGG TCT CAG CGT GGT GAT GCA CCT GAA TC) y pLP.2 (5'-CCA CGCTGA GAC CGC AGC TGG GAT CCG GCT TGA AAC GTT CAA TTG AAA TGG). Cortar el producto PCR con *Eco31I* (secuencias subrayadas en los cebadores) dando como resultado extremos adhesivos (en cursiva en las secuencias de cebadores) que son compatibles para el autoligamiento del plásmido. Después del autoligamiento, el plásmido resultante, pLP1, puede usarse para la fusión precisa de péptidos y proteínas después de la secuencia de aa GASPR del péptido líder NisA usando el sitio de restricción *Eco31I*. Los fragmentos de ADN a insertar en esta posición deben contener un extremo adhesivo 5'-ACGC para permitir el ligamiento. En el extremo 3' el fragmento de ADN debe contener un extremo adhesivo que sea compatible con *Bam*HI (el sitio introducido por el cebador pLP.2, se indica en negrita).

Obtener el gen SerVaso hibridando dos oligómeros: VP. 1: 5'-ACG CTC ATA TTT TCA AAA TTG TCC TCG TGG TTA AG y VP.2: 5'-GAT CCT TAA CCA CGA GGA CAA TTT TGA AAA TAT GA. El fragmento hibridado incluye un codón de terminación y tiene en su extremo 5' el saliente ACGC y en el extremo 3' un extremo adhesivo compatible con *Bam*HI. Ligar el fragmento génico SerVaso en pLP1 digerido con *Eco31I* y *Bam*HI y denominar al plásmido resultante pLP1vp.

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

30 Resultado

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

35 EJEMPLO 4

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

40 Materiales y métodos

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

50 Resultados

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

55 EJEMPLO 5

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

60 Materiales y métodos

Construir el plásmido *pNG-nisABT* similar a la organización de estos genes el productor de nisina de tipo silvestre NZ9700, que es con una repetición invertida entre los genes *nisA* y *nisBT*. En resumen: realizar PCR sobre ADN cromosómico con los cebadores *nisAfw*: 5' CGG TCT CTC ATG AGT ACA AAA GAT TTT AAC TTG GAT TTG G 3' y *nisTrev*: 5' CGG TCT CTC TAG ATT ATT CAT CAT TAT CCT CAT ATT GCT CTG 3'. Clonar el

producto PCR en pGEM-T (ligamiento A-T). Digerir pGEM-TnisABT con Bsal. Ligar nisABT (BSAI) con pNG8048E(ncoI/XbaI). Transformar este plásmido en NZ9000, cultivar e inducir. En este caso, después de la inducción *nisBT* se transcribe solo en baja cantidad por lectura limitada. Someter el sobrenadante a ziptipping y MALDI-TOFMS como en el ejemplo 1.

Resultados

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

EJEMPLO 6

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

Materiales y métodos

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

Como alternativa, y esta es la construcción del plásmido que contiene *nisABTC* con el que se obtuvieron los datos presentados, clonar los genes *nisABTC* sobre un plásmido de entrada. Restringir pNG8048E con HindIII. Retirar el fragmento que contiene Em-r aislando el fragmento vectorial (3 kb) del gel. Autoligar el fragmento vectorial y denominar al vector resultante pBMDL1. Realizar PCR con pBMDL1 para perder el Cm-r e introducir un sitio PstI y un sitio XbaI. Aislar este fragmento este fragmento aislado fuera del gel y estrangular con PstI y XbaI. Cortar pNG8048E también con PstI y XbaI para obtener el fragmento Em-r. Aislar este fragmento de 1 kb fuera del gel y ligar con el producto PCR anterior. Nombrar al nuevo plásmido pBMDL2. Restringir pBMDL2 con SmaI para linealizarlo y obtener extremos romos. Insertar un Casete de Conversión Vectorial de Entrada (RfA) (1,7 kb) por ligamiento en el extremo romo. Obtener así un vector denominado pBMDL3. Para preparar un vector que contenga los genes *nisABTC*, introducir sitios attB de entrada mediante PCR. El fragmento PCR de 6,4 kb se depuró sobre una columna del kit Zymoclean DNA Clean & Concentrator. Se realizó una reacción BP con este producto PCR y pDONR201 (Invitrogen) durante la incubación ON a 25 °C. Obtener el vector de entrada pBMDL4 en células DH5alfa de *E.coli* mediante transformación química. Realizar, con este vector de entrada pBMDL4 y el ya creado pBMDL3, una reacción LR. Obtener el vector pBMDL5 (con *nisABTC*) en EC1000 de *E.coli* (que contiene RepA en el cromosoma) mediante electroporación. Aislar pBMDL5 (que contiene *nisABTC*) y transformar en PA1001 (electroporación).

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

Resultados

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

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

EJEMPLO 7

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

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

5 Materiales y métodos

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

10 Resultado

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

EJEMPLO 8

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

Materiales y métodos

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

Resultado

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

EJEMPLO 9

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

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

Materiales y métodos

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

Resultado

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

EJEMPLO 10

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

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

Materiales y métodos

65 Clonar una construcción líder-salivaricina (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por taquilepsina mutante (tabla 1) y después de esto la *salivaricinaBT*. Transformar este plásmido a una cepa de *Streptococcus salivarius* desprovista de genes de salivaricina. Inducir la transcripción, durante 2-4 horas de cultivo continuado.

Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI- TOFMS (modo lineal).

Resultado

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

EJEMPLO 11

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

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

- 15 Materiales y métodos

- 20 Clonar una construcción lacticina 481-líder (tabla 2) después de una fase de lectura abierta por vasonatrina (tabla 1). Clonar la *lacticina 481-T* en un segundo plásmido con un marcador antibiótico diferente. Transformar ambos plásmidos a una cepa de *L. lactis* desprovista de genes de lacticina 481. Inducir la transcripción de ambos plásmidos cultivando durante una noche en medio mínimo. Realizar ziptipping como en el ejemplo 1 y analizar por MALDI-TOFMS (modo lineal).

- 25 Resultado

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

EJEMPLO 12

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

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

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

- 40 Materiales y métodos

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

Resultado

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

EJEMPLO 13

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

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

- 65 Materiales y métodos.

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

Resultado:

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

Tabla 1, (poli)péptidos seleccionados

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

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

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

Tabla 1A:

Vasopresina: Función: como una hormona antidiurética:

- (A1, S2, R8)-secuencia: ASFQNCPRG; anillo de lantionina S2-C6
- (A1, S2, C3, R8)-secuencia: ASCQNCPRG; anillo de lantionina S2-C3
- (A1, S2, C4, R8)-secuencia: ASFCNCPRG ; anillo de lantionina S2-C4
- (A1, S2, C5, R8)-secuencia: ASFQCCPRG (SEC ID N°); anillo de lantionina S2-C5
- (A1, S2, A6, C7, R8)-secuencia: ASFQNACRG; anillo de lantionina S2-C7
- (A1, S2, A6, C8)-secuencia: ASFQNA PCG; anillo de lantionina S2-C8
- (A1, S2, A6, R8, C9)-secuencia: ASFQNA PRG; anillo de lantionina S2-C9
- (A1, S3, R8)-secuencia: AYSQNCPRG; anillo de lantionina S3-C6
- (A1, S3, C4, R8)-secuencia: AYSCNCPRG ; anillo de lantionina S3-C4
- (A1, S3, C5, R8)-secuencia: AYSQCCPRG; anillo de lantionina S3-C5
- (A1, S3, A6, C7, R8)-secuencia: AYSQNACRG; anillo de lantionina S3-C7
- (A1, S3, A6, C8)-secuencia: AYSQNA PCG; anillo de lantionina S3-C8
- (A1, S3, A6, R8, C9)-secuencia: AYSQNA PRG; anillo de lantionina S3-C9
- (A1, S4, R8)-secuencia: AYFSNCPRG ; anillo de lantionina S4-C6
- (A1, S4, C5, R8)-secuencia: AYFSCCPRG ; anillo de lantionina S4-C5
- (A1, S4, A6, C7, R8)-secuencia: AYFSNACRG ; anillo de lantionina S4-C7
- (A1, S4, A6, C8)-secuencia: AYFSNA PCG ; anillo de lantionina S4-C8
- (A1, S4, A6, R8, C9)-secuencia: AYFSNA PRG ; anillo de lantionina S4-C9
- (A1, S5, R8)-secuencia: AYFQSCPRG ; anillo de lantionina S5-C6
- (A1, S5, A6, C7, R8)-secuencia: AYFQSACRG ; anillo de lantionina S5-C7
- (A1, S5, A6, C8)-secuencia: AYFQSAPCG ; anillo de lantionina S5-C8
- (A1, S5, A6, R8, C9)-secuencia: AYFQSAPRG ; anillo de lantionina S5-C9
- (A1, S6, C7, R8)-secuencia: AYFQNSCRG ; anillo de lantionina S6-C7

Vasopresina: Función: como una hormona antidiurética:

(A1, S6, C8)-secuencia: AYFQNSPCG ; anillo de lantionina S6-C8
 (A1, S6, R8, C9)-secuencia: AYFQNSPCG ; anillo de lantionina S6-C9
 (A1, S7, C8)-secuencia: AYFQNCSCG ; anillo de lantionina S7-C8
 (A1, S7, R8, C9)-secuencia: AYFQNC SRC ; anillo de lantionina S7-C9
 (A1, S7, C9)-secuencia: AYFQNC PSC ; anillo de lantionina S8-C9.

Terlipresina (hormona antidiurética):

5 S4-secuencia: GGGSYFQNC PKG
 Lantionina postraducciona: S4-C9.

Cispresina (hormona antidiurética):

10 S4-secuencia: GGGSYFNCPKG
 Anillo de lantionina postraducciona: S4-C8.

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

15 A13,S16-secuencia:
 YRQSMN NFQGLRAFGSRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDN VAPRSKISPQGY
 Lantionina postraducciona: S16-C21.

Alatostatina I (inhibidor neuro péptido de la síntesis de la hormona juvenil)

20 C6-secuencia: APSGACRLYGFL
 Lantionina postraducciona: S3-C6.

Angiotensina I

25 S7, C10-secuencia: DRVYIHSFHC
 Lantionina postraducciona S7-C10
 Función: en respuesta a una presión reducida, la enzima renina escinde la angiotensina I, a partir de angiotensinógeno, después elimina un dipéptido para producir la angiotensina II fisiológicamente activa, la sustancia con actividad presora más fuerte conocida, que ayuda a regular el volumen y el equilibrio mineral de los fluidos corporales.

30 Antopleurina-A (neuropéptido)

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

Péptido 1 antiinflamatorio (antiinflamación)

40 S1, C6-secuencia: SQMKKCLDS
 Lantionina postraducciona: S1-C6

Dermaseptina (péptido antimicrobiano)

45 C10-secuencia:
 ALWKTM LKKCGTMALHAGKAALGAAADTISQGTQ
 Lantionina postraducciona: T5-C10.

Péptido similar a bombinina (péptido antimicrobiano)

50 C8-secuencia: GIGASILCAGKSALKGLAKGLAEHFAN
 Lantionina postraducciona: S5-C8.

Histatina-5 (péptido salival antimicrobiano)

55 S4, C7-secuencia: DSHSKRCHGYKRKFHDKHHSHRGY
 Lantionina postraducciona: S4-C7.

Indolicidina (péptido antimicrobiano)

- S2, C5-secuencia: ISPWCWPWWPWRR
Lantionina postraducciona: S2-C5.
- 5 Magainina-1 (péptido antimicrobiano)
- C13-secuencia: GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS
Lantionina postraducciona: S8-C13.
- 10 Factor Natriurético Auricular (fuerte sustancia vasoactiva con una función clave en homeostasis cardiovascular y actividad estimuladora del GMPc).
- Secuencia: SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLGCNSFRY
Lantioninas postraduccionales: S1-C7, S19-C23.
- 15 Bradykinina (función importante en fisiología renal y conductual).
- C9-secuencia: RPPGFSPFC
Lantionina postraducciona: S6-C9.
- 20 Péptido Natriurético Cerebral (actúa como una hormona cardiaca implicada en la natriuresis, diuresis, vasorelajación, inhibición de renina y secreción de aldosterona, mejora la función cardiaca)
- S16,C19-secuencia: SPKMVQSGSGCFGRKMSRICSSSGLGCKVLRRH
Lantionina postraducciona: S8-C10, S16-C19
- 25 Péptido Natriurético de tipo C (presenta actividad natriurética y vasodepresora)
- Secuencia: DLRVDTKSRAAWARLLQEHPNARKYKGANKKGLSKGCFGLK LDRIG SMSGLGC
Anillo de lantionina postraducciona: S34-C37, S47-C53.
- 30 Péptido de vasonatrina (vasorelajación)
- Secuencia: GLSKGCFGLKLDRI GSM SGLGCNSFRY
Anillo de lantionina postraducciona: S3-C6, S17-C22.
- 35 Péptido inductor del sueño delta (inducción del sueño delta)
- S2, C6-secuencia: WSGGNCSGE
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C6.
- 40 Alfa-dendrotoxina
- S11,S26-secuencia: PRRKLCILHRSPGRCYDKIPAFYNSKKKQCERFDWSGC GGNSNRFKTIEECRRTCIG
Lantionina postraducciona: S11-C15, S26-C31
Función: afecta a los canales de potasio.
- 45 Eledoisina
- C4-secuencia: PSKCAFIGLM
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C4
- 50 Función: excitación neuronal, causante de respuestas conductuales, vasodilatadoras, secretagogas, causante de la contracción de músculos lisos.
- Equistatina:
- 55 Secuencia: ECESGPCCRNCKFLKEGTICKRARGDDMDDYCNGKTCDCPRNPHK GPAT
Anillos de lantionina postraducciona: S4-C7, T18-C20, T36-C37
Función: inhibidor de agregación plaquetaria dependiente de fibrinógeno.
- Alfa-endorfina
- 60 S2,C6-secuencia: YSGFMCSEKSQTPLVT
Anillo de lantionina postraducciona: S2-C6
Función: opioide.
- 65 beta-endorfina

S21,C26-secuencia: YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNSILKNKYKKGE
Anillo de lantionina postraduccion: S21-C26
Función: opioide.

5 Defensina I

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

10 Secretina

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

Urocortina

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

Urotensina II

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

Péptido A cardioactivo pequeño

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

35 Péptido B cardioactivo pequeño

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

40 Ceratotoxina A

C9-secuencia: SIGSALKKCLPVAKKIGKIALPIAKAALP
Lantionina postraduccion: S4-C9

45 Función: antimicrobiana, péptido hemolítico con actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, estable a 100 grados centígrados.

Cerebelina

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

55 Caribdotoxina

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

60 Colecistoquinina

C8-secuencia: KAPSGRMCIKVNQQLDPSHRISDRYMGWMDF
Lantionina postraduccion: S4-C8

65 Función: contracción de la vesícula biliar y liberación de enzimas pancreáticas en el intestino.

Conopresina G

- 5 S1-secuencia: SFIRNCPKG
Lantionina postraduccional: S1-C6
Función: control conductual.

Alfa-conotoxina EI

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

Corazonina

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

Leu-encefalina

- 20 S2,C3-secuencia: YSCFL
Anillo de lantionina postraduccional: S2-C3
Función: opioide.

25 Met-encefalina

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

30

Oxitocina

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

Exendina-3

- 40 C35-secuencia: HSDGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGCPPPS
Anillo de lantionina postraduccional: S32-C35
Función: similar a la secretina.

Péptido encefalitogénico alérgico experimental

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

50 Péptido complementario de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental

- S4,C7-secuencia: VFISGPCRLLG
Anillo de lantionina postraduccional: S4-C7
Efecto: tiene una función en la encefalomiелitis autoinmunitaria.

55

Gonadoliberina II

- (C9)-secuencia: QHWSHGWCYCG
Anillo de lantionina postraduccional: S4-C9
60 Función: estimula la secreción de gonadotropinas; estimula la secreción de hormonas estimulantes de folículos y luteinizantes.

Ácido tocinoico / ácido presinoico

- 65 (S1,I3)-secuencia: SYIQNC
Anillo de lantionina postraduccional S1-C6

Función: el ácido tocinoico es un inhibidor de oxitocina, que induce el comportamiento materno.

Leuprolida

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

10 Calcitonina

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

ACTH, hormona adrenocorticotrópica

- 20 (Q5,C6)-secuencia:
 SYSMQCFRWGKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAAEFPLEF
 Anillo de lantionina postraducciona S1-C6

Secuencia del fragmento ACTH

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

30 Fragmento del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B

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

35 Péptido inhibidor de conicotropina

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

Factor liberador de corticotropina

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

Somatostatina

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

55 Polipéptido pancreático humano

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

60 Péptido YY

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

Glucagón

(C5,S24,C29)-secuencia: HSQGCFTSDYSKYLDSSRAQDFVSWLMNC

Anillos de lantionina postraducciona S1-C5, S24-C29

- 5 Función: restablecimiento del nivel de glucosa en sangre cuando es demasiado bajo.

alfa-neuroquinina

(C9)-secuencia: HKTDSFVGCM

- 10 Anillo de lantionina postraducciona S5-C9

Función: antagonista de taquiquinina.

LHRH1, hormona liberadora de hormona luteinizante

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

(Q1, C7)-secuencia: QHWSYGCRPG

Anillo de lantionina postraducciona S4-C7

(S1, C4)-Secuencia:	SHWCYGLRPG	anillo postraducciona: S1-C4
(S1, A4, C5)-Secuencia:	SHWACGLRPG	anillo postraducciona: S1-C5
(S1, A4, C6)-Secuencia:	SHWAYCLRPG	anillo postraducciona: S1-C6
(Q1, S2, A4, C5)-Secuencia:	QSWACGLRPG	anillo postraducciona: S2-C5
(Q1, S2, A4, C6)-secuencia:	QSWAYCLRPG	anillo postraducciona: S2-C6
(Q1, S2, A4, C7)-secuencia:	QSWAYGCRPG	anillo postraducciona: S2-C7
(Q1, S3, A4, C6)-secuencia:	QHSAYCLRPG	anillo postraducciona: S3-C6
(Q1, S3, A4, C7)-secuencia:	QHSAYGCRPG	anillo postraducciona: S3-C7
(Q1, S3, A4, C8)-secuencia:	QHSAYGLCPG	anillo postraducciona: S3-C8
(Q1, C8)-secuencia:	QHWSYGLCPG	anillo postraducciona: S4-C8
(Q1, C9)-secuencia:	QHWSYGLRPG	anillo postraducciona: S4-C9
(Q1, A4, S5, C8)-secuencia:	QHWASGLCPG	anillo postraducciona: S5-C8
(Q1, A4, S5, C9)-secuencia:	QHWASGLRPG	anillo postraducciona: S5-C9
(Q1, A4, S5, C10)-secuencia:	QHWASGLRPC	anillo postraducciona: S5-C10
(Q1, A4, S6, C9)-secuencia:	QHWAYSLRPG	anillo postraducciona: S6-C9
(Q1, A4, S6, C10)-secuencia:	QHWAYSLRPC	anillo postraducciona: S6-C10
(Q1, A4, S7, C10)-secuencia:	QHWAYGSRPG	anillo postraducciona: S7-C10.

- 20 LHRH2, fragmento de la hormona liberadora de hormona luteinizante

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

(Q1, C7)-secuencia: QHWSHGCYPG

- 25 Anillo de lantionina postraducciona S4-C7

(S1, C4)-secuencia:	SHWCHGWYPG	anillo postraducciona: S1-C4
(S1, A4, C5)-secuencia:	SHWACGWYPG	anillo postraducciona: S1-C5
(S1, A4, C6)-secuencia:	SHWAHCWYPG	anillo postraducciona: S1-C6
(Q1, S2, A4, C5)-Secuencia:	QSWACGWYPG	anillo postraducciona: S2-C5
(Q1, S2, A4, C6)-secuencia:	QSWAHCWYPG	anillo postraducciona: S2-C6
(Q1, S2, A4, C7)-secuencia:	QSWAHGCYPG	anillo postraducciona: S2-C7
(Q1, S3, A4, C6)-secuencia:	QSHAHCWYPG	anillo postraducciona: S3-C6
(Q1, S3, A4, C7)-secuencia:	QSHAHCWYPG	anillo postraducciona: S3-C7
(Q1, S3, A4, C8)-secuencia:	QSHAHCWCPG	anillo postraducciona: S3-C8
(Q1, C8)-secuencia:	QHWSHGWCPG	anillo postraducciona: S4-C8
(Q1, C9)-secuencia:	QHWSHGWYCG	anillo postraducciona: S4-C9
(Q1, A4, S5, C8)-secuencia:	QHWASGWCPG	anillo postraducciona: S5-C8
(Q1, A4, S5, C9)-secuencia:	QHWASGWYCG	anillo postraducciona: S5-C9
(Q1, A4, S5, C10)-secuencia:	QHWASGWYPC	anillo postraducciona: S5-C10
(Q1, A4, S6, C9)-secuencia:	QHWAHSWYCG	anillo postraducciona: S6-C9

(Q1, A4, S6, C10)-secuencia: QHWAHSWYPC anillo postraduccion: S6-C10
(Q1, A4, S7, C10)-secuencia: QHWAHGSYPC anillo postraduccion: S7-C10.

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

5 (S103,C109)-secuencia: HSQKHWFCGL
Anillo de lantionina postraduccion S103-C109
Función: factor de crecimiento.

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

10 Secuencia: PALPEDGGSGAFPPCHFDPKRLY
Anillo de lantionina postraduccion S11-C17
Función: factor de crecimiento.

Insulina

15 Secuencias:
Cadena alfa: GIVEQCCASVCSLYQLENYCN (SEC ID N°:)
(S9-C14, T27-C30)-cadena beta: FVNQHLCGSHLVECLYLVCGERGFFYTPKC (SEC ID N°:)
Anillos de (metil)lantionina postraduccion S9-C14, T27-C30
20 Enlaces disulfuro: alfa 6 - 11 alfa 7 - beta 7, alfa 20 - beta 19
Función: tratamiento de la diabetes.

Paratormona:

25 (S36-C39, T79-C82)-secuencia:
SVSEIELMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVSLGCPLAPRDAG
SERPRKKEDNVLVESHEKSLGEADKADVNVLTKACSE
(SEC ID N°:)
Anillos de (metil) lantionina postraduccion S36-C39, T79-C82
30 Función: modulación del contenido de calcio en suero que afecta a la fisiología mineral y ósea.

Péptido inhibidor de unión a fibrinógeno

35 S6,C9-secuencia: HHLGGSKQCGDV
Lantionina postraduccion: S6-C9.

Péptido inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos

40 S1,C3-secuencia: SPCGHYKG
Anillo de lantionina postraduccion: S1-C3
Efecto: inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos.

Galanina

45 C10-secuencia: GWTLSAGYCLGPHAVGNHRSFSDKNGLTS
Anillo de lantionina postraduccion: S6-C10
Función: contrae la musculatura lisa del tracto gastrointestinal y genitourinario, regula la liberación de la hormona del crecimiento, modula la liberación de insulina.

50 Polipéptido inhibidor gástrico

S28,C31-secuencia: YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLSQKCKKNDWKHNITQ
Función: fuerte estimulación de secreción de insulina y relativamente mal inhibidor de secreción de ácido gástrico.

55 Gastrina-I grande

S8,C11-secuencia: LGPQGPPSLVCDPSKKQGPWLEEEEEAYGWMDF
Anillo de lantionina postraduccion: S8-C11
60 Función: estimula la secreción gástrica de HCl, la secreción de enzimas pancreáticas, la contracción del músculo liso y aumenta la circulación sanguínea y la secreción de agua en el estómago e intestino.

Pentagastrina

S1,C4-secuencia: SWMCF
Anillo de lantionina postraduccion: S1-C4

5 Péptido liberador de gastrina

S9,C12-secuencia: VPLPAGGGSVLCKMYPRGNHWAVGHLM
Anillo de lantionina postraduccion: S9-C12
Función: liberación de gastrina.

10 Factor alfa de crecimiento transformante

Secuencia: VVSHFNDPCDSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGAR CEHA DLLA
Anillo de (metil)lantionina postraduccion: S3-C8, T21-C22, S37-C44

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

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

Factor liberador de la hormona del crecimiento

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

Guanilina

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

35 Helospectina I

S15,C18-secuencia: HSDATFTAESKLLSKLCLQKYLESILGSSTSPRPPSS
Anillo de lantionina postraduccion: S15-C18

40 Fragmento del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B

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

45 Molécula de adhesión intercelular

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

50

Taquiplesina I

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

55

Fragmento peptídico antigénico del HIV (gp 120)

60 (S10,C14)-secuencia: CGKIEPLGVSPCKRRVVQREKR
Anillo de lantionina postraduccion S10-C14.

Fragmento peptídico antigénico I de IHIV (gp 41)

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

Péptido antigénico 5 del HIV (gp41)

- 5 (S20)-secuencia: RVTAIEKYLQDQARLNSWGSFRQVCHTTVPWVND
Anillo de lantionina postraducciona S20-C26.

Inhibidores de proteasa del HIV

- 10 Secuencia: TVSFCF
Anillo de lantionina postraducciona T1-C5
Función: inhibidor de proteasa del HIV.

Análogo del factor de crecimiento I similar a insulina

- 15 S1,C4-secuencia: SYACPLKPAKSC
Anillos de lantionina postraducciona: S1-C4, S11-C12.

IGF II 69-84:

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

Fragmento de interleucina 8:

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

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

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

- 35 Leucoquinina I (péptido neuroactivo)

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

- 40 Leucopiroquinina

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

- 45

Mastoparén

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

Hormona concentradora de melanina

- 55 S11-Secuencia: DFDMLRCMLGSVYRPCWQV (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona: S11-C16
Función: posible neurotransmisor, implicado en la regulación del comportamiento dirigido

Melitina

- 60 C14-secuencia: GIGAVLKVLTLGLPCLISWIKRKRQQ (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona: T10-C14
Función: péptido membrana activo del veneno de abeja.

- 65 Motilina

C9-secuencia: FVPIFTYGCLQRMQEKERKNGQ (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona: T6-C9
Función: regulación de motilidad gastrointestinal interdigestiva.

5 Neuropéptido Y

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

10 Osteocalcina

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

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

(C21)-secuencia: YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNCIIKNAY (SEC ID N°:)
Metillantionina postraducciona T16-C21
Funciones: analgesia, cambios conductuales, liberación de hormona del crecimiento.

Péptido relacionado con el oncogén Ras

25 HU-ras^{ha}
(S2, C5)-secuencia: GSVGCGKS (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona S2-C5.

Péptido relacionado con el oncogén Ras

30 Hu-ras^{T24}
(S2, C5)-secuencia: GSVGCGKS (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona S2-C5.

35 Péptido relacionado con el oncogén Ras

Hu-(Hu-ras^{t24})-Lys
(S3, C6)-secuencia: YGSVGCGKSK (SEC ID N°:)
Anillo de lantionina postraducciona S3-C6.

40 Tabla 1B:

Albúmina

Número de acceso: P02768

45 Secuencia: DTHKSE IAHRFKDLGE EHFKGLVLIA FSQYLQQCPF DEHVKLVNEL TEFKTCVAD
ESHAGCEKSL HTLFGDELCK VASLRETYGD MADCCEKQEP ERNECFLSHK DDSPDLPLK
PDPNTLCDEF KADEKKFWGK YLYEIARRHP YFYAPELLYY ANKYNGVFQE CCQAEDKGAC LLPKIETMRE
KVLASSARQR LRCASIQKFG ER- ALKAWSVA RLSQKFPKAE FVEVTKLVD LTKVHKECCH
50 GDLLECADDR ADLAKYICDN QDTISSKLKE CCDK- PLLEKS HCIAEVEKDA IPENLPPLTA DFAEDKDVCK
NYQEAQDAFL GSFLYEYSRR HPEYAVSVLL RLAK- YEATL EECCAADDPH ACYSTVFDKL
KHLVDEPQNL IKQNCQFEK LGEYGFQNAL IVRYTRKVPQ VSTPTLVEVS RSLGKVGTRC CTKPESERMP
CTEDYLSLIL NRLCVLHEKT PVSEKVTGCC TESLVNRRPC FSALTPDETY VPKAFDEKLF TFHADICTLP
DTEKQIKKQT ALVELLKHHP KATEEQLKTV MENFVAFVDK CCAADDKEAC FAVEGPKLVV STQTALA
Enlaces disulfuro: 77-86; 99-115; 114-125; 148-193; 192-201; 224-270; 269-277; 289-303; 302-313; 340-385;
55 384-393; 416-462; 461-472; 485-501; 500-511; 538-583; 582-591 (los números corresponden a la proteína
precursora que contiene 24 aminoácidos más, en el extremo N)
Función: regulación de la presión osmótica coloidal del plasma sanguíneo, unión a moléculas de plasma
sanguíneo.

60 Alglucerasa

Número de acceso: P04062

65 Secuencia: A RPCIPKSGFY SSVVCVCNAT YCDSFDPPTF PALGTFSRYE STRSGRRMEL SMGPIQANHT
GT- GLLTLQEP EQKFQKVKGF GGAMTDAAA NILALSPPAQ NLLKSYFSE EGIGYNIIRV PMASCDIFSIR
TYTY- ADTPDD FQLHNFSLPE EDTKLKPLI HRALQLAQRV VSLASPWTS PTWLKTNAGV NGKGSLLKQGP
GDIYHQT- WAR YFVKFLDAYA EHKLQFWAVT AENEPSAGLL SGYPFQCLGF TPEHQDFIA
RDLGPTLANS THHNVRLML DDQRLLLPHW AKVVLTDPEA AKYVHGIAPH WYLDLFLAPAK ATLGETHRLF

PNTMLFASEA CVGSKFWEQS VRLGSWDRGM QYSHSIITNL LYHVVGWTDW NLALNPEGGP
NWVRNFVDSP IVDITKDTF YKQPMFYHLG HF- SKFIPEGs QRVGLVASQK NDLDVAALMH PDGSAVVVVL
NRSSKDVPLT IKDPAVGFLF TISPGYSIHT YLWHRQ

Función: glucosilceramidasa.

5

Alfa-galactosidasa

Número de acceso: P06280

Secuencia: LDNGLARTP TMGWLHWERF MCNLDCEEP DSCISEKLFM EMAELMVSEG WKDAGYEYLC
IDD- CWMAPQR DSEGRQADP QRFPHGIRQL ANYVHSGKLG LGIYADVGNK TCAGFPGSFG
YYDIDAQTFA DWGVDLLKFD GCYCDSLENL ADGYKHMSLA LNRTGRSIVY SCEWPLYMWP
FQKPNYTEIR QYCNHWRNFA DDDSWKSIK SILDWTSFNQ ERIVDVAGPG GWNDPDMPLV
GNFGLSWNQQ VTQMALWAIM AAPLFMSNDL RHISPQAKAL LQDKDVIAN QDPLGKQGYQ
LRQGDNFEVW ERPLSGLAWA VAMINRQEIG GPRSYTIAVA SLG- KGVACNP ACFITQLLPV
KRKLGFYEWT SRLRSHINPT GTVLLQLENT MQMSLKDLL

10

Función: galactosidasa.

15

Alteplasa

Número de acceso: P00750

Secuencia: SYQVI CRDEKTQMIY QQHQSWLRPV LRSNRVEYCW CNSGRAQCHS VPKSCSEPR
CFNGGTC- QQA LYFSDFVCQC PEGFAGKCCE IDTRATCYED QGISYRGTSW TAESGAECTN
WNSSALAQKP YSGRRP- DAIR LGLGNHNYCR NPDRDSKPWC YVFKAGKYSS EFCSTPACSE
GNSDCYFGNG SAYRGTHSLT ESGAS- CLPWN SMILIGKVTY AQNPSAQLG LGKHNYCRNP
DGDAPWCHV LKNRRLTWEY CDVPSCSTCG LR- QYSQPQFR IKGGLFADIA SHPWQAAIFA
KHRRSPGERF LCGGILISSC WILSAHCFQ ERFPFHHTV IL- GRTRYVVP GEEEQKFEVE KYIVHKEFDD
DTYDNDIAL QLKSDSSRCA QESSVVRTVC LPPADLQLPD WTE- CELSGYG KHEALSPFYS
ERLKEAHVRL YPSSRCTSQH LLNRTVTDNM LCAGDTRSGG PQANLHDACQ GDS- GGPLVCL
NDGRMTLVGI ISWGLGCGQK DVPGVYTKVT NYLDWIRDNM RP

20

25

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

30

Función: escinde el plasminógeno para formar plasmina

Antitrombina III

Número de acceso: P01008

Secuencia: HGSPVDIC TAKPRDIPMN PMCIYRSPEK KATEDEGSEQ KIPEATNRRV WELSKANSRF
ATTFYQH- LAD SKNDNDNIFL SPLSISTWA MTKLGACNDT LQQLMEVFKF DTISEKTSQ IHHFFAKLNC
RLYRKANKSS KLVSANRLFG DKSLTFNETY QDISELVYGA KLQPLDFKEN AEQSRAAINK WWSNKTEGRI
TDVIPSEAIN ELTV- LVLVNT IYFKGLWWSK FSPENTRKEK FYKADGESCS ASMMYQEGKF RYRRVAEGTQ
VLELPFKGDD ITMV- LILPKP EKSLAKVEKE LTPEVLQEWL DELEEMMLVV HMPRFRIEDG FSLKEQLQDM
GLVDLFSPEK SKLPGI- VAEG RDDLYVSDAF HKAFLEVNEE GSEAAASTAV VIAGRSLNPN RVTFTKANRPF
LVFIREVPLN TIIFMGRVAN PCVK

35

40

Disulfuro: 40-160;53-127; 279-462 (contado con 32 aa de secuencia señal)

Función: inhibición de la coagulación.

45

Aprotinina

Número de acceso: P00974

Secuencia: RPDFC LEPPYTGPCK ARIIRYFYNA KAGLCQTFVY GGCRAKRNNF KSAEDCMRTC GGA

Disulfuro: 40-90; 49-73; 65-86 (contando con 35 aa en el extremo N)

Función: Inhibe tripsina, kalikreína, quimotripsina y plasmina.

50

Asparaginasa

Número de acceso: P20933

Secuencia:

Cadena alfa: SPLPLV VNTWPFKNAT EAAWRALASG GSALDAVESG CAMCEREQCD GSVGFGGSPD
ELGET- TLDAM IMDGTTMDVG AVGDLRRIK AIGVARKVLE HTHTLLVGE SATTFQAQSMG FINEDLSTSA
SQALHSD- WLA RNCQPNYWRN VIPDPSKYCG PYKPPGILKQ DIPIHKETED DRGHD

55

Cadena beta: TIGMV VIHKTGHIAA GTSTNGIKFK IHGRVGDSPG PAGAYADDT AGAAAATGNG
DILMRFLPSY QAVEYMRRGE DPTIACQKVI SRIQKHFEF FGAVICANVT GSYGAACNKL STFTQFSFMV
YNSEKNQPT EKVDCI

60

Disulfuro: 64-69; 163-179; 286-306; 317-345 (contando con 23 aa extras en el extremo NI)

Función: escisión de glucoproteínas.

Becaplermina

Número de acceso: P01127

Secuencia: SLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV WPPCVEVQRC SGCCNNRNQV CRP-
TQVQLRP VQVRKIEIVR KKPIFKKATV TLEDHLACKC ETVAARPVT RSPGGSQEQR AKTPQTRVTI

65

RTVRVR- RPPK GKHRKFKHTH DKTALKETLG

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

Función: factor de crecimiento de plaquetas.

5

Proteína morfogénica ósea 7

Número de acceso: P34819

Secuencia: GKHNSAPMFM LDLYNAMAVE EGGGPAGQGF SYPYKAVFST QGPPLASLQD SHFLTDADMV

10

MS- FVNLVEHD KEFFHPRYHH REFRFDLSKI PEGEAVTAAE FRIYKDYIRE RFDNETFRIS VYQVLQEH LG

RES- DLFLDS RTLWASEEGW LVFDITATSN HWVVPNRHNL GLQLCVETLD GQSINPK

Función: induce la formación ósea, implicada en la regulación de Ca

Catalasa

Número de acceso: P04040

15

Secuencia: ADSRDPASDQ MQHWKEQRAA QKADVLTTGA GNPVGDKLNV ITVGPRGPLL VQDVVFTDEM

AH- FDRERIEPE RVVHAKGAGA FGYFEVTHDI TKYSKAKVFE HIGKKTPIAV RFSTVAGESG SADTVRDPRG

FAVK- FYTEDG NWDLVGNNTF IFFIRDPILF PSFIHSQKRN PQTHLKDPDM VWDFWSLRPE SLHQVSFLFS

DRGIP- DGHRH MNGYGSHTFK LVNANGEAVY CKFHYKTDQG IKNLSVEDAA RLSQEDPDYG

20

IRDLFNAIAT GKYPSTW- FYI QVMTFNQAE FPFNPFDLTK WPHKDYPLI PVGKLVLRN PVNYFAEVEQ

IAFDPNMPG GIEASPDKML QGRLFAYPDT HRRLGPNYL HIPVNCPIRA RVANYQRDGP

MCMQDNQGA PNYYPNSFGA PEQQPSALEH SIQYSGEVRR FNTANDDNVT QVRAFVNVN

NEEQRKRLCE NL4GHLKDAQ IFIQKAVKN FTEVHPDYGS HIQALLDKYN AEKPKNAIHT FVQSGSHLAA

REKANL

Función: protección contra H₂O₂.

25

Cecropina B

Número de acceso: P01508

Secuencia: KWKV FKKIEKMGRN IRNGIVKAGP AIAVLGEAKA LG

Función: Antibacteriana.

30

Celulasa

Número de acceso: P23548

Secuencia: MKKKGLKKTFFVIAASLVMGF TLYGYTPVSA DAASVKGYH TQGNKIVDES GKEAAFNGLN WF-

35

GLETPTYT LHGLWSRSM DMLDQVKKEG YNLIRLPYSN QLFDSRRPD SIDYHKNPDL VGLNPIQIMD

KLIEK- AGQRG IQIILDRHRP GSGGQSELWY TSQYPERWI SDWKMLADRY KNNPTVIGAD

LHNEPHGQAS WGT-GNASTDW RLAAQRAGNA ILSVNPWLI LVEGVDHNVQ GNNSQYWWGG

NLTGVANYPV VLDVPNRVVY SPH- DYGPVS SQPWENDPAF PSNLPAIWDQ TWGYISKQNI

APVLVGEFGG RNVDLSCPEG KWQNALVHYI GANNLYFTYW SLNPNSGDTG GLLDDWTTW

40

NRPKQDMLGR IMKPVVVAQ QAEEAAE

Función: hidrólisis de celulosa.

Alfa coriagonadotropina

Número de acceso: P01215

45

Secuencia: APDVQD CPECTLQENP FFSQPGAPIL QCMGCCFSRA YPTPLRSKKT MLVQKNVTSE

STCCVAK- SYN RVTVMGGFKV ENHTACHCST CYYHKS

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

Beta coriagonadotropina

50

Número de acceso: P01233

Secuencia: SKEPLRPRCR PINATLAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MTRVLQGVLP ALPQVVCNYR

DVRFE- SIRLP GCPRGVNPV SYAVALSCQC ALCRRSTTDC GPKDHPHLC DDPRFQDSSS

SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQ

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

55

Función: estimula la producción de esteroides.

Quimopapaína

Número de acceso: P14080

60

Secuencia: PQSID WRAKGAVTPV KNQGACGSCW AFSTIATVEG INKIVTGNLL ELSEQELVDC

DKHSYGCKGG YQTT-SLQYVA NNGVHTSKVY PYQAKQYKCR ATDKPGPKVK ITGYKRVPSN

CETSFLGALA NQPLSVLVEA GGKPFQ-LYKS GVFDGPGCTK LDHAVTAVGY GTSDGKNYII

IKNSWGPWNWG EKGYMRLKRQ SGNSQGTGCV YKSSYYP-FKG FA

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

Función: tiol proteasa.

65

Quimotripsina

Número de acceso: P54414

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

Función: serina proteasa.

Endotelina grande

Secuencia: CSCSSLMDKECVYFCHLDIIWVNTPEHVVVPYGLGSPRS

Función: las endotelinas son péptidos vasoconstrictores derivados de endotelio.

Toxina de Clostridium botulinum de tipo A

Número de acceso: Q45894

Secuencia de cadena ligera A: PFVVKQFNYK DPVNGVDIAY IKIPNAGQMQ PVKAFKIHNK IWVIPERDTF
TNPEEGDL- NP PPEAKQVPVS YYDSTYSTD NEKDNLYLKV TKLFEIYST DLGRMLLSI VRGIPFWGGS
TIDTELKVID TNC- INVIQPD GSYRSEELNL VIIGPSADII QFECKSFGHD VLNLTRNGYG STQYIRFSPD
FTFGFEESLE VDTNPLL- GAG KFATDPAVTL AHELIHAEHR LYGIAINPNR VFKVNTNAYY EMSGLEVSFE
ELRTFGGHDA KFIDSLQENE FRLYYNKKF DVA STLNKAK SIIGTTASLQ YMKNVFKEKY LLEDSTSGKF
SVDKLFKDKL YKMLTEI YTE DN- FVNFFKVI NRKTYLNFDK AVFRINIVPD ENYTIKDGFN LKGANLSTNF
NGQNTINSR NFTRLKNFTG LFEFYKLL- CV RGIIPFKTKS LDEGYNK

Secuencia de cadena pesada A: ALN DLICVNNWD LFFSPSEDNF TNDLDKVEEI TADTNIEAAE
ENISLDLIQQ YYLT- FDFDNE PENISLENLS SDIIGQLEPM PNIERFPNGK KYELDKYTMF HYLAQEFEH
GDSRIILTNS AEEALLKPNV AYTFSSKYV KKINKAVEAF MFLNWAEELV YDFTDETNEV TTMDKIADIT
IIVPYIGPAL NIGNMLSKGE FVEAI- IFTGV VAMLEFIPEY ALPVFGTFAI VSYIANKVLT VQTINNALS
RNEKWDEVYK YVTNWLAKV NTQIDLIREK MKKALENQAE ATKAIINYQY NQYTEEEKNN INFNIDDLSS
KLNESINSAM ININKFLDQC SVSYLMNSMI PYAVKRLKDF DASVRDVLK YIYDNRGTLV LQVDRKDEV
NNTLSADIPF QLSKYVDNKK LLSTFTYEIK NIVNT- SILSI VYKKDDL DL SRYGAKINIG DRVYYSIDK
NQIKLINLES STIEVILKNA IVYNSMYENF STSFWIKIPK YF- SKINLNE YTIINCIENN SGWKVSLNYG
EIIWTLQDNK QNIQRVVFKY SQMVNISDYI NRWIVTITN NRTLKSKIYI NGRLLDQKPI SNLGNHASN
KIMFKLDGCR DPRRYIMIKY FNLFDKELNE KEIKDLYDSQ SNSGILKDFW GNYLQYDKPY YMLNLFDPNK
YVDVNNIGIR GYMYLKGPRG SVVTTNIYLN STLYEGTKFI IKKYASGNED NIVRNNDRVY INVVVKNKEY
RLATNASQAG VEKILSALEI PDVGNLSQV VMKSKDDQGI RNKCKMNLQD NNG- NDIGFIG FHLYDNI AKL
VASNWNVRQV GKASRTFGCS WEFIPVDDGW GESSL

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

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

Toxina de Clostridium botulinum de tipo B

Número de acceso: P10844

Secuencia: PVTINNFNYN DPIDNNIIM MEPPFARGTG RYYKAFKITD RIWIIPERYT FGYKPEDFNK
SSGIFNRD- VC EYDYPDYLT NDKKNIFLQT MIKLFNRIKS KPLGEKLLEM IINGIPYLG DRRVPLEEFNT
NIASVTNKL ISNP- GEVERK KGIFANLIIF GPGPVLNENE TEDIGIQNH ASREGFGGIM QMKFCPEYVS
VFNNVQENKG ASIF- NRRGYF SDPALILMHE LIHVLHGLYG IKVDDLPIVP NEKKFFMQST DAIQAEELYT
FGGQDPSIIT PSTDKSIYDK VLQNFRIQVD RLNVKLVCS DPNININIYK NKFKDKYK FV EDSEKYSID
VESFDKLYKS LMFGFTETNI AENYKIK- TRA SYFSDSLPPV KIKNLLDNEI YTIEEGFNIS DKDMEKEYRG
QNKAINQAY EEISKEHLAV YKIQMCKSVK APGICIDVDN EDLFFIADKN SFSDDLKNE RIEYNTQSNY
IENDFPINEL ILDTDLISKI ELPSENTESL TDFN- VDVPVY EKQPAIKKIF TDENTIFQYL YSQTFFPLDIR
DISLTSSFDD ALLFSNKVYS FFSMDYIKTA NKVVEAGLFA GWVKQIVNDF VIEANKSNTM DKADI SLIV
PYIGLALNVG NETAKGNFEN AFEIAGASIL LEFIEPELLIP VVGAFLE- SY IDNKNKIKT IDNALTNRNE
KWSDMYGLIV AQWLSTVNTQ FYTIKEGMYK ALNYQAQALE EIKYRYNIY SEKEKSNINI DFNDINSKLN
EGINQAIDNI NNFINGCSVS YLMKKMIPLA VEKLLDFDNT LKKNLLNYID ENKLYLIG- SA EYEKSKVNKY
LKTIMPFDLIS IYTNLTILIE MFNKNYSEIL NNIILNRYK DNNLIDLSGY GAKVEVYDGV ELND- KNQFKL
TSSANSKIRV TQNQNIIFNS VFLDFSVSFW IRIPIKYNDG IQNYIHNEYT IINCMMKNSG WKISIRGNRI
IWTLIDINGK TKSVEFEYNI REDISEYINR WFFVTITNNL NNAKIYINGK LESNTDIKDI REVIANGEII
FKLDGDIRT QFIWMKYFSI FNTLSQSN EERYKIQSYS EYLKDFWGNP LMYNKEYYMF NAGNKNYSYK
LKKDSPVGEI LTRSKYNQNS KYINYRDLYI GEKFIIRRS NSQSINDDIV RKEDIYLD FNLNQEWVY
TYKYFKKEE KLFLA- PISDS DEFYNTIQIK EYDEQPTYSC QLLFKKDEES TDEIGLIGIH RFYESGIVFE
EYKDYFCISK WYLKEVKRKP YNLKLGCNWQ FIPKDEGWTE

Disulfuro: 436-445 INTERCADENA (PROBABLE).

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

Colágeno

Número de acceso: P30754

Secuencia: YRAGPRYIQA QVGPIGPRGP PGPPGSPGQQ GYQGLRGEPG DSGPMGPIGK RGPPGPAGIA
GKS- GDDGRDG EPGRGGIGP MPRGAGGMP GMPGPXGHRG FRGLSGSXGE QGKSGNQGP
GGPGAPGSG PIGPRGQTGE RGRDGKSLP GLRGVDLAG PPGPPGPIGS TGSPGFPGTP
GSKGDRGQSG LXGAQLQGP VGLSGQPGA GENGHPMPG MDGANGPGA SGESGLPGPS
GFPGRGMPG TAGSPGQAGA XGDGPT- GEQ GRPGAPGVXG SSGPPGDVGA PGHAGEAGKR
GSPGSPGPAG SPGPQGDRGL PGSRGLPGMT GAS- GAMGIPG EKGPSGPGA KGPTGDTGRQ

- GNQGTPIAG LPGNPGSDGR PGKDGRPGIR GKDGKQGEQG PQGPQGLAGL QGRAGPPGAR
GEPGKNGAPG EPGAHEQGD AGKDGETGAA GPPGAAGPTG ARGPPG- PRGQ QGFQGLAGAQ
GTPGEAGKTG ERGAVGATGP SGPAGPGER GAPGDRGNVG PRGMPPGERGA TGPAGPTGSP
GVAGAKGQGG PPGPAGLVGL PGERGPKGVG GSXGSRGDIG PRGKAGERGK DGERGER- GEN
5 GLPGPSGLAA SXGERGDMGS PGERGSPGA GERGPAGSQG IQGQPGPPGD AGPAGTXGDI GF-
PGERGTRG ATGKQGARGP RGLAGKRGLR GAGGSRGETG AQGEIGLPGS PGQPGLPGPS
GQPGSPGPAG TAGKQGVXGA RGSPGLVGKQ GDRGSDGEPG RDGTXGERGE DGPPGVSGPT
GAPGQQGERG MPGM- VGLRGE TGPMGGQGMX GDGGPPGPSG DRGERGNAGP QGPTGPSGQA
GAPGQEGAPG KDGLPGLAGR PGERGEPGVA GRAGSQLAG LMGQRGLPGA AGPPGDRGER
10 GEPGGQGVQG PVGAPGSQGP AGIMGMX- GEA GKGAXGDKG WTGLPGLQGL QGTPGHSGES
GPPGAPGPRG ARGEAGGRGS QGPPGKDGQP GPS- GRVGPRG PSGDDGRSGP PGPPGPPGPP
GNSDYGA
Función: formación de fibrilla
- 15 Colagenasa
Número de acceso: P08897
Secuencia: IINGYEAYTG LFPYQAGLDI TLQDQRRVWC GGSLIDNKWI LTAHCVHDA VSVVYLGSA
VQYEGEAVVN SERIISHSMF NPDTYLNDA LIKIPHYEYD DNIQPIRLPS GEELNNKFEN IWATVSGWGQ
SNT- DTVLQY TYNLVIDNDR CAQEYPPGII VESTICGDTG DGKSPCFGDS GGPVFLSDKN LLIGVVSFVS
20 GAGCES- GKPV GFSRVTSYMD WIQNTGIIIF
Disulfuro: 60-76; 181-196; 206-234
Función: Serina proteasa.
- 25 Corticotropina, ACTH
Número de acceso: P01189
Secuencia: WCLE SSQCQDLTTE SNLLECIRAC KPDLSAETPM FPGNGDEQPL TENPRKYVMG
HFRWDRFGRR NSSSSGSSGAGQKREDVSAG EDCGPLPEGG PEPRSDGAKP GPREGKRSYS
MEHFRWGKPV GKRRPVKVY PNGAEDESAE AFPLEFKREL TGQRLREGDG PDGPADDGAG
AQADLEHSL VAAEKKDEGP YRMEHFRWGS PPKDKRYGGF MTSEKSTPL VTLFKNAIK NAYKKGE
30 Disulfuro: 28-50 (contando con una señal de 26 aa)
Función: estimulación de melanocitos.
- Domasa alfa
Número de acceso: P24855
35 LKIAAFNI QTFGETKMSN ATLVSYIVQI LSRDYDIALVQ EVRDSHLTAV GKLLDNLNQD APDTYHYVVS
EPLGRN- SYKE RYLFVYRPDQ VSAVDSYYD DGCEPCGNDT FNREPAIVRF FSRFTEVREF
AIVPLHAAPG DAVAEIDALY DVYLDVQEKW GLEDVMLMGD FNAGCSYVRP SQWSSIRLWT SPTFQWLIPD
SADTTATPTH CAYDRIVVAG MLLRGAVVPD SALPFNFQAA YGLSDQLAQA ISDHYPVEVM LK
40 Disulfuro: 123-126; 195-231 (contando con 21 aa extra en el extremo N)
Función: endonucleolítica, se une a G-actina.
- Eptacog alfa (factor VII)
Número de acceso: P08709
45 Secuencia: NAFLEELRP GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF WISYSDGDQC ASSPCQNGGS CK-
DQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI CVNENGCEQ YCSDHTGTRK SCRCHEGYSL LADGVSTPT
VEYPCGKIPI LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGCEPWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWWVS AAHCFDKIKN
WRN- LIAVLGE HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVPGTTN HDIALRLHQ PVVLTDHVVP LCLPERTFSE
RTLAFVRF- SL VSGWGQLLDR GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQRKVGDS PNITEYMFCA
50 GYSDGSKDSC KGDSGG- PHAT HYRGTWYLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL
MRSEPRPGVL LRAFP
Disulfuro: 77-82; 110-121; 115-130; 132-141; 151-162; 158-172; 174-187; 195-322; 219-224; 238-254; 370-
389; 400-428 (contando con 61 aa en el extremo N)
Función: coagulación.
- 55 Etanercept
Número de acceso: P20333
Secuencia: LPAQVAF PYAPEPGSTC RLREYYDQTA QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED
STYTQL- WNWV PECLSCGSRC SSDQVETQAC TREQNRCTC RPYWYCALSK QEGCRLCAPL
RKCRPGFGVA RPYTET- SDVV CKPCAPGTFS NTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASRDAVC
60 TSTSPTRMA PGAVHLPQPV STR- SQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPP AEGSTGDFAL
PVGLIVGTA LGLLIIGVVN CVIMTVKVK PLCLQREAKV PHLPADKARG TQGPQQHLL ITAPSSSSSS
LESSASALDR RAPTRNQQA PGVEASGAGE AR- ASTGSSDS SPGGHGTQVN VTCIVNVCS
SDHSSQCSSQ ASSTMGDTDS SPSESPKDEQ VPFSKEECAP RSQLETPEL LGSTEEKPLP
LGVDPDAGMKP S
65 Disulfuro: 40-53; 54-67; 57-75; 78-93; 96-110; 100-118; 120-126; 134-143; 137-161; 164 179 (contando con
22 aa extras en el extremo N)

Función: receptor del TNF-alfa.

Eritropoyetina

Número de acceso: P01588

Secuencia: APP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITTGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV
WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTTLLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI
TADT- FRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDR

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

Fragmento de eritropoyetina:

Secuencia:

YASHFGPLGWVCK

Anillo de lantionina postraducciona: S3-C12

Fragmento 2 de eritropoyetina:

Secuencia:

YASHFGPLTWVCK

Anillo de lantionina postraducciona: S3-C12

Función: eritropoyesis.

Exendina-4

Número de acceso: P26349

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

Función: similar a secretina

Factor VIII

Número de acceso: P00451

Secuencia: A TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP PRVPKSFPPN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI
AK- PRPPWMGL LGPTIQAEVY DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR
EKEDDKVFP GSH- TYWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEG- KSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM HTVNGYVNRS
LPLGIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHT- FLVRNH RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH
ISSHQHDGME AYVKVDSCPE EPQLRMKNNE EAEDYD- DDLT DSEMDVVFRD DDNSPSFIQI
RSVAKKHPKT WWHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRI- GR KYKKVRFMAY
TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF
PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR YYSSFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGN-QIMSDKR
NVILFSVFDE NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL HEVAY- WYILS
IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTF PFSGETVFMS MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTAL-
LKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL SKNNAIEPRS FSQNSRHPST RQKQFNATTI PENDIEKTDP
WFAHRTMPK IQNVSSSDLL MLLRQSPTPH GLSLSDLQEA KYETFSDDP SGAIDSNNSL SEMTHFRPQL
HHSGDMVFTP ESGQLRLNE KLGTTAATEL KKLDFKVSST SNNLISTIPS DNLAAGTDNT SSLGPPSMPV
HYD- SQLD TLL FKGKSSPLTE SGGPLSLSEE NND SKLLES G LMNSQESSWG KNSSTESGR
LFGKRAHGP ALL- TKDNALF KVSISLLKTN KTSNNSATNR KTHIDGPSLL IENSPSVWQN ILESDETFKK
VTPLIHDRML MDKNATAL- RL NHMSNKTSS KNMEMVQKK EGPIPPDAQN PDMSFFKMLF
LPESARWIQR THGKNSLNSG QGPSP- KQLVS LGPEKSVGGQ NFLSEKNKV VVGKEFTKDV
GLKEMVFPSS RNLFLTNDN LHENNTHNQE KKIQEE- IEKK ETLIQENVVL PQIHTVTGTK NFMKNLFLS
TRQNVESYD GAYAPVLQDF RSLNDSTNRT KKHTAHFSKK GEEENLEGLG NQTKQIVEKY ACTTRISPNT
SQQNFVTQRS KRALKQFRLP LEETELEKRI IVDDTSTQWS KNM- KHLTPST LTQIDYNEKE KGAITQSPLS
DCLTRSHSIP QANRSLPIA KVSSFPSIRP IYLRVLFQD NSSHLPAASY RKKDSGVQES SHFLQGAKKN
NLSLAILTLE MTGDQREVGS LGTSATNSVT YKVENTVLP KPDLPKTSK VELLPKVHIY QKDLFPTETS
NGSPGHLDLV EGSLQGTG AIKWNEANRP GKVPFLRVAT ESSAKTPSKL LD- PLAWDNHY
GTQIPKEEWK SKEKSPEKTA FKKKDTILSL NACESNHAIA AINEGQNKPE IEVTWAKQGR TERLC- SQNPP
VLKRHQREIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIY EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERL- WDYGM
SSSPHVLNR AQSGSVPQFK KVVFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRN-
QASR PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD CKAWAYFSDV
DLEKD- VHSGL IGPLLVC HTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT IFDETKSWYF TENMERNCA PCNIQMEDPT
FKENYRF- HAI NGYIMDTLPG LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
VFETVEMPLS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVYSNKC QTPLGMASGH IRDFQITASG QYGQWAPKLA
RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG
TLMVFFGNVD SS- GIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME SKAISDAQIT
ASSYFTNMFA TWSP- SKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL
LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM
EVLGCEAQL Y

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

Función: coagulación.

Factor IX

Número de acceso: P00740 Secuencia:

Cadena ligera: NSG KLEEFVQGNL ERECMECKS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCKNIKNGR CEQFCKNSAD NKVVCSCTEG

YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSQTSLT R

Cadena pesada: AEAFFPDVD YVNSTEAETI LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITVVAG EHNIEETEHT EQKRNVRIRI PHHNYNAAIN KYNHDIALLE
LDEPLV- LNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI
YNNMFCAGFH EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMK GK YGIYTKVSRY

VNWIKEKTKL T

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

Función: coagulación.

Factor X

Número de acceso: P00742

Secuencia:

Cadena ligera: ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGQDC
ETSPCQNGGK CK- DGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCs LDNGDCDQFC HEEQNSVVCs
CARGYTLADN GKACIPTGPY PCG- KQTLER

Cadena pesada: R KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFDLLDF NQTQPERGDN
NLTRIVGGQE CK- DGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ AKRFKVRVGD
RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HN- RFTKETVD FDIIVLRKLT PITFRMNVP ACLPERDWAE STLMTQKTGI
VSGFGRTHEK GRQSTRKML EVPN- VDRNSC KLSSSFIITQ NMFCAGYDTK QEDACQGD SG
GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

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

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

Factor XIII

Número de acceso: P00488

Secuencia: VN LQEFLNVT SV HLFKERWDTN KVDHHTDKYE NNKLIVRRGQ SFYVQIDFSR PYDPRRD LFR
VE-YVIGRYPQ ENKGTYIPVP IVSELQSGKW GAKIVMREDR SVRLSIQSSP KCIVGKFRMY VAVWTPYGV L
RTSRN- PETDT YILFNPWCED DAVYLDNEKE REEYVLNDIG VIFYGEVNDI KTRSWSYGQF EDGILDTC L Y
VMDRAQM- DLS GRGNPIKVS R VGSAMVNAK DEGVLVGSWD NIYAYGVPPS AWTGKSV DILL
EYRSENPNVR YGQCWVF- AGV FNTFLRCLGI PARIVTNYFS AHDNDANLQM DIFLEEDGNV
NSKLT KD SVW NYHCWNEAWM TRP- DLPVGFG GWQAVDSTPQ ENSDGM YRCG PASVQAIKHG
HVC FQDAPF VFAEVNSDLI YITAKKDGT H VVEN- VDATHI GKLIVTKQIG GDGMMDITDT YKFQEGQEEE
RLALETALMY GAKKPLNTEG VMKSR SNVDM DFEVE- NAVLG KDFKLSITFR NNSHNRYTIT AYLSANITFY
TGVPKAEFFK ETFDVTLEPL SFKKEAVLIQ AGEYMGQ LLE QASLHFFVTA RINETRDVLA KQKSTVL TIP
EIIKVRGTQ VVGSDMTVT V QFTNPLKETL RNVVWHL DGP GVTRP- MKKMF REIRPNSTVQ
WEEVCRPWVS GHRKLIASMS SDSLRHVYGE LDVQIQRRPS M

Función: coagulación, estabiliza indirectamente cadenas de fibrina.

Fibronectina

Número de acceso: P02751

Secuencia: QAAQMVQPQ SPVAVSQSKP GCYDNGKH YQ INQQWERTYL GNALVCTCYG GSRGFNCESK
PE- AEETCFDK YTGNTYRVGD TYERPKDSMI WDCTCIGAGR GRISCTIANR CHEGGQSYKI
GDTWRRPHET GGYM- LECVCL GNGKGEWTC PIAEKCFDHA AGTSYVGET WEKPYQG WMM
VDCTCLGEGS GRITCTSRNR CNDQDTRTSY RIGDTWSK KD NRGNLLQCIC TGNGRGEWKC
ERHTSVQTTS SGSGPFTDVR AAVYQPQPHP QPPPYGHCVT DSGVVYSVGM QWLKTQGNKQ
MLCTCLGNGV SCQETAVTQT YGGNSNGEPC VLPFTYNGRT FYSCCTTEGRQ DGHLCWSTTS
NYEQDQKYSF CTDHTVLVQT QGGNSNGALC HFPFLYNNHN YTDCTSEGRR DN MKWCGTTQ
NYDADQKFGF CPMAAHEEIC TTNEGVMYRI GDQWDKQHDM GHMMRCTCVG NGRGEWT- CIA
YSQLRDQCIV DDITYNVNDT FHKRHEEGHM LNCTCFGQGR GRWKCDPVDQ CQDSETGT FY QIGD-
SWEKYV HGVRYQCYCY GRGIGEWHCQ PLQTPSSSG PVEVFITETP SQPNSHPIQW NAPQPSHISK
YILR- WRPKNS VGRWKEATIP GHLNSYTIKG LKPGVYEGQ LISIQYGHQ EVTRVDFTTT STSTPVSNT
VTGET- TPFSP LVATSESVTE ITASSFVSW VSASDTVSGF RVEYELSEEG DEPQYLDLPS TATSVNIPDL
LPGRKYIVNV YQISEDGEQS LILSTSQT TA PDAPPDPTVD QVDDTSIVVR WSRPQAPITG YRIVYSPSVE
GSSTELNLP E TANS- VTLSDL QPGVQYNITI YAVEENQUEST PVIQQUETT TPRS DTVPSR RDLQFVEVTD
VKVTIMWTPP ESAVT- GYRVD VIPVNLPGEH GQRLPISRNT FAEVTGLSPG VTYFVKVFAV SHGRESKPLT
AQQTTKLDAP TN- LQFVNETD STVLVRWTPP RAQITGYRLT VGLTRRGQPR QYNVGPSVSK
YPLRNLQPAS EYTVSLVAIK GN- QESPKATG VFTTLQPGSS IPPYNTTEVT TTVITWTPA PRIGFKLGVR
PSQGGEAPRE VTS DSGSIVV SGLT- PGVEY YTIQVLRDQG ERDAPIVNKV VTPLSPTNL HLEANPDTGV
LTVSWERSTT PDITGQYRITT TPTNGQGNS LEEVHADQS SCTFDNLSPG LEYNVSVYTV KDDKESVPIS
DTIIPAVPPP TDLRFTNIGP DTM- RVTWAPP PSIDL TNFLV RYSPVKNEED VAELSISPSD NAVVLTNLLP

GTEYVVS/SVSS VYEQHESTPL RGRQKT- GLDS PTGIDFSDIT ANSFTVHWIA PRATITGYRI RHHPEHFSGR
 PREDRVPHSR NSITLTNLTP GTEYVVSIVA LNGREESPLL IGQQSTVSDV PRDLEVVAAT PTSLLISWDA
 PAVTVRYRYRI TYGETGGNSP VQEFTVPGSK STA- TISGLKP GVDYTITVYA VTGRGDSPAS SKPISINYRT
 EIDKPSQMQV TDVQDNSISV KWLPSSSPVT GYRVTT- TPKN GPGPTKTKTA GPDQTEMTIE
 5 GLQPTVEYVV SVY AQNPSPGE SQPLVQTAVT NIDRPKGLAF TDVDVDSIKI AWESPQQQVS RYRVTYSSPE
 DGIHELFPAP DGEEDTAELQ GLRPGSEYTV SVVALHDDME SQPLIGTQST AI- PAPTDLKF TQVTPTSLSA
 QWTPPNVQLT GYRVVTPKE KTGPMEINL APDSSSVVVS GLMVATKYEV SVY- ALKDTLT
 SRPAQGVVTT LENVSPPRRA RVTDATETTI TISWRTKTET ITGFQVDAVP ANGQTPIQRTIKPDVRSY- TI
 10 TGLQPGTDYK IYLYTLNDNA RSSPVVIDAS TAIDAPSNLR FLATTPNSLL VSWQPPRARI TGYIIKYEKP
 GSP- PREVVR PRPGVTEATI TGLEPGTEYT IYVIALKNNQ KSEPLIGRKK TDELPQLVTL PHPNLHGPEI
 LDVP- STVQKT PFVTHPGYDT GNGIQLPGTS GQQPSVGQQM IFEEHGFRRT TPPTTATPIR
 HRPRPYPPNV GEEI- QIGHIP REDVDYHLYP HGPGLNPNAS TGQEALSQTT ISWAPFQDTS EYIISCHPVG
 TDEEPLQFRV PGTSTS- ATLT GLTRGATYNI IVEALKDQQR HKVREEVVTV GNSVNEGLNQ
 15 PTDDSCFDPY TVSHYAVGDE WERMSES- GFK LLCQCLGFGS GHFRCDSSRW CHDNGVNYKI
 GEKWDRQGEN QQMMSCCTLG NGKGEFKCDP HEATCY- DDGK TYHVGEQWQK EYLGAICT
 CFGGQRGWRC DNCRRPGGEP SPEGTTGQSY NQYSQRYHQR TNTNVNCPIC FMPLDVQAD REDSRE
 Disulfuro: 52-78; 76-87; 97-125; 123-135; 141-169; 167-179; 186-215; 213-225; 231-260; 258-270; 308-335;
 333-342; 360-386; 374-401; 420-446; 434-461; 470-498; 496-508; 518 545; 543-555; 561-589; 587-599;
 2206-2235; 2233-2245; 2251-2278; 2276-2288; 2295-2319; 2317-2333; 2367-2367; 2371-2371
 20 INTERCADENA (CON 2367 DE OTRA CADENA). (contado con 31 aa extras en el extremo N)
 Función: cicatrización de heridas, forma celular.

Fibrinógeno

Número de acceso: P02671

25 Secuencia: GPRVV ERHQSACKDS DWPFCSDEDW NYKCPSGCRM KGLIDEVNQD FTNRINKLKN
 SLFEYQKNNK DSHSLTTNIM EILRGDFSSA NNRDNTYNRV SEDLRSRIEV LKRKVIKQVQ HIQLLQKNVR
 AQLVDMKRLE VDIKIRSC RGSCSRALAR EVDLKDIEDQ QKQLEQVIAK DLLPSRDRQH LPLIKMKPVP
 DLVPGNFKSQ LQKVPPEWKA LTDMPQMRME LERPGNEIT RGGSTSYGTG SETESPRNPS
 30 SAGSWNSGSS GPGSTGNRNP GSSGTGGTAT WKPSSSGPGS TGSWNSGSSG TGSTGNQNP
 SPRPGSTGTW NPGSSERG-SA GHWTSESSVS GSTGQWHSES GSFRPDSPGS GNARPNPDW
 GTFEEVSGNV SPGTRREYHT EKLVT- SKGDK ELRTGKEKVTSGSTTTTTRS CSKTVTKTVI GPDGHKEVTK
 EVVTSEDGSD CPEAMDLGTL SGIGTLDG- FR HRHPDEAAFF DASTGKTFP GFFSPMLGEF
 VSETESRGSE SGIFTNTKES SSHHPGIAEF PSRGKSSSYS KQFTSSTSYN RGDSTFESKS YKMADEAGSE
 ADHEGTHSTK RGHAHSRPVR DCDDVLQTHP SGTQSGIFNI KLPGSSKIFS VYCDQETSLG GWLLIQQRMD
 35 GSLNFRNTWQ DYKRFGSLN DEGEFEGWLG NDYLHLLTQR GSVLRVELED WAGNEAYAEY
 HFRVGS EAGY YALQVSSYEG TAGDALIEGS VEEGAETSH NNMQFSTFDR DADQWENCA
 EVYGGGWWYN NCQAANLNGI YYPGGSYDPR NNSPYEIEG VVVVSFRGAD YSLRAVRMKI RPLVTQ
 Disulfuro: 47-47 INTERCADENA (CON C-47'); 55-55 INTERCADENA (CON C-95 EN BETA); 64 -64
 INTERCADENA (CON C-49 EN GAMMA); 68-68 INTERCADENA (CON C-106 EN BETA); 180 -180
 40 INTERCADENA (CON C-165 EN GAMMA); 184-184 INTERCADENA (CON C-223 EN BETA); 461-491
 Función: información de fibrina, agregación plaquetaria.

Filgrastim

Número de acceso: P09919

45 Secuencia: TPLGPASSLP QSFLKCLEQ VRKIQGDGAA LQEKLVSECA TYKLCHPEEL VLLGHSLGIP
 WAPLSS- CPSQ ALQLAGCLSQ LHSGLFLYQG LLQALEGISP ELGPTLDTLQ LDVADFATTI
 WQQMEELGMA PALQPTQ- GAM PAFASAFQRR AGGVLVASHL QSFLEVSYRV LRHLAQ
 Disulfuro: 69-75; 97-107 (contado con 30 aa en el extremo N)
 Función: estimulación de granulocitos.

Alfa folitropina

Número de acceso: P37036

55 Secuencia: FPBGZFTMZG CPZCKLKZBK YFSKLGAPIY ZCMGCCFSRA YPTPARSKKT MLVPKNITSZ
 ATCC- VAKAFT KATVMGBARV ZNHTZCHCST CYYHKS
 Disulfuro: 11-35; 14-64; 32-86; 36-88; 63-91
 Función: estimulación de folículos.

Beta folitropina

Número de acceso: P01225

60 Secuencia: S CELTNITIAI EKEECRFICIS INTTWCAGYC YTRDLVYKDP ARPKIQTCT FKELVYETVR
 VPGCAH-
 HADS LYTPPVATQC HCGKCDSDST DCTVRGLGPS YCSFGEMKE
 Disulfuro: 21-69; 35-84; 38-122; 46-100; 50-102; 105-112 (contado con 18 aa en el extremo N)
 Función: estimulación de folículos.

65 Hormona liberadora de la hormona de crecimiento

Número de acceso: P48144
 Secuencia: HADGLLDR ALRDILVQLS ARKYLHSLTA VRVGEEDDE EDSEPLS
 Función: liberación de la hormona de crecimiento.

- 5 Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
 Número de acceso: P48144
 Secuencia: H SDGIFTDSYS RYRKQMAVKK YLA AVLGRRY RQRFRN (amidación del último resto)
 Función: véase el nombre.
- 10 Hialuronidasa
 Número de acceso: P38567
 Secuencia: LNFRA PPVIPNPFL WAWNAPSEFC LGKFDEPLDM SLFSFIGSPR INATGQGVTI
 FYVDRGLGYYP YIDSITGVTV NGGIPQKISL QDHLDKAKKD ITFYMPVDNL GMAVIDWEEW RPTWARNWKP
 KD VYKNRSIE LVQQQNVQLS LTEATEKAKQ EFEKAGKDFL VETIKLGKLL RPNHLWGYYL FPD CYNHHYK
 15 KPGYNGSCFN VEIKRNDLS WLWNESTALY PSYLN TQQS PVAATLYVRN RVREAIRVSK IPDAKSPLPV
 FAYTRIVFTD QVLK- FLSQDE LVYTFGETVALGASGIVIWG TLSIMRSMKS CLLLDNYMETILNPYIINVT
 LAAKMCSQVL CQEQQVCIRK NWNSSDYLHL NPDNFAIQLE KGGKFTVRGK PTLEDLEQFS EKFCYSCYST
 LSCKEKADVK DTD AVDVC IADGV- CIDAFLK PPMETEEPQI FYNASPSTLS ATMFIVSILF LIISSVASL
 Función: glucosil hidrolasa.
- 20 Hirudina II
 Número de acceso: P28504
 Secuencia: ITYTDCTESG QDLCLCEGSN VCGKGNKCIL GSNGEENQCV TEGGTPKPQS HNDGDFEEIP
 EEYLQ Disulfuro: 6-14; 16-28; 22-39
- 25 Función: inhibidor de trombina.
- Imiglucerasa
 Número de acceso: P04062
 Secuencia: A RPCIPKSFY SSVVCVCNAT YCDSFDPPTF PALGTFSRYE STRSGRRMEL SMGPIQANHT
 30 GT- GLLLTLP EQKFQKVKG GGAMTDAAAL NILALSPPAQ NLLLSYFSE EGIGYNIIRV PMASCDFSIR
 TYTY-ADTPDD FQLHNFSLPE EDTLKIPLI HRALQLAQRV VLLASPWTS PTWLKTNGAV NGKGS LKGQP
 GDIYHQT- WAR YFVKFLDAYAEHKLQFWAVT
 AENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDRDIARDLGPTLANSTHHNVRLML DDQRLLLPHW AKVLTDP EA
 AKYVHGI AVH WYLD FLAPAK ATLGETHRLF PNTMLFASEA CVGSKFWEQS VRLGSWDRGM QYSHSIITNL
 35 LYHVVGWTDW NLALNPEGGP NWVRNFVDSP IVDITKDTF YKQPMFYHLG HF- SKFIPEG S
 QRVGLVASQK NDLDAVALMH PDGSAVVVVL NRSSKDVPLT IKDPAVG FLE TISPGYSIHT YLWHRQ
 Función: Glucohidrolasa.
- Interleuquina 2
 Número de acceso: P01585
 Secuencia: APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELK-
 PLEEV L NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT
 Disulfuro: 78-125 (contado con 20 aa de señal en el extremo N)
 Función: factor de crecimiento.
- 45 Interferón alfa-4
 Número de acceso: P01562
 Secuencia: CDLPETH SLDNRRTLML LAQMSRISPS SCLMDRHDFG FPQEEFDGNQ FQKAP AISVL
 HELIQIFNL FTTKDSSAAW DEDLLDKFCT ELYQQ LNDLE ACVMQEERVG ETPLMNADSI LAVKKYFRRI
 50 TLYLTEKKYS PCAWEVVR AE IMRSLSLSTN LQERLRRKE
 Disulfuro: 24-122; 52-162 (contado con 23 aa en el extremo N)
 Función: Antiviral, el interferón estimula la producción de dos enzimas, una proteína quinasa y una
 oligoadenilato sintetasa.
- 55 Interferón-beta
 Número de acceso: P01575
 Secuencia: INYKQLQLQ ERTNIRKCQE LLEQLNGKIN LTYRADFKIP MEMTEKMQKS YTAFAIQEML
 QNVFLV- FRNN FSSTGWN ETI VVRLLD ELHQ QTVFLKTVLE EKQEERLTWE MSSTALHLKS
 YYWRVQRYLK LMKYN- SYAWM VVRAEIFRNF LIIRRLTRNF QN
 60 Función: antiviral, antibacteriana y anticancerosa.
 Factor intrínseco
 Número de acceso: P27352
 Secuencia: ST QTQSSCSVPS AQEPLVNGIQ VLMENSVTSS AYPNPSILIA MNLAGAYNLK AQKLLTYQLM
 SSDN- NDLTIG HLGLTIMALT SSCRDPGDKV SILQRQ MENW APSSPNAEAS AFYGPSLAIL ALCQKNSEAT
 65 LPIAVR- FAKT LLANSSPFNV DTGAMATLAL TCMYNKIPVG SEEGYRSLFG QVLKDIVEKI SMKIKDNGII
 GDIYSTGLAM QALSVTPEPS KKEWNCKKTT DMILNEIKQG KFHNPMSIAQ ILPSLKGKTY LDVPQVTCSP

DHEVQPTLPS NPG- PGPTSAS NITVIYTINN QLRGVELLFN ETINVSVKSG SVLLVVLEEA QRKNPMFKFE
TTMTSWGLVV SSINNI- AENV NHKTYWQFLS GVTPLNEGVA DYIPFNHEHI TANFTQY

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

Función: endocitosis de cobalamina

5

Invertasa

Número de acceso: Q60115

Secuencia: MFNFNASRWT RAQAMKVNF DLTTSMPEIG TDFPINIRDDL WLWDTWPLRD INGNPVSKG
WNV- IFSLVAD RNIPWNRHS HARIGYFYSK DGKSWVYGGH LLQESANTRT AEWSGGTIMA
PGSRNQVETF FT- STLFDKNG VREAAAVTK GRIYADSEGV WFKGFDQSTD LFQADGLFYQ
NYAENNLWNF RDPHFVINPE DG- ETYALFEA NVATVRGEDD IGEDEIGPVP ANTVVPKDAN LCSASIGIAR
CLSPDRTEWE LLPPLLTAFG VNDQMERPHV IFQNGLTLYL TISHDSTYAD GLTGSDGLYG FVSENGIFGP
YEPLNGSGLV LGGPASQPTE AYAHYIMNNG LVESFINEII DPKSGKVIAG GSLAPTVRVE LQGHETFATE
VFDYGYIPAS YAWPVWPFDP RRK

10

Función: sacarasa.

15

Lepirudina

Número de acceso: P01050

Secuencia: VVYTDCTESG QNLCLCEGSN VCGQGKNCIL GSDGEKNQCV TEGGTPKPQS HNDGDFEEIP
EEYLQ

20

Disulfuros: 6-14; 16-28

Función: inhibidor de trombina.

Beta lutropina

Número de acceso: P01229

Secuencia: SREPLRPWCH PINAILAVEK EGCPVCITVN TTICAGYCPT MMRVLQAVLP PLPQVVCTYR
DVRFE- SIRLP GCPRGVDPV SFPVALSCRC GPCRSTSDC GGPKDHPLTC DHPQLSGLLF L

25

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

Función: estimula la síntesis de esteroides.

30

Lisozima

Número de acceso: P21270

Secuencia: MDPRLREEVV RLIIALTSDN GASLSKRLQS RVSALEKTSQ IHSDTILRIT QGLDDANKRI
IAEQSRD-DL VASVSDAQLA ISRLESSIGA LQTVVNGLDS SVTQLGARVG QLETGLADV RVDHNLVARV
DTAERNIGSL TTELSTLT LR VTSIQADFES RISTLERTAV TSAGAPLSIR NNRITMGLND GLTSGNNLA
IRLPGNTGLN IQNG- GLQFRF NTDQFQIVNN NLTKTTVFD SINRIGATE QSYVASAVTP LRLNSSTKVL
DMLIDMSTLE INSSGQLTVR STSPNLRYP ADVSGGIGMS PNYRFR

35

Función: hidrólisis de peptidoglucano.

Inhibidor de metaloproteinasa

Número de acceso: P16035

Secuencia: CSCS PVHPQQAFCN ADVVIRAKAV SEKEVDSGND IYGNPIKRIQ YEIKQIKMFK GPEKDIEFIY
TAPSSAVCGV SLDVGGKKEY LIAGKAEGDG KMHITLCDFI VPWDTLSTTQ KKS LNHR YQM GCECKITRCP
MI- PCYISSPD ECLWMDWVTE KNINGHQAKF FACIKRSDGS CAWYRGAAPP KQEF LDIEDP

40

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

Función: inactivación de proteasa.

45

Neurofisina

Número de acceso: P01185

Secuencia: AMSDLELRQ CLPCGPGGKG RCFGPSICCA DELGCFVGTA EALRCQEENY LPSPCQSGQK
ACGS-
GGRCAA FGVCCNDESC VTEPECREGE HRRA

50

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

Función: la neurofisina se une a la vasopresina.

55

Papaína

Número de acceso: P00784

Secuencia: VY MGLSFGDFSI VGYSQNDLTS TERLIQLFES WMLKHNIYK NIDEKIYRFE IFKDNLYID
ETNKKNNYSW LGLNVFADMS NDEFKEKYTG SIAGNYTTTE LSYEEVLNDG DVNIPEYVDW
RQKGAVTPVK NQGSCGSCWA FSAVVTIEGI IKIRTGNLNE YSEQELLD CD RRSYGCNGGY PWSALQLVAQ
YGIHYRNTYP YEGVQRYCRS REKGYPAAKT DGVRQVQPYN EGALLYSIAN QPVSVVLEAA
GKDFQLYRGG IFVGPCGNKV DHAAVAVGYG PNYILIKNSW GTGWGENGYI RIKRGTGNSY GVCGLYTSSF
YPVKN

60

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

Función: Proteinasa.

65

Pepsina

Número de acceso: P00790

Secuencia: VDEQPLEN YLDMFYFGTI GIGTPAQDFT VVFDTGSSNL WVPSVYCSSL ACTNHNRFNP
 EDSSTYQSTS ETVSITYGTG SMTGILGYDT VQVGGISDTN QIFGLSETEP GSFLYYAPFD GILGLAYPSI
 SSS- GATPVFD NIWNQGLVSQ DLFSVYLSAD DQSGSVVIFG GIDSSYYTGS LNWVPVTVEG YWQITVDSIT
 MNGEAI- ACAE GCQAIVDTGT SLLTGPTSPI ANIQSDIGAS ENSDGDMMVVS CSAISSLPDI VFTINGVQYP
 VPPSAYILQS EGSCISGFQG MNLPTESGEL WILGDVFIRQ YFTVFDRANN QVGLAPVA

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

Función: Peptidasa.

Plasminógeno

Número de acceso: P00747

Secuencia: E PLDDYVNTQG ASLFSVTKKQ LGAGSIEECA AKCEEDEEFT CRAFQYHSKE QQCHEMAENR
 KSSI- IIRMRD VVLFEEKVYL SECKTGNGKN YRGTMSTKN GITCQKWSST SPHRPRFSPA THPSEGLEEN
 YCRNP- DNDPQ GPWCYTTPD KRYDYCDILE CEEECMHCSG ENYDGKISK MSGLECAWD
 SQSPHAHGYI PSKF- PNKNLK KNYCRNPDR LRPWCFTTDP NKRWELCDIP RCTTPPPSSG
 PTYQCLKGTG ENYRGNVAVT VSGHT- CQHWS AQTPHTNRT PENFPCKNLD ENYCRNPDGK
 RAPWCHTTNS QVRWEYCKIP SCDSSPVSTE QLAPTAPPEL TPVVQDCYHG DGQSYRGTS
 TTTTGKKCQS WSSMTPHRHQ KTPENYPNAG LTMNYCRNP ADKGPWCFTT DPSVRWEYCN
 LKKSCTEAS VVAPPPVLL PDVETPSEED CMFGNGKGYR GKRAVTVTG PCQDWAAQEP
 HRHSFTPET NPRAGLEKNY CRNPDGVDG PWCYTTPRK LYDYCDVPC AAPSFCGK
 QVEPKKCPGR VVGCVAPHP SWPWQVSLRT RFGMHFCGGT LISPEWVLT AHCLKSPRP
 SSKYVILGAH QEVNLEPHVQ EIEVSRLFLE PTRKDIALK LSSPAVITDK VIPACLPSPN YVADRTECF
 ITGWGETQGT FGAGLLKEAQ LPVIENKVCN RYEFNGRVQ STELCAGHLA GGTDCQGDG
 GGPLVCFEKD KYILQGVTSW GLGCARPKNP GYVVRVSFV TWIEGVMRNN

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

Función: proteasa.

Protamina

Número de acceso: P04554

Secuencia: MVRVRSLS ERSHEVYRQQ LHGQEQGHHG QEEQGLSPEH VEVYERTHGQ SHYRRRHCSR
 RRLHRIHRR HRSCRRRKRR SCRHHRRHR GCRTKRKTCR RH

Función: sustitución de histona.

Protrombina

Número de acceso: P12259

Secuencia: AQ LRQFYVAAQG ISWSYRPEPT NSSLNLSVTS FKKIVYREYE PYFKKEKPQS TISGLLGPTL
 YAE- VGDIKV HFKNKADKPL SIHPQGIRYS KLSEGASYLD HTFPAEKMD AVAPGREYTY EWSISEDGSP
 THDDPP- CLTH IYSHENLIE DFNSGLIGPL LICKKGTLE GGTQKTFDKQ IVLLFAVFDE SKSWSQSSSL
 MYTVNGYVNG TMPDITVCAH DHISWHLLGM SSGPELFSIH FNGQVLEQNH HKVSAILTVS ATSTANMTV
 GPEGKWISS LTP- KHLQAGM QAYIDIKNCP KKTNRNLKIT REQRRHMKRW EYFIAEEVI WDIAPVIPAN
 MDKKYRSQHL DNFSN- QIGKH YKKVMYTQYE DESFTKHTVN PNMKEDGILG PIIRAQVRDT LKIVFKNMAS
 RPYSIYPHGV TFSPYEDEVN SSFTSGRNNT MIRAVQPGET YTYKWNILEF DEPTENDAQC LTRPYSDVD
 IMRDIAAGLI GLLICKSRS LDR- RGIQRAA DIEQQAFAV FDENKSWYLE DNINKFCENP DEVKRDDPKF
 YESNINISTIN GYVPESITTL GFCFD- DTVQW HFCSVGTQNE ILTIHFTGHS FIYGRHEDT LTLFPMRGES
 VVTMDNVGT WMLTSMNSSP RSKKL- LKFR DVKCIPODDE DSYEIFEPPE STVMATRKMH
 DRLEPEDEES DADYDYQNR LAAALGIRSFR NS- SLNQEEEE FNLTALALEN GTEFVSSNTD IIVGSNYSSP
 SNISKFTVNN LAEPQKAPSH QQATTAGSPL RHLIG- KNSVL NSSTAETHSSP YSEDPIEDPL QPDVTGIRLL
 SLGAGEFQSQ EHAHKHGPV ERDQAACHRF SWMKL- LAHKV GRHLSQDTGS PSGMRPWEDL
 PSQDTGSPSR MRPWKDPPSD LLLKQSNSS KILVGRWHLA SEKG- SYEIIQ DTDDETAVNN
 WLISPNASR AWGESTPLAN KPGKQSGHPK FPRVRHKS LQ VRQDGGKSRL KKSQF- LIKTR
 KKKKEKHHTH APLSPRTFHP LRSEAYNTFS ERRLKHSVL HKSNETSLPT DLNQTLPSMD FGWIASLP- DH
 NQNSSNDTGQ ASCPPGLYQT VPPEEHYQTF PIQDPDQMH S TSDPSHRSSS PELSEMLEYD
 RSHKSFPTDI SQMSPSEHE VWQTVISPD LSVTLSPELS QTNLSPDL SH TSLPELIQR NLSPALGQMP
 ISPDLSHTL SP- DLSHTTLL LDLSQTNLSP ELSQLNLSPA LGQMPLSPDL SHTTLLSDFS QTNLSPELS
 MTLSPELSQT NLSPALGQMP ISPDLSHTL SLDFSQTNLS PELSQTNLSP ALGQMPLSPD SHTTLLSLDL
 SQTNLSPELS QTNLSPDLSE MPLFADLSQI LTPDLQDMT LSPDLGETDL SPNFGQMSLS PDLSPDLSP
 DISDTLLLPD LSQISPPPD LQI- FYPSESS QSLLLQEFNE SFPYDPLGQM PSPSSPTLND TFLSKFENPL
 VIVGLSKDGT DYIEIPKEE VQSSD- DYAE IDYVPYDDPY KTDVVRTNINS SRDPDNIAAW YLRNNGNRR
 NYIAAEEIS WDYSEFVQRE TDIEDSDIP EDTTYKKVWF RYLDSTFTK RDPGRGEYEEH LGILGPIRA
 EVDDVIQVRF KNLASRPYSL HAHGLSYEKS SEG- KTYEDDS PEWFKEDNAV QPNSSYTYVW
 HATERSGPES PGSACRAWAY YSAVNPEKDI HSLIGPLLI CQKGL- HKDS NMPVDMREFV LFMFTFDEK
 SWYYEKKSR SWRLTSSEMK KSHFNHAI MIYSLPGLKM YEQEWVRLHL LNIGGSQDIH VVHFHGQTL
 ENGNKQHLG WPLLPGSFK TLEMKASKPG WWLLNTEVGE NQRAGMQTPF LIMDRDCRMP

MGLSTGIISD SSIKASEFLG YWEPRLARLN NGGSYNAWSV EKLAAEFASK PWIQVDMQKE VIITGIQTQG
AKHYLKSCYT TEFYVAYSSN QINWQIFKGN STRNVMYFNG NSDASTIKEN QFDP- PIVARY IRISPTRAYN
RPTLRLELQG CEVNGCSTPL GMENGKIENK QITASSFKKS WWGDYWEPFR ARLNAQ- GRVN
AWQAKANNK QWLEIDLLKI KKITAITQG CKSLSSEMYV KSYTIHYSEQ GVEWKPYRLK SSMVDKIFEG

5

NTNTKGHVKN FFPPIISRF IRVIPKTWNQ SITLRLELFG CDIY

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

Función: coagulación.

Protirelina

10

Número de acceso: P20396

Secuencia: QPEAAQ QEAVTAAEHP GLDDFLRQVE RLLFLRENIQ RLQGDQGEHS ASQIFQSDWL
SKRQHPG- KRE EEEEEGVEEE EEEEGGAVGP HKRQHPGRRE DEASWSVDVT QHKRQHPGRR
SPWLAYAVPK RQHP- GRRLAD PKAQRSEEEE EEEEEEDL MPEKRQHPGK RALGGPCGPQ
GAYGQAGLLL GLDDLSRSQ GAEEKRQHPG RRAAWVREPL EE

15

Función: liberación de tirotropina.

SC3

Número de acceso: P16933

Secuencia: GGHPGT TTPPVTTT VTTPPSTTTI AAGGTCTTGS LSCCNQVQSA SSSPVTTALLG
LLGIVLSDLN VLVGISCS- PL TVIGVGSGC SAQTVCCENT QFNGLINIGC TPINIL

20

Función: hidrofobia.

Sermorelina

Número de acceso: P01286

Secuencia: YADAITNS YRKVLGQLSA RKLLQDIMSR QQGESNQERG ARARL

25

Función: liberación de la hormona de crecimiento.

Estreptodornasa

Número de acceso: P26295

IPPYHH NTVLAKTVSV NQTYGEYKDY YTVIGESNID QSAFPKIYKT TERYKGGQT SEKRVTVSDV VYN-
PLDGYKR STGAYGVTK DMIDMSKGYR EKWETNPEPS GWFRFYNRAD NEEISEKEYD SRRTKSYKVT
NNVPVLTTL KGKKYNHSLF VASHLFADSL GGKSIRKNAI TGTQMNVGT RKGGMQYIEK KVLSHITKNP
DVY- VFYSAIP EYQGAELLAR SVLSALSSD GVINETVRVF NTADGFNIN Y EKGGLLTESP VSEIDNIEDS
TTDEIENS- VD DSEEIVYNDT TTEEEEN

30

Función: DNAsa.

35

Estreptoquinasa

Número de acceso: P00779

Secuencia: IAGP EWLLDRPSVN NSQLVSVAG TVEGTNQDIS LKFFEIDLTS RPAHGGKTEQ
GLSPKSKPFA TDGAMSHKL EKADLLKAIQ EQLIANVHSN DDYFEVIDFA SDATITDRNG KVFADKDGS
VTLPTQPVQE FLLSGHVRVR PYKEKPIQNG AKSVDEYTV QFTPLNPDD FRPGLKDTKL LKTLAIGDTI
TSQELLAQAQ SILNKNHPGY TIYERDSSIV THDNDFRTI LPMDQEFTYR VKNREQAYRI NKKSGLNIEE
NNTDLISEKY YV- LKKGEKPY DPFDRSHLKL FTIKYVDVDT NELLKSEQLL TASERNLDFR DLYDPRDKAK
LLYNNLDAFG IM- DYTTLGKV EDNHDDTNRI ITVYMGKRPE GENASYHLAY DKDRYTEEER EVYSYLYRTG
TPIPDNPND

40

Función: activación de plasminógeno.

45

Tiroglobulina

Número de acceso: P01266

Secuencia: N IFYQVDAQP LRPCELQRET AFLKQADYVP QCAEDGSFQT VQCQNDGRSC
WCVGANGSEV LG- SRQGRPV ACLSFCQLQK QQILLSGYIN STDTSYLPQC QDSGDYAPVQ
CDVQQVQCWC VDAEGMEVYG TRQLGRPKRC PRSCEIRNR LLHGVGDKSP PQCSAEGEFM
PVQCKFVNTT DMMIFDLVHS YNRPDAFVT FSSFQRRFPE VSGYCHCADS QGRELAETGL ELLLDEIYDT
IFAGLDLPST FTETTLRYIL QRRFLAVQSV IS- GRFRCPKT CEVERFTATS FGHPYVPSCR RRGDYQAVQC
QTEGPCWCVD AQGKEMHGTR QQGEPPSCAE GQSCASERQQ ALSRLYFGTS GYFSQHDLFS
SPEKRWASPR VARFATSCPP TIKELFVDSG LLRPMVEGQS QQFSVSENLL KEAIRAIFPS RGLARLALQF
TTNPKRLLQN LFGGKFLNVV GQFNLSGALG TRGTNFNSQF FQQLGLASFL NGGRQEDLAK
PLSVGLDSNS STGTPEAAK DGTMNKPTVG SFGFEINLQE NQNALKFLAS LLELPEFLF LQHAISVPED
VARDLGDVME TVLSSQTCEQ TPERLFVPSC TTEGSYEDVQ CFSGECWCVN SWGKELPGSR
VRGGQPRCPT DCEKQRARMQ SLMGSQPAGS TLFVPACTSE GHFLPVQCFN SECYCVDAEG
QAIPGTRSAI GKPKKCPTPC QLQSEQAFLR TVQALLSNSS MLPTLSDTYI PQCSTDGQWR QVQCNGPPEQ
VFELYQRWEA QNKGQDLTPA KLLVKIMSIR EASGNFSLF IQSLYEAGQQ DVFPVLSQYP SLQDVPLAAL
EG- KRPQPREN ILLEPYLFWQ ILNGQLSQYP GSYSDFTPL AHFDLRNCWC VDEAGQELEG
MRSEPSKLPT CPG- SCEEAKL RVLQFIRETE EIVSASNSSR FPLGESFLVA KGIRLRNEDL GLPLFPFPR
AFAEQFLRGS DYAIR- LAAQS TSLFYQRRF SPDDASAGASA LLRSGPYMPQ CDAFGSWEVP
QCHAGTGHWC CVDEKGGFIP GSLTARSLQI PQCPPTCEKS RTSGLLSSWK QARSQENPSP
KDLFVPACLE TGEYARLQAS GAGTWCVDPA SGEELRPGSS SSAQCPSLCN VLKSGVLSRR

55

60

65

VSPGYVPACR AEDGGFSPVQ CDQAQGSCWC VMDSGEEVPG TRVTGGQPAC ESPRCPLPFN
 ASEVVGGTIL CETISGPTGS AMQQCQLLCR QGSWSVFPPG PLICSLESGR WESQLPQPRA
 CQRPLWQTI QTQGHFQLQL PPGKMCSADY AGLLQTFQVF ILDELTARGF CQIQVKTFTG LVSIPVCNNS
 SVQVGCLTRE RLGVNVTWKS RLEDIPVASL PDLHDIERAL VGKDLLGRFT DLIQSGSFQL HLD- SKTFPAE
 5 TIRFLQGDHF GTSPRTWFGC SEGIFYQLTS EASQDGLGCV KCPEGSYSQD EECIPCPVGF
 YQEQAQSLAC VPCPVGRTTI SAGAFSQTHC VTDCQRNEAG LQCDQNGQYR ASQKDRGSGK
 AFCVDGEGRR LPWWETEAPL EDSQCLMMQK FEKVPESKVI FDANAPVAVR SKVPDSEFPV
 MQCLTDCTED EACSFFTVST TE- PEISCDFY AWTSDNVACM TSDQKRDALG NSKATSFGSL
 RCQVKVRSHG QDSPAVYLKK GQGSTTTTLQK RFEPTGFQNM LSGLYNPVIF SASGANLTDA HLFCLLACDR
 10 DLCCDGFVLT QVQGGAIICG LLSSPSVLLC NVK- DWMDPSE AWANATCPGV TYDQESHQVI
 LRLGDQEFIK SLTPLEGTQD TFTNFQQVYL WKDSMGSRP ESM- GCRKDTV PRPASPTAG
 LTTELFSPVD LNQVIVNGNQ SLSSQKHWLF KHLFSAQQAN LWCLSRCVQE HSFC- QLAEIT ESASLYFTCT
 LYPEAQVCDD IMESNAQGCR LILPQMPKAL FRKKVILEDK VKNFYTRLPF QKLMGISIRN KVPMSSEKIS
 NGWFECERRC DADPCTGFG FLNVSQLKGG EVTCLTLNSL GIQMCSEENG GAWRILDCGS PDIEVHTYPF
 15 GWYQKPIAQN NAPSFCPLVV LPSLTEKVSL DSWQSLALSS VVVDPSIRHF DVAHVSTAAT SNF- SAVRDLC
 LSECSQHEAC LITTLQTQPG AVRCMFYADT QSCTHSLQGG NCRLLLREEA THYIRKPGIS LLS- YEASVPS
 VPISTHGRLL GRSQAIQVGT SWKQVDQFLG VPYAAPPLAE RRFQAPEPLN WTGSDWASKP RAS-
 CWQPGTR TSTSPGVSED CLYLNVPFQ NVAPNASVLV FFHNTMDREE SEGWPAIDGS FLAAVGNLIV
 VTASYR- VGVF GFLSSGSGEV SGNWGLLDQV AALTWVQTHI RGFGGDPRRV SLAADRGAD
 20 VASIHLLTAR ATNSQL- FRRA VLMGGSALSP AAVISHERAQ QQAIALAKEV SCPMSSSQEV VSCLRQKPAN
 VLNDAAQTKLL AVSGPFHY- WG PVIDGHFLRE PPARALKRSL WVEVDLLIGS SQDDGLINRA KAVKQFEESR
 GRTSSKTAFY QALQNSLGGE DSDARVEAAA TWYYSLEHST DDYASFRL ENATRDYFII CPIIDMASAW
 AKRARGNVFM YHAPENYGHG SLELLADVQF ALGLPFYPAY EGQFSLEEK LSLKIMQYFS HFIRSGNPY
 PYEFSRKVPT FATPWPDPVP RAG- GENYKEF SELLPNRQGL KKADCSFWSK YISSLKTSAD
 25 GAKGGQSAES EEEELTAGSG LREDLLSLQE PGSK- TYSK

Función: precursor de la hormona tiroidea.

Uroquinasa.

Número de acceso: P00749

30 Secuencia:

MRALLARLLLLCVLVSDSKGSNELHQVPSNCDCLNGGTCVSNKYF FT SNIHWCNCPKKFGGQHCEIDKSKT-
 CYEGNGHFYRGKASTDTMGRPCLFWNS ATVLQQTFTYTHAHRSDALQLGLGKHNYCRPNDRRRPWCY-
 VQVGLKPLVQ ECMVHDCADGKKPSSPPEEFTLKFCGQKTLRPRFKIIGGEFTTIENQPWFAAI
 YRRHRGGSVTYVCGGSLISPCWVISAFTTHCFIDYPPKEDYIVYLGRSRLNSN
 35 TQGMKFEEVENLILHKDYSADTLAHHNDIALLKIFTRSKEGRCAQPSRTIQTIC
 LPSMYNDPQFGTSCEITGFGKENSTDYLYPEQLKMTVVKLIFTSHRECQPHY
 YGSEVTTKMLCAADPQWKTD- SCQGDSSGGLVCSLQGRMTLTGIVSWGRG FT
 CALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKENGLAL

Función: activación de plasminógeno.

40

Tabla 2, péptidos líder

Epicidina-280	MENKKDLFDLEIKKDNMENNNELEAQ
Pep-5	MKNKNLFDLEIKKETSQNTDELEPQ
Epilancina-K7	MNNSLFDLNLNKGVETQKSDLSPQ
Nisina-A/Z	MSTKDFNLDLVSVSKKDSGASPR
Subtilina	MSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQ
Epidermina	
	MEAVKEKNLFDLNDVKVNAKESNDSGAEPR
Galidermina	
	MEAVKEKNLFDLNDVKVNAKESNDSGAEPR
Mutacina-1140/III	
	MSNTQLLEVLGTETFDVQEDLFAFD
	TTDDTTIVASNDPD TR
Lacticina-481	MKEQNSFNLLQEVTESELDLILGA
Variacina	MTNAFQALDEVTDALDAILGG
Mutacina-II	MNKLNSNAVSLNEVSDSELDLILGG
Streptococina-A-FF22	MEKNNEVINISIQEVSELELDQIIIGA
Salivaricina-A	MNAMKNSKILNNAIEEVSEKELMEVAGG
Sublancina	MEKLFKEVKLEELNQKGS
Lactocina-S	

ES 2 444 840 T5

MKTEKKVLDELSTHASAKMGARDVESSMNAD
 Ruminococina A MRNDVLTLTNPMEKELEQILGG
 Butlrivibriocina OR79A MNKELNALTNPIDEKELEQILGG
 Estreptococina A-M49 MTKEHEIINSIQEVSLEELDQIIGA
 Bacteriocina J46 MKEQNSFNLLQEVTESLDLILGA
 Salivaricina A1
 MKNSKDILTNAATEEVSEKELMEVAGG
 Estreptina MNNTIKDFDLDLKTNKKTATPY
 Plantaricina-W alfa MKISKIEAQARKDFFKKIDTNSNLLNVNGA
 Lacticina-3147A1
 MNKNEIETQPVTWLEEVSDQNFDEDVFGA
 Estafilococina-C55 alfa
 MKSSFLEKDIEEQVTWFEEVSEQEFDDDDIFGA
 Plantaricina-W beta
 MTKTSRRKNAIANYLEPVDEKSINESFGAGDPEAR
 Lacticina-3147A2
 MKEKNMKNNDTIELQLGKYLEDDMIELAEGDESHGG
 Estafilococina-C55 beta
 MKNELGKFLEENELELGKFSESMDLEITDDEVYAA
 Citolisina-LL
 MENLSVVPSFEELSVEEMIAIQGSGDVQAE
 Citolisina-LS
 MLNKENQENYYSNKLELVGPSFEE
 LSLEEMIAIQGSGDV QAE
 Cinnamicina
 MTASILQQSVVDADFRAALLENPAAFGASAAALPTPVEAQD
 QASLDFWTKD IAATEAFA
 Mersacidina
 MSQEAIIIRSWKDPFSRENSTQNPAGNPFSELIKEAQMDKLVGAG
 DNEAA

REIVINDICACIONES

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

15. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 donde dicha modificación comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o la formación de un puente tioéter.

16. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 donde dicha célula hospedadora es una célula procariota Gram-negativa o una célula eucariota.

17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16 donde dicho polipéptido que no ha sufrido modificación postraducciona intracelular comprende la deshidratación de una serina o una treonina y/o la formación de un puente tioéter.

18. Un método para la producción de un polipéptido de origen no lantibiótico que comprende deshidroalaninas y/o restos de ácido deshidrobutírico que comprende:

a) seleccionar una célula hospedadora que tenga una molécula de ácido nucleico que comprenda un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que estén en la misma fase de lectura abierta, donde

- el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que pueda producirse la formación de un puente tioéter;

- el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13; y donde el polipéptido es de origen esencialmente eucariótico o viral;

- y una molécula de ácido nucleico que codifica LanB o la parte N-terminal de LanM y una molécula de ácido nucleico que codifica LanT;

b) permitir la traducción de dichas moléculas de ácido nucleico; y

c) recoger dicho polipéptido deseado desde un medio de la célula huésped.

19. Una célula hospedadora que comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un primer y un segundo fragmento de ácido nucleico que están en la misma fase de lectura abierta, donde

- el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que puede producirse la formación de un puente tioéter;

- el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido donde n es 1-13; y donde el polipéptido es de origen esencialmente eucariótico o viral, y donde la célula huésped fue seleccionada para detectar la presencia de la proteína transportadora LanT.

20. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 19 donde dicho (poli)péptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249.

21. Una célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 donde dicho péptido líder se selecciona del grupo que consiste en péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280.

22. Una célula hospedadora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, siendo dicha célula hospedadora una célula procariota Gram-negativa o una célula eucariota.

23. Una célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22 provista de una proteína LanT y no provista de una proteína LanB.

24. Una célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 provista de una proteína LanT y no provista de una proteína LanC.

25. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 24 provista con una LanB.

26. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 22 provista con una proteína LanT, LanB, LanC y/o LanM.

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

- el primer fragmento de ácido nucleico codifica un péptido líder de lantibiótico que es funcionalmente equivalente a un péptido líder N-terminal encontrado en un prepéptido de un lantibiótico y donde este péptido líder actúa como una secuencia señal de translocación y una señal de reconocimiento, de tal manera que puede producirse la formación de un puente tioéter;
- 5 - el segundo fragmento de ácido nucleico codifica un polipéptido deseado que comprende una secuencia a modificar en un puente tioéter, seleccionándose la secuencia del grupo de secuencias que consiste en Ser-Xaa_n-Cys y Thr-Xaa_n-Cys, donde Xaa es cualquier aminoácido y donde n es 1-13;
- en el que dicho polipéptido es de origen eucariota o viral.
- 10 28. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27 donde dicho (poli)péptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos con SEC ID N°: 1 a 249.
- 29. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, donde dicho péptido líder se selecciona del grupo que consiste en péptidos líder con SEC ID N°: 250 a 280.
- 15

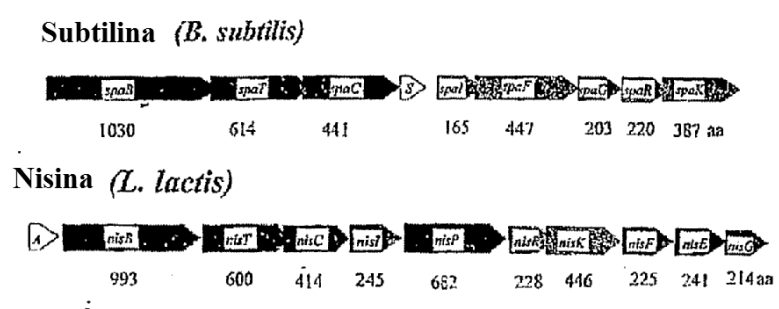


Figura 2

Biosíntesis de Nisina

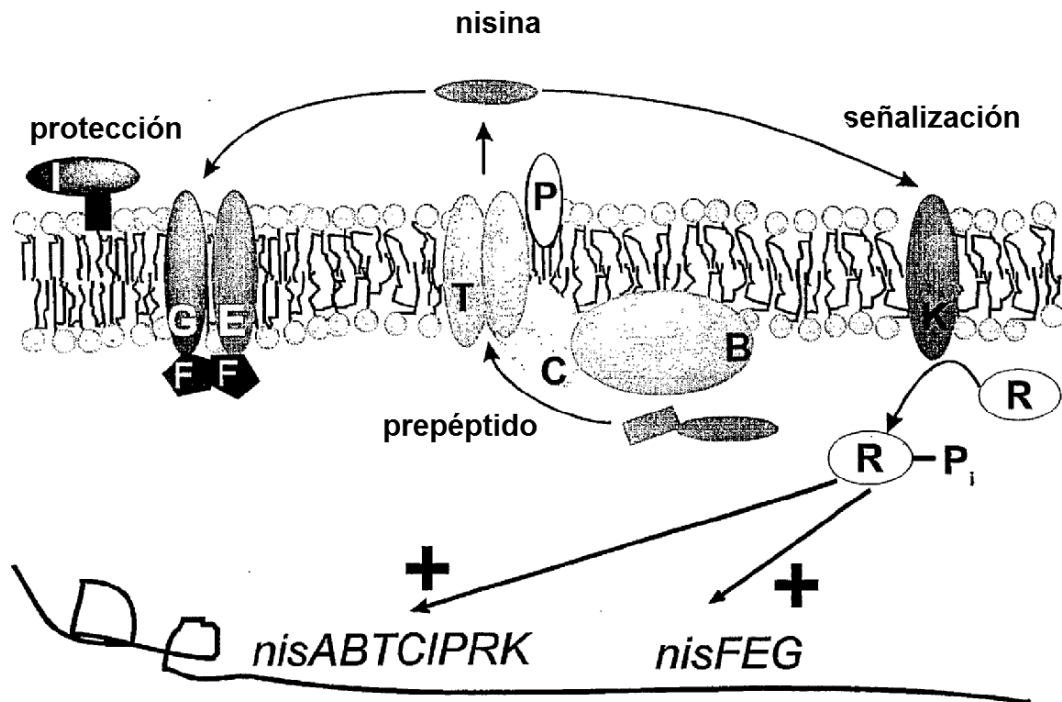


Figura 3

Biosíntesis de Nisina

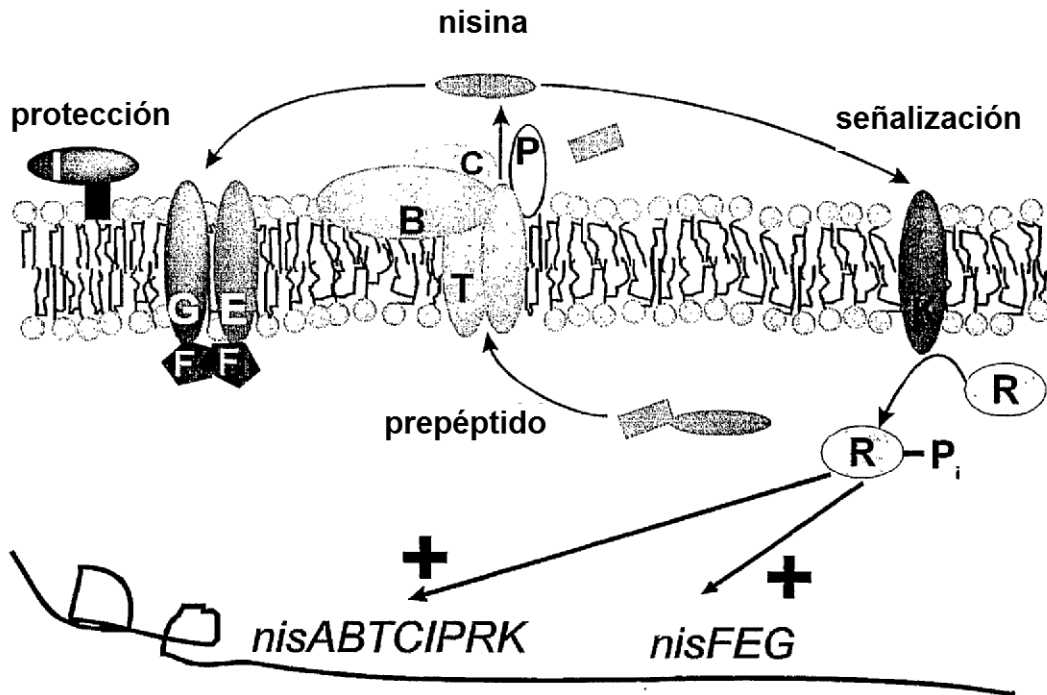


Figura 4.

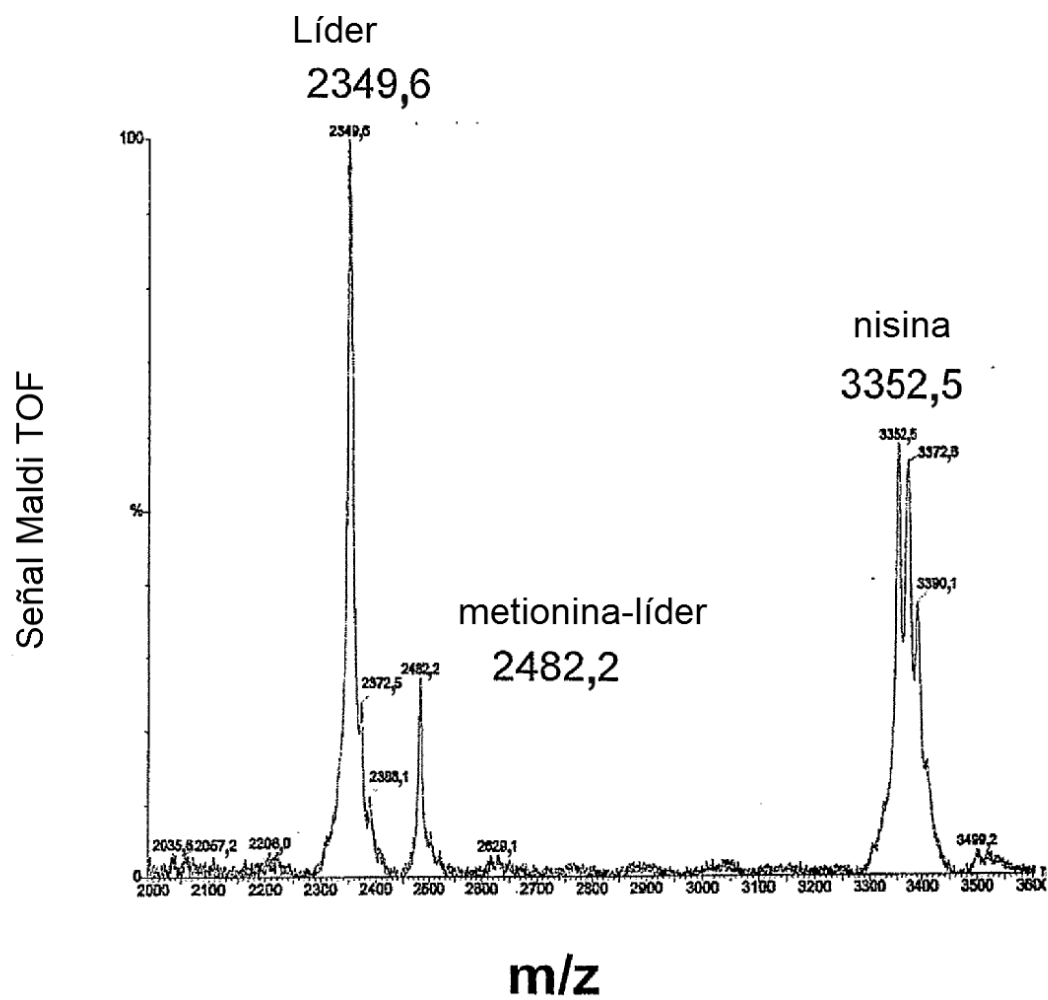


Figura 5.

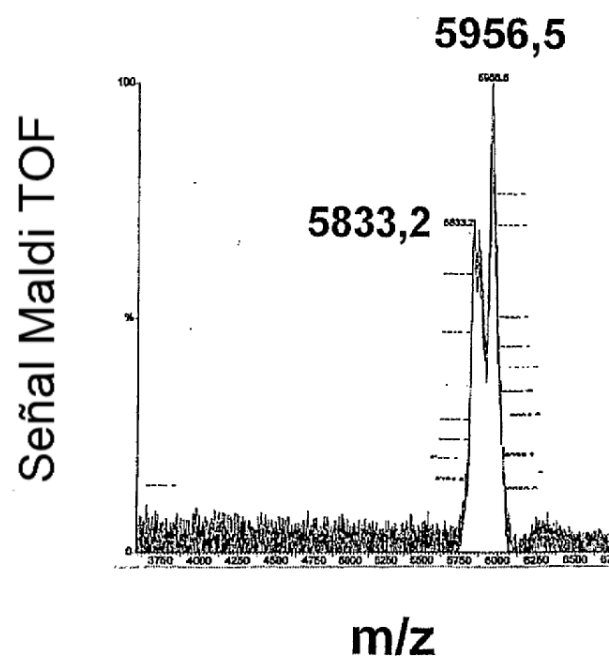


Figura 6

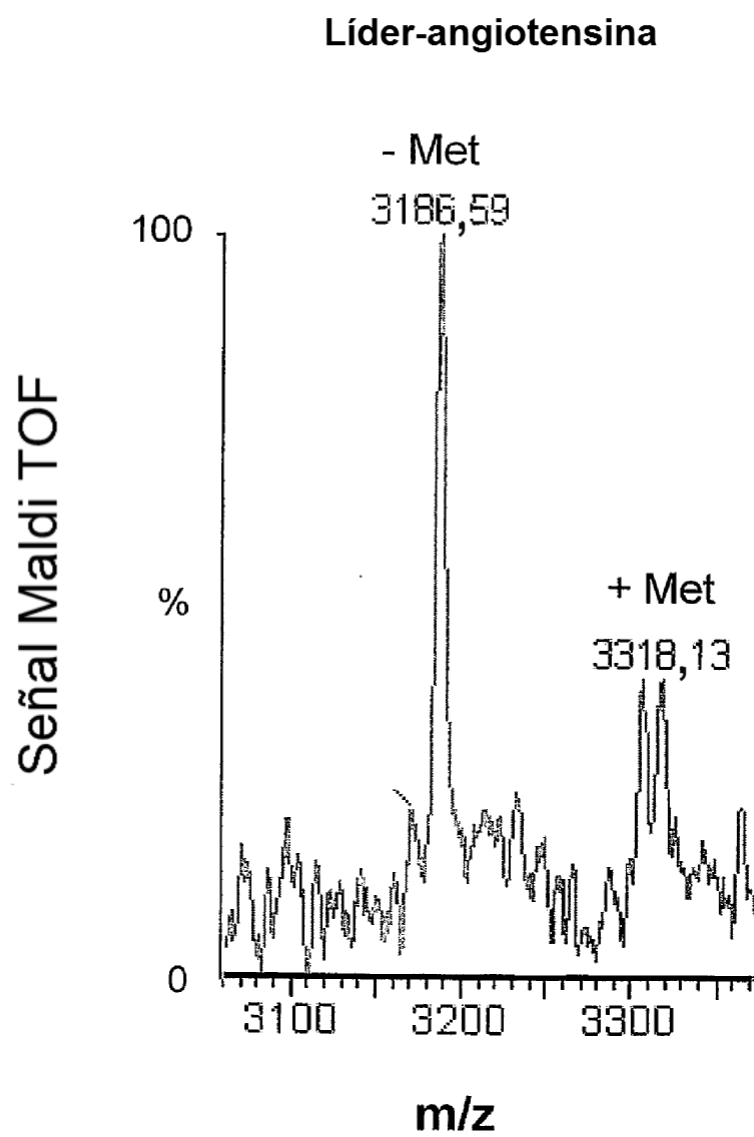


Figura 7

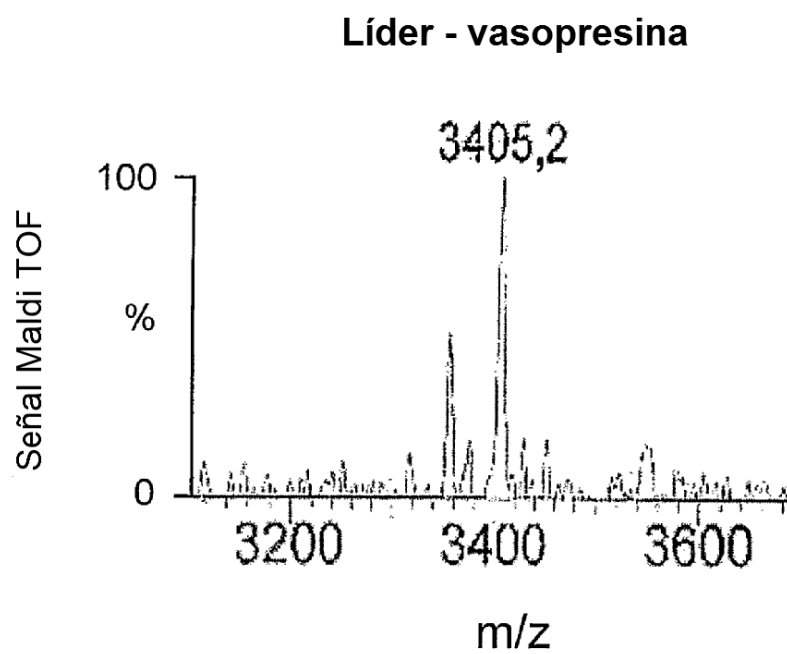


Figura 8

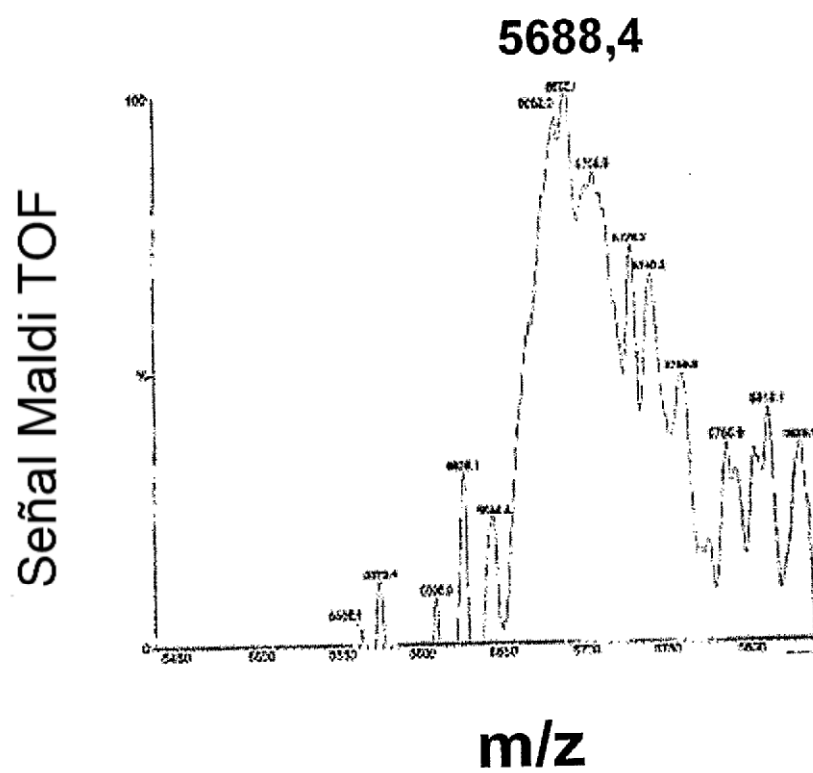


Figura 9

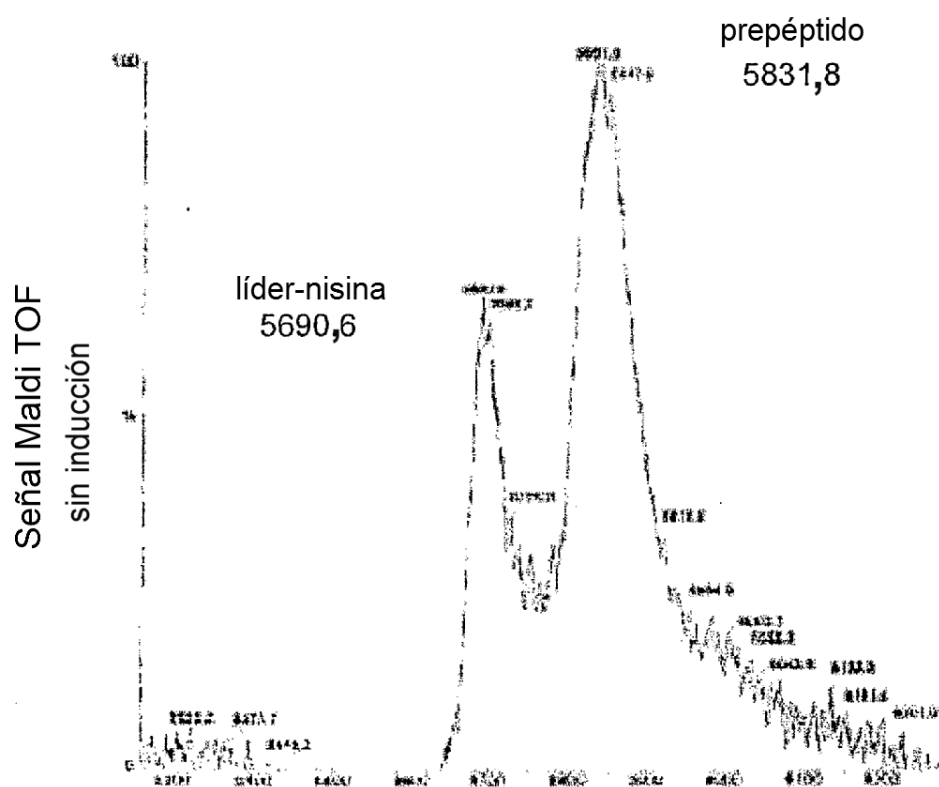


Figura 10A

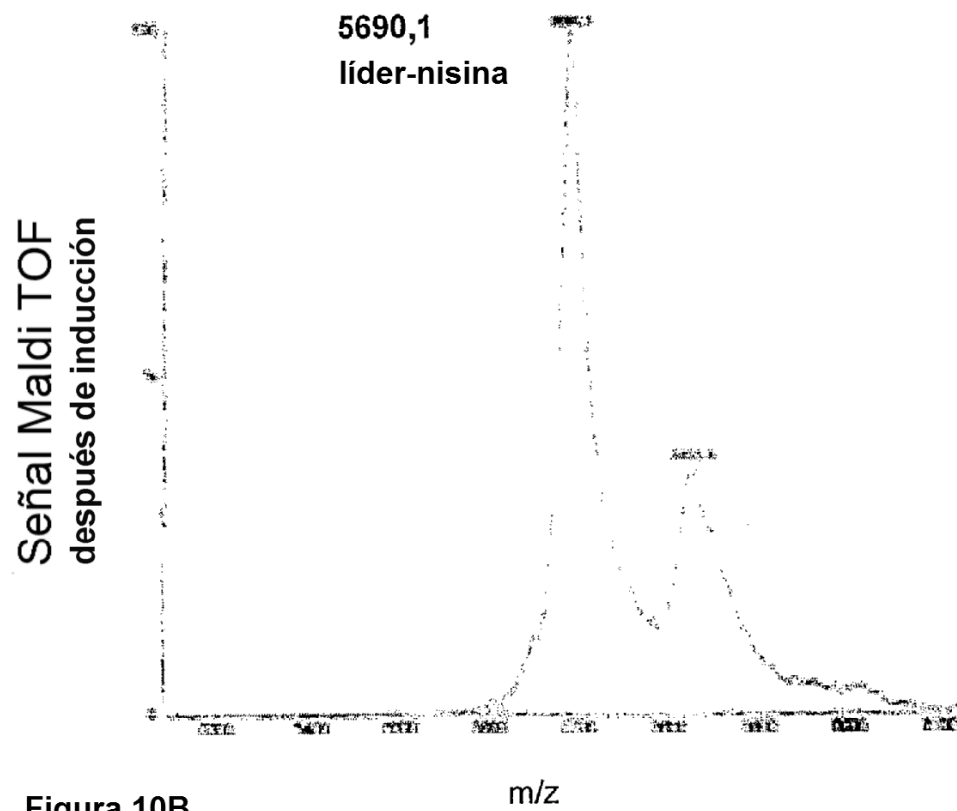


Figura 10B

prepéptido de nisina - encefalina T

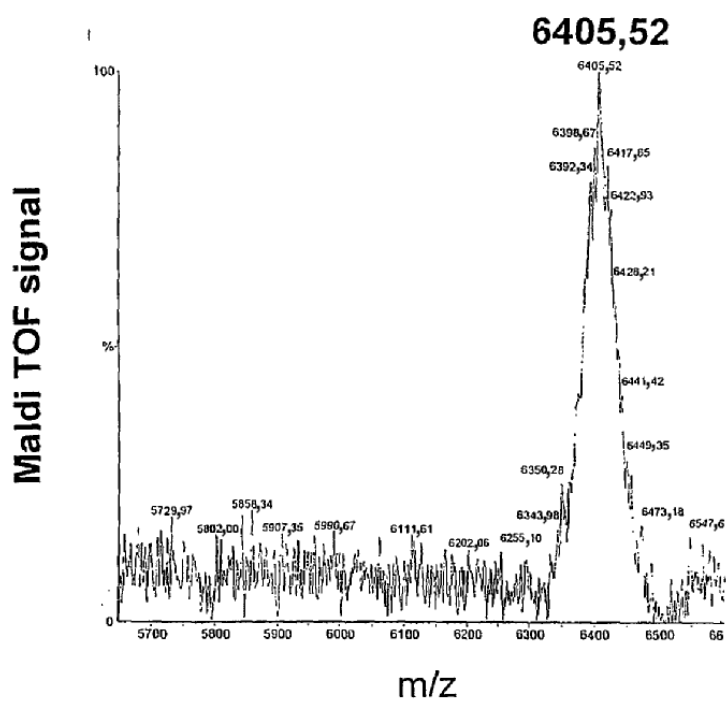


Figura 11