

PÉPTIDOS DISEÑADOS CON CARACTERÍSTICAS ANTIBACTERIANAS, ANTIFÚNGICAS, ANTIPARASITARIAS, ANTITUMORALES, CICATRIZANTES E INMUNOMODULADORAS.

1. CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con el desarrollo de péptidos bioactivos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales, cicatrizantes e inmunomoduladoras. Estos péptidos podrían tener aplicaciones en los sectores farmacéutico y biomédico, tanto en el cuidado de la salud humana como veterinaria.

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los péptidos antimicrobianos (AMPs), del inglés antimicrobial peptides y péptidos de defensa del hospedero (HDPs), del inglés Host Defense peptides, son moléculas pequeñas caracterizadas por una variedad de actividades biológicas. En particular, exhiben propiedades antibióticas de amplio espectro contra diversos microorganismos, incluyendo bacterias, hongos y virus [1], [2]. Los HDPs desempeñan roles fundamentales en procesos intracelulares durante la respuesta inflamatoria, la señalización celular y la cicatrización de heridas, además de su potencial antimicrobiano [3]. En términos de potencial antimicrobiano, hay evidencia que sugiere que estos péptidos pueden mostrar actividad antimicrobiana directa o contribuir a la modulación del sistema inmunológico para lograr inmunidad protectora [4], [5].

Los HDPs se han categorizado según sus características estructurales en tres grupos: péptidos lineales, que forman hélices alfa y carecen de residuos de cisteína; péptidos con residuos de prolina y/o glicina; y péptidos ricos en cisteína [6]. Dentro de estas categorías, se han identificado diversas familias de péptidos y se han denominado según los diferentes organismos animales en los que se han descubierto, como mamíferos, anfibios, insectos, entre otros [7], [8]. Estas familias se han nombrado e identificado según sus propiedades fisicoquímicas, estructura, origen y secuencias, incluyendo cecropinas, defensinas, attacinas, coleopterinas, entre otras [6].

Los AMPs y HDPs, debido a su acción protectora en los organismos y su baja tendencia a desarrollar resistencia bacteriana, se han utilizado como candidatos terapéuticos contra las bacterias. Esto se debe a que no todas las bacterias que muestran resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados desarrollan resistencia a los péptidos [9], [10]. De hecho, la evolución de la resistencia a AMPs o HDPs, como Taquiplesina II y Cecropina P1, es limitada. En consecuencia, la resistencia debido a mutaciones específicas y amplificación génica es baja, y las bacterias que han desarrollado resistencia a los antibióticos tradicionales no muestran resistencia cruzada a estos péptidos [11]. Esto se atribuye a las diversas características fisicoquímicas y a los numerosos mecanismos de acción antibacteriana de los AMPs y HDPs [12]. Por ejemplo, características fisicoquímicas como la presencia de aminoácidos polares, el porcentaje de residuos cargados y la hidrofobicidad se asocian con la baja tasa de evolución de

resistencia a los péptidos antimicrobianos. Los péptidos menos propensos a la resistencia generalmente tienen menos aminoácidos polares y cargados positivamente, y muestran una mayor hidrofobicidad [11].

Las cecropinas son una familia de péptidos antimicrobianos obtenidos de insectos. Inicialmente caracterizados en las ninfas de la polilla *Hyalophora cecropia* en la década de 1980 [13], [14]. Estos péptidos también se han identificado en órdenes de insectos como Coleoptera, Diptera y Lepidoptera [15]–[17]. Esta familia es altamente conservada, presentando un residuo de triptófano (W) en la segunda posición, lisinas simples o dobles (K) en las posiciones 5, 8, 9, y una arginina (R) en la posición 12 [18], [19]. Estos péptidos son generalmente anfipáticos, catiónicos, y poseen una estructura alfa-hélice. Además, se ha informado que exhiben diversos efectos farmacológicos, incluyendo actividad anticancerígena, proapoptótica y antimicrobiana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, así como protozoos [18], [20], [21]. Las cecropinas cuentan con una región N-terminal altamente básica, una región C-terminal altamente hidrofóbica, y una estructura secundaria anfipática capaz de penetrar las membranas bacterianas e inducir la muerte celular [18], [22], [23].

Las cecropinas son ricas en residuos de lisina y arginina, que comúnmente abarcan secuencias dirigidas por proteasas abundantes como tripsinas, inhibidor A y proteinasa K [24]. Por ejemplo, Satanin 1 es un péptido antimicrobiano de 37 aminoácidos de la familia de cecropinas, identificado a partir del análisis del transcriptoma del cuerpo graso del escarabajo coprófago *Dichotomius satanas* [25] después de ser estimulado con un conjunto de microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, y *Candida albicans* [19]. Este péptido ha demostrado actividad antimicrobiana contra microorganismos clínicamente relevantes como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y la levadura *Candida parapsilosis* [26]. Todo lo anterior sugiere que los AMPs son posibles candidatos terapéuticos para desarrollar alternativas que contribuyan a mitigar problemas de salud asociados con la aparición de cepas de microorganismos resistentes a múltiples fármacos [1].

No obstante el potencial de los AMPs para tratar enfermedades infecciosas causadas por microorganismos presenta limitaciones, como altos costos en la síntesis química, especialmente para péptidos grandes, efectos citotóxicos y hemolíticos en las células huésped y degradación proteolítica [27]–[30]. En consecuencia, se requiere investigación para mejorar péptidos candidatos, mejorando sus propiedades a través del diseño y modificaciones [31]–[33]. Existen diversas estrategias de diseño, como la relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés), que tiene como objetivo modificar péptidos naturales para mejorar la actividad antimicrobiana y la resistencia a la degradación proteolítica, al tiempo que se minimiza la toxicidad para las células huésped [34]. Otras estrategias de diseño se basan en la mutagénesis dirigida, enfoques de diseño computacional, bibliotecas sintéticas, metodologías asistidas por plantillas y estrategias centradas en los mecanismos de acción del péptido [35]. En estas estrategias de diseño, características como la cationicidad, la hidrofobicidad, el tamaño del péptido y la propensión a estructura de hélice desempeñan roles críticos en la actividad y toxicidad, haciéndolos factores esenciales al diseñar nuevos péptidos para su evaluación [2], [34]. Muchos péptidos catiónicos interactúan selectivamente con membranas bacterianas

aniónicas, sin embargo, diferentes péptidos emplean diferentes mecanismos de muerte celular [36].

Cambios específicos en aminoácidos podrían alterar las características fisicoquímicas y estructurales de los péptidos. En cuanto a las características fisicoquímicas, como la carga neta, los péptidos suelen exhibir una carga neta que va desde +3 hasta +6, y hay evidencia empírica de una correlación entre la carga y el potencial antimicrobiano [34]. Péptidos análogos como AcrAP1 y AcrAP2 enriquecidos con propiedades catiónicas, obtenidos del veneno del escorpión *Androctonus crassicauda*, demostraron un espectro ampliado de actividad antimicrobiana [37]. En el caso de péptidos análogos TsAP-1 y TsAP-2 del escorpión *Tityus serrulatus*, las modificaciones se basaron en sustituciones de lisina en la cara hidrofílica. Estos péptidos más catiónicos mostraron una mayor actividad antimicrobiana con un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, este aumento en la cationicidad se asoció con una mayor toxicidad del péptido hacia células eucariotas [3]. En cuanto a aspectos estructurales, se ha determinado que la actividad antimicrobiana y los cambios en la alfa-hélice y lámina beta de los AMPs pueden determinarse al interactuar con membranas biológicas [2]. Su investigación destaca la importancia del análisis estructural y funcional en los diseños de estos péptidos como estrategia para producir nuevas secuencias de péptidos activos mediante la identificación de aminoácidos que puedan mejorar la actividad sin causar toxicidad celular.

Se han desarrollado patentes para péptidos activos novedosos basados en el diseño de péptidos antimicrobianos. Por ejemplo, la patente de EE. UU. US8252737B2 de Robert S. Hodges y Yuxin Chen involucró sustituciones específicas de residuos hidrofóbicos en el péptido SEQ ID NO:1 con aminoácidos D-/L. Estas modificaciones específicas resultaron en péptidos con mejor actividad antimicrobiana y menor actividad hemolítica. Otro ejemplo es la Patente de EE. UU. 2016/0362459, que desarrolló péptidos activos basados en una secuencia central de aminoácidos que puede ser idéntica o tener algún grado de homología con la secuencia de aminoácidos de la familia de las cecropinas. Esta invención proporciona métodos para superar la resistencia inherente o adquirida de un microorganismo a un agente antibiótico. Los enfoques combinados son actualmente la forma óptima de diseñar péptidos y ofrecen información valiosa sobre ellos. Sin embargo, ha habido una exploración limitada para determinar perfiles óptimos de estructura y función con parámetros adicionales para mejorar la sensibilidad de la predicción [34]. Por lo tanto, la selección de un método de diseño de péptidos específico debe considerar características importantes para la actividad biológica de estos péptidos, incluyendo el espectro de actividad y los efectos citotóxicos en líneas celulares eucariotas.

Se han concedido patentes para péptidos innovadores diseñados con el fin de combatir eficazmente infecciones parasitarias. Un ejemplo notable es la patente PD1 JP5520961B2, en la que es esencial considerar la contribución de la hidrofobicidad, concluyendo que se debe considerar en su actividad leishmanicida [38]. Estas modificaciones específicas han llevado al desarrollo de péptidos con mayor actividad contra parásitos como *Leishmania* y *T. cruzi*.

En la búsqueda de diseños de péptidos antiparasitarios más efectivos, es crucial considerar la homología de péptidos activos con secuencias de aminoácidos encontradas en péptidos dirigidos a parásitos [39]. Esto se respalda por el hecho de que los péptidos de diferentes venenos de escorpión han demostrado afectar a los parásitos, indicando el potencial de secuencias de péptidos naturales para dirigirse específicamente a los parásitos [40]. Además, la caracterización funcional de temporin-SHe, un nuevo péptido antibacteriano y leishmanicida de amplio espectro, resalta el potencial de los péptidos para mostrar actividad contra los parásitos [41].

El diseño de péptidos antiparasitarios también puede beneficiarse de enfoques computacionales. Por ejemplo, se ha propuesto un marco de trabajo de aprendizaje automático de dos pasos para la identificación de péptidos antiparasitarios, que implica la selección de características con valores significativos para mejorar la precisión predictiva [42]. Además, el diseño computacional y la optimización de nuevos péptidos como inhibidores de proteosomas antimaláricos selectivos por especie demuestran el potencial de los métodos computacionales en la optimización de péptidos para la actividad antiparasitaria [43]. Otro ejemplo notable es PD1, un péptido con actividad antiparasitaria [44]. Estos péptidos se han modificado para mejorar su actividad contra parásitos como *Leishmania* y *T. cruzi* [45]. Un factor importante a considerar en el diseño de estos péptidos es la hidrofobicidad, ya que se ha encontrado que contribuye a su actividad leishmanicida [46]. La hidrofobicidad y la carga de los péptidos parecen ser características ventajosas para mejorar su actividad parasiticida [46].

Además, la respuesta inmunológica juega un papel crucial en la protección contra las infecciones parasitarias. Se ha descubierto que las células citotóxicas, como los linfocitos T CD8+, utilizan diversos mecanismos, incluida la secreción del péptido granulisina, perforina y granzimas, para matar parásitos intracelulares. Estas células inmunológicas protegen contra las infecciones parasitarias principalmente mediante la secreción de interferón-gamma. También se ha demostrado que los linfocitos T CD8+ citotóxicos reconocen y eliminan reticulocitos infectados por *Plasmodium vivax*, proporcionando protección contra la malaria [47], [48], [49].

Por otro lado, la actividad cicatrizante de los péptidos antimicrobianos o los péptidos de defensa del hospedador ha sido objeto de interés en la investigación biomédica. Estudios han demostrado que ciertos péptidos antimicrobianos, con modificaciones en su secuencia, no solo poseen propiedades antimicrobianas, sino que también pueden promover la cicatrización de heridas. Estos péptidos han sido evaluados en ensayos clínicos como agentes terapéuticos para modular la respuesta inmune, promover la cicatrización de heridas y prevenir adherencias postquirúrgicas [46]. Además, la interacción entre la actividad cicatrizante y las respuestas inmunitarias, como las respuestas Th2 y Th17, ha sido asociada con la regulación de la fibrosis y la promoción de la cicatrización de heridas. Asimismo, la capacidad de ciertos péptidos, como los péptidos de colágeno, para acelerar la cicatrización de heridas mediante la modulación de la microbiota cutánea ha sido destacada en la literatura [7] - [50]. Estos hallazgos subrayan el potencial de los péptidos antimicrobianos modificados para no solo combatir infecciones, sino también para promover la cicatrización de heridas de manera efectiva y específica.

Sumando a esto, la modificación de péptidos ha demostrado ser prometedora en la mejora de la actividad antitumoral. Se han desarrollado péptidos que penetran en los tumores para mejorar la entrega de medicamentos a los sitios tumorales al unirse a receptores específicos del tumor y someterse a la escisión proteolítica para mejorar la penetración en las células tumorales [51]. El desarrollo de péptidos que se unen a neuropilina con capacidades de direccionamiento transtumoral ha demostrado ser prometedor al permitir interacciones específicas con los tejidos tumorales [52]. Estas modificaciones han llevado a la activación de vías de penetración celular y tisular, mejorando la especificidad y eficacia de los péptidos antitumorales [51]. Además, se ha demostrado que la inyección intratumoral de péptidos mejora la antigenicidad de las células tumorales, brindando una posible vía para mejorar la inmunoterapia del cáncer específica de antígenos [53]. Estos avances en la modificación de péptidos y sistemas de entrega han marcado el camino para el desarrollo de terapias dirigidas y efectivas basadas en péptidos antitumorales.

La importancia de seguir desarrollando péptidos antimicrobianos con actividades multifacéticas es crucial en el contexto actual de resistencia a los antibióticos, el aumento de infecciones causadas por parásitos y la necesidad de tratamientos efectivos contra el cáncer. La resistencia a los antibióticos representa un desafío significativo en el tratamiento de infecciones bacterianas, lo que resalta la urgencia de encontrar alternativas terapéuticas efectivas. Además, las infecciones causadas por parásitos, como la malaria, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, continúan siendo un problema de salud pública en muchas regiones del mundo, requiriendo enfoques innovadores para el desarrollo de agentes terapéuticos. Por otro lado, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, lo que subraya la necesidad de estrategias terapéuticas novedosas y efectivas. En este sentido, el desarrollo de péptidos antimicrobianos, objetivo de esta invención, con propiedades multifacéticas, que puedan abordar estas problemáticas de manera integral, se presenta como una línea de investigación prometedora y de gran relevancia en el campo de la medicina y la biotecn

3. DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención presenta péptidos novedosos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales, cicatrizantes e inmunomoduladoras. Estos péptidos se derivan del siguiente patrón de secuencia: X1-S2-K3-X4-W5-R6-K7-X8-X9-K10-R11-V12-K13-K14-X15-F16-X17-X18-T19-K20-X21-A22-K23, donde:

X1 corresponde a R-K-G

X4 corresponde a R-K

X8 corresponde a F-I

X9 corresponde a E-L-K

X15 corresponde a I-V

X17 corresponde a E-K-L

X18 corresponde a H-K

X21 corresponde a E-K-L

Estas modificaciones resultan en péptidos más cortos con propiedades antimicrobianas mejoradas contra bacterias Gram-negativas, hongos y parásitos, incluyendo microorganismos altamente patógenos y resistentes a antibióticos, así como una actividad citotóxica reducida en comparación con los análogos naturales. Varios de estos péptidos han demostrado efectos específicos contra bacterias Gram-negativas (por ejemplo, *Klebsiella pneumoniae*) y Gram-positivas (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*), que son microorganismos clínicamente relevantes pertenecientes al grupo ESKAPE. Además, estos péptidos pueden exhibir actividad antitumoral contra células de leucemia.

Los péptidos diseñados en esta invención pueden ser utilizados como estrategia para el desarrollo de productos farmacéuticos y dispositivos médicos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales, cicatrizantes e inmunomoduladoras en los campos biomédico y farmacéutico, tanto para aplicaciones humanas como veterinarias.

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de calor de la actividad antimicrobiana en μM , el valor representa la concentración inhibitoria mínima para cada péptido con respecto a cada bacteria. Los valores en blanco corresponden al péptido que no muestra actividad a las concentraciones probadas.

Figura 2. Actividad de los péptidos diseñados en células derivadas de leucemia (THP-1) a diferentes concentraciones molares (μM). Todos los datos representan la media $\pm$ Desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes.

Figura 3. Actividad de los péptidos SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 32 en células derivadas de leucemia (THP-1). A y B. Cinética de actividad durante 14 horas para los péptidos en 6 concentraciones de diluciones seriadas. C. Control de estaurosporina D. Comparación de la actividad del péptido contra THP-1 vs. PBMCs a las 16 horas de incubación con ecuación de la línea de tendencia para calcular la CI50 para cada grupo.

Figura 4. Actividad citotóxica de los péptidos en células VERO. Porcentaje de actividad metabólica medido por fluorescencia de resorufina según las diferentes concentraciones de los péptidos.

Figura 5. Actividad citotóxica en eritrocitos humanos y células Vero según la presencia o ausencia de residuos L-K-E en la posición número 9.

Figura 6. Actividad hemolítica en eritrocitos humanos. Porcentaje de hemólisis según el CT: control tritón X-100 0.1%, CC: control PBS 1X.

Figura 7. Actividad citotóxica de los péptidos en PBMCs.

Figura 8. Producción de $\text{TNF-}\alpha$ en PBMCs estimulados con LPS. Diferencia estadísticamente significativa en la concentración de $\text{TNF-}\alpha$ de los tratamientos en comparación con los PBMCs de control tratados con LPS ($p < 0.001$, ANOVA de una vía).

Figura 9. Actividad antiparasitaria contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10. Actividad antiparasitaria contra taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. M (medio).

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención introduce péptidos novedosos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antitumorales, cicatrizantes e inmunomoduladoras. Estos péptidos se derivan del siguiente patrón de secuencia: X1-S2-K3-X4-W5-R6-K7-X8-X9-K10-R11-V12-K13-K14-X15-F16-X17-X18-T19-K20-X21-A22-K23, donde:

X1 corresponde a R-K-G

X4 corresponde a R-K

X8 corresponde a F-I

X9 corresponde a E-L-K

X15 corresponde a I-V

X17 corresponde a E-K-L

X18 corresponde a H-K

X21 corresponde a E-K-L.

Estos cambios en la secuencia resultan en péptidos de menor longitud con modificaciones en la carga neta, la hidrofobicidad, la anfipatía y la helicidad que afectan sus actividades biológicas.

La reducción en la longitud del péptido de 17 a 23 aminoácidos (X1-S2-K3-X4-W5-R6-K7-X8-X9-K10-R11-V12-K13-K14-X15-F16-X17 hasta [X18-T19-K20-X21-A22-K23]) puede proporcionar una mayor estabilidad en el suero humano y una menor probabilidad de degradación proteolítica. Una longitud más corta de aminoácidos no esenciales puede aumentar la solubilidad y la velocidad a la que el péptido se disuelve en el suero. En consecuencia, estos cambios en la longitud del péptido pueden mantener o mejorar su actividad biológica en comparación con los análogos naturales, al tiempo que reducen los costos asociados con la síntesis química de un mayor número de aminoácidos.

Las modificaciones en la carga neta se han correlacionado con el potencial antimicrobiano. Las sustituciones de aminoácidos en las posiciones X1, X4, X9, X17, X18 y X21 con lisina y/o arginina, aminoácidos cargados positivamente, han resultado en una actividad biológica mejorada en comparación con los análogos naturales. El punto isoeléctrico (pI) es el pH en el cual el péptido tiene una carga neta de cero. Los péptidos generalmente tienen un pI > 9, dándoles un carácter catiónico bajo condiciones de pH normales. Cambios en el pI pueden alterar la solubilidad, afectando la capacidad del péptido para unirse a otras moléculas y su estabilidad. La estabilidad relacionada con el pI permite el mantenimiento de interacciones electrostáticas y reduce la agregación y precipitación del péptido.

Las modificaciones en la longitud que preservan dominios funcionales mientras afectan regiones hidrofóbicas reducen la toxicidad de los péptidos en líneas celulares eucariotas, incluyendo eritrocitos humanos y PBMCs.

Los péptidos desarrollados exhiben actividad inmunomoduladora, reduciendo la capacidad del lipopolisacárido (LPS) para inducir la producción de TNF-alfa en PBMCs humanos. Por lo tanto, estos péptidos pueden ser utilizados en terapias inmunomoduladoras para condiciones como infecciones y sepsis en aplicaciones tanto humanas como veterinarias.

Los péptidos demuestran actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* a concentraciones equivalentes o inferiores a las utilizadas por agentes antiparasitarios convencionales. La hidrofobicidad en los péptidos puede afectar su interacción con las cadenas acílicas de los lípidos. Estos cambios en las interacciones tienen efectos biofísicos y biológicos que influyen en las interacciones con las membranas microbianas, mejorando significativamente la selectividad y los efectos antimicrobianos. Sustituciones con aminoácidos ricos en residuos hidrofóbicos como leucina e isoleucina han resultado en una actividad antimicrobiana mejorada.

Los péptidos antimicrobianos descritos muestran actividad citotóxica contra células de leucemia.

Una ventaja de la presente invención radica en la capacidad de producir estos péptidos derivados del patrón de la reivindicación 1 utilizando métodos recombinantes o sintéticos, lo que contribuye a la reducción de costos asociados con el proceso de purificación. Además, estos péptidos ofrecen una estrategia alternativa para el desarrollo de productos farmacéuticos y dispositivos médicos con enfoque en la actividad antimicrobiana, antiparasitaria, cicatrizante, inmunomoduladora y anticancerígena en los campos biomédico y farmacéutico, tanto para uso humano como veterinario.

6. EJEMPLOS

Ejemplo 1: Uso del patrón de la reivindicación 1 para generar péptidos.

Utilizando el patrón especificado en la reivindicación 1, se generan los siguientes péptidos, como se muestra en la Tabla 1, y se sintetizan mediante síntesis química en fase sólida.

Tabla 1. Lista de péptidos generados:

ID	Sequence
SEQ ID NO: 5	KSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEA
SEQ ID NO: 6	KSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEAK
SEQ ID NO: 7	KSKRWRKFEKRVKKIFEKFKEAK
SEQ ID NO: 8	KSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEA
SEQ ID NO: 9	KSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEAK
SEQ ID NO: 10	GSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEA
SEQ ID NO: 11	GSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEAK
SEQ ID NO: 12	GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEA
SEQ ID NO: 4	GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEAK
SEQ ID NO: 13	GSKRWRKFEKRVKKIFEHTK
SEQ ID NO: 14	GSKRWRKFEKRVKKIFE
SEQ ID NO: 15	GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKLAK

SEQ ID NO: 16	GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKLAK
SEQ ID NO: 17	GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKKAK
SEQ ID NO: 18	GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKKAK
SEQ ID NO: 19	GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKLAK
SEQ ID NO: 20	GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKLAK
SEQ ID NO: 21	GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKLAK
SEQ ID NO: 22	GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKEAK
SEQ ID NO: 23	GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKEAK
SEQ ID NO: 24	GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKEAK
SEQ ID NO: 25	GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKKAK
SEQ ID NO: 2	GSKRWRKFEKRVKKVFEHTKEA
SEQ ID NO: 26	GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKLAK
SEQ ID NO: 27	GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKEAK
SEQ ID NO: 28	GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKLAK
SEQ ID NO: 29	GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKKAK

SEQ ID NO: 30	GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKKAK
SEQ ID NO: 31	GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKLAK
SEQ ID NO: 32	GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKLAK
SEQ ID NO: 33	GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKKAK
SEQ ID NO: 34	GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKEAK
SEQ ID NO: 35	GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKKAK
SEQ ID NO: 36	GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKKAK
SEQ ID NO: 37	GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKKAK
SEQ ID NO: 38	GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKEAK
SEQ ID NO: 39	GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKEAK
SEQ ID NO: 40	GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKEAK

Ejemplo 2. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los péptidos se evaluó mediante el método de dilución en microplacas [54]. Para calcular la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) contra *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 105663, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA 170513, los microorganismos se inocularon en medio líquido Mueller Hinton (MH) (Ref 02-136-500, Scharlau) y se incubaron en agitación (250 rpm) durante la noche a 37°C. Al día siguiente, los inóculos se refrescaron y se permitió que crecieran hasta una densidad óptica de 0,1 medida a 570 nm en un espectrofotómetro EPOCH (Biotek), equivalente a 3-5 x 10⁸ UFC/mL. El inóculo se ajustó a 3-5x10⁵ UFC/mL a una dilución de 1:1000 en MH

(solución de trabajo de bacterias). Los péptidos se prepararon en diluciones seriadas comenzando a 50 µg/mL (concentraciones finales) y luego se mezclaron con la solución de trabajo de bacterias en una placa de 384 pocillos con un volumen final de 25 µL por pocillo. El ensayo se incubó a 37°C durante un período de 16 a 18 horas; después de este tiempo, se añadió el colorante resazurina (Acros Organics 418900050, Geel, Bélgica) a una concentración final de 44 µM como indicador del metabolismo celular y se incubó durante 2 horas adicionales a 37°C; la resorufina reducida por células metabólicamente activas se cuantificó midiendo su fluorescencia a una longitud de onda de 565/10 nm (excitación) y 600/40 nm (emisión) en el fluorómetro Synergy HTX (Biotek).

Para calcular la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC), se consideró como la concentración más baja de péptido que inhibió exitosamente el crecimiento bacteriano según la medición de fluorescencia (Figura 1).

Los péptidos con aminoácidos $16 < X < 21$; donde X corresponde al número de aminoácidos que mantienen o mejoran su actividad antibacteriana (MIC), SEQ ID NO:14, con 17 aminoácidos, o SEQ ID NO:13 (N=20). Estos péptidos tienen una actividad antimicrobiana mejorada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, mientras que péptidos como SEQ ID NO:10 (N=22), SEQ ID NO:11 (N=23), con un mayor número de aminoácidos tienen una menor actividad contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, pierden actividad como SEQ ID NO:17 (N=23) contra *K. pneumoniae*. Sin embargo, los péptidos con una longitud de menos de 16 aminoácidos pierden su actividad antimicrobiana, como SEQ ID NO:41 (N=14) (Figura 1).

El desarrollo de péptidos antimicrobianos a partir del patrón SEI ID NO:1 genera péptidos con actividad antimicrobiana principalmente contra microorganismos Gram-negativos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; algunos de los péptidos desarrollados también muestran actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Los péptidos desarrollados son más cortos que el péptido natural Satanin 1 y tienen un perfil de toxicidad más bajo, al tiempo que mantienen e incluso mejoran la actividad antimicrobiana de SEI ID NO:13, SEI ID NO:23 y SEI ID NO:29, que tienen una MIC más baja contra diferentes microorganismos (Figura 1).

Péptidos con cambios relativos en la posición X9, correspondiente a E-L-K, donde X representa un número específico de aminoácidos, aquellos péptidos con la presencia de (E)9 mostraron una mejora en la actividad biológica frente a *E. coli* y *K. pneumoniae*, por ejemplo, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 17 en comparación con el péptido análogo aquellos que no tienen este aminoácido en esa posición como SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40. Péptidos con la presencia de (K)9, como SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 40, demostraron una concentración inhibitoria mínima (CIM) más alta en comparación con péptidos que no presentan este aminoácido SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 21, con una CIM más baja SEQ ID NO: 4. Estos cambios podrían estar afectando la hidrofobicidad y la interacción con las cadenas acílicas de lípidos. Con respecto a la actividad de los péptidos frente a *P. aeruginosa*, aquellos con presencia (E)17 mostraron una concentración inhibitoria mínima

(CIM) más alta (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34), mientras que, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23 mostraron una CIM más baja.

Ejemplo 3. Actividad anticáncer

A partir del patrón de diseño SEI ID NO:1, se seleccionaron las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 32 para evaluar su efecto sobre la actividad metabólica de las células de leucemia monocítica derivadas de THP-1. Las células THP-1 representan un subtipo de leucemia monocítica, con 50,000 células por pocillo sembradas en placas de 384 pocillos e incubadas durante 14-18 horas como punto final. Se observó una disminución selectiva en la actividad metabólica de las células derivadas de la leucemia para los péptidos SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 15 (FIGURA 2, Tabla 2). Se realizaron evaluaciones cinéticas detalladas de la actividad para SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 29, revelando actividades rápidas con efectos en la actividad metabólica de las células tumorales en menos de 1 hora de interacción (Figura 3).

Además, se llevó a cabo un análisis de selectividad, revelando que los péptidos exhiben selectividad en su actividad contra las células de leucemia con valores de IC₅₀ (concentración inhibitoria 50) de 0,55 μ M (IC₉₅%; 0,5082-0,5978; R²: 0,9813) para SEQ ID NO: 29 y 0,63 μ M (IC₉₅%; 0,6038-0,6616; R²: 0,9928) para SEQ ID NO: 32. En contraste, su actividad contra las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) resultó en valores de IC₅₀ de 38,9 μ M (IC₉₅%; 30,82-48,58; R²: 0,9068) y 55,47 μ M (IC₉₅%; 48,70-62,93; R²: 0,9634) para los mismos péptidos, respectivamente. Los índices terapéuticos calculados a partir de estos datos fueron 70.17 para SEQ ID NO: 29 y 87.63 para SEQ ID NO: 32 (Figura 3).

Tabla 2. Evaluación de la actividad contra células THP1 en los péptidos seleccionados.

ID	THP1		
	IC ₅₀ μ M	IC ₉₅ %	R squared
SEQ ID NO: 2	>36		
SEQ ID NO: 4	>55,06		
SEQ ID NO: 13	47,01	37,79 to 75,42	0,523
SEQ ID NO: 14	55,64	44,64 to 97,61	0,5177
SEQ ID NO: 15	6,248	5,167 to 7,403	0,9276
SEQ ID NO: 16	34,43	28,77 to 44,94	0,6366
SEQ ID NO: 19	12,35	10,86 to 14,04	0,922
SEQ ID NO: 23	>34		

SEQ ID NO: 29	4,315	3,439 to 5,282	0,8878
SEQ ID NO: 32	2,03	1,056 to 2,815	0,8696

Ejemplo 4. Actividad citotóxica en células VERO

La actividad citotóxica de los péptidos diseñados se evaluó midiendo la actividad metabólica como indicador de la viabilidad celular en la línea celular Vero. Las células Vero (ATCC: CCL-81) fueron cultivadas y posteriormente, se sembraron 15,000 células en microplacas de 96 pocillos con un volumen total de 100 µL de medio DMEM suplementado, e incubando a 37°C durante 18 horas. Después de esto, se retiró el medio y se añadieron 50 µL de medio que contenía el péptido. Los péptidos se prepararon en diluciones seriadas en medio de cultivo DMEM suplementado y se añadieron a cada pocillo por concentración y triplicado. La placa se incubó luego durante 18 horas a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, se añadió resazurina a una concentración final de 44 µM, y la placa se incubó durante 4 horas adicionales. Las lecturas de fluorescencia se tomaron utilizando un fluorómetro Synergy HTX (Biotek) a longitudes de onda de emisión y excitación de 565/600. Utilizando los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de actividad metabólica en comparación con las condiciones de control, que incluyeron medio de cultivo (Blanco), tritón 100X 0,1% (Control de Muerte) y control celular no tratado, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Citotóxica} = ((x - (\text{promedio}(\text{blancos}))) / (\text{promedio}(\text{Control Tritón}) - \text{promedio}(\text{blancos}))) * 100.$$

Tabla 3. Citotoxicidad en células Vero

ID	LÍNEA CELULAR VERO		
	IC50	IC95%	R squared
SATANIN 1	50,62	40,59 - 91,45	0,870
SEQ ID NO: 20	76,83	62,99 - 91,50	0,959
SEQ ID NO: 21	75,24	70,04 - 92,80	0,976
SEQ ID NO: 22	39,49	36,97 - 46,10	0,989
SEQ ID NO: 26	66,32	60,74 - 77,95	0,973
SEQ ID NO: 27	28,45	24,97 - 36,04	0,962
SEQ ID NO: 28	31,69	27,68 - 38,10	0,972
SEQ ID NO: 29	32,76	29,89 - 38,98	0,971
SEQ ID NO: 30	67,14	65,29 - 69,16	0,999
SEQ ID NO: 31	28,56	26,84 - 45,44	0,969
SEQ ID NO: 32	27,06	24,42 - 31,08	0,975

SEQ ID NO: 33	218,4	192,6 - 270,2	0,930
SEQ ID NO: 34	209,5	169,6 - 282,0	0,914
SEQ ID NO: 35	133,6	121,3 - 151,6	0,976
SEQ ID NO: 36	127,3	102,7 - 153,8	0,943
SEQ ID NO: 37	66,1	56,58 - 74,86	0,987
SEQ ID NO: 38	60,91	57,40 - 67,21	0,992
SEQ ID NO: 39	307,8	219,9 - 523,0	0,875

Péptidos con cambios relativos en la posición X9, correspondiente a E-L-K, donde X representa un número específico de aminoácidos, mostraron una mejora en la actividad biológica en comparación con el péptido análogo. Péptidos con cambios (EK)9, como SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 4, demostraron una actividad citotóxica y hemolítica más baja que péptidos con L9, como SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. Esta observación se atribuye a que la leucina es un aminoácido hidrofóbico que influye en la citotoxicidad. Su ausencia interrumpe el momento hidrofóbico de la molécula, reduciendo así su toxicidad. En consecuencia, la leucina se incluyó en nuestro SEQ ID NO: 1 (Figura 4, 5B).

Ejemplo 5. Actividad Hemolítica

La actividad hemolítica se evaluó en eritrocitos humanos. Se utilizaron cuatro mililitros de sangre venosa periférica con anticoagulante EDTA 1 mM. Los eritrocitos se lavaron mediante centrifugación a 800 g durante 10 minutos, y se eliminó el sobrenadante. El pellet de eritrocitos se resuspendió en PBS 1X (130 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ y 1,5 mM de K₂HPO₄, pH 7,4). Este proceso se repitió tres veces, y los eritrocitos se dejaron estabilizar durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se preparó una dilución 1:25 con PBS 1X a partir de los eritrocitos lavados, y se agregaron 22,5 µL por pozo para lograr un volumen final de 25 µL por pozo en una placa de polipropileno de 384 pozos. Estos eritrocitos se mezclaron con 2,5 µL de diferentes concentraciones finales de péptidos (200-170 µM) por triplicado con diluciones seriadas. Además, se utilizó Triton X-100 al 0,1% como control de hemólisis, PBS como blanco y Satanin 1 como péptido natural descrito previamente [26]. La placa se incubó a 37°C durante 18 horas, se centrifugó a 800 g durante 5 minutos y se tomaron 3 µL del sobrenadante. Finalmente, se midió la absorbancia utilizando un lector de placas Take3 y un espectrofotómetro Biotek a 410 nm. El porcentaje de hemólisis se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemólisis} = ((x - (\text{promedio}(\text{blancos}))) / (\text{promedio}(\text{control Triton X-100}) - \text{promedio}(\text{blancos}))) * 100$$

Donde X es la absorbancia de la muestra a 410 nm.

Blancos son la absorbancia a 410 nm de las muestras de PBS.

El control Tritón es la absorbancia a 410 nm de las muestras de Triton X-100 al 0,1%.

Los péptidos con actividad hemolítica similar a Satanin 1 son SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 32; los demás péptidos diseñados mostraron menos hemólisis a las concentraciones evaluadas que el péptido natural Satanin 1. Estos péptidos mostraron actividades hemolíticas de menos del 30% a concentraciones alrededor de 170 μ M.

Ejemplo 6. Actividad Citotóxica en PBMCs

Para evaluar la actividad citotóxica de los péptidos diseñados, se evaluó la actividad metabólica como indicador de la viabilidad celular en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs). Las PBMCs se extrajeron de la sangre venosa periférica mediante sedimentación celular en un gradiente de densidad de 1,077 g/mL de iodixanol. Posteriormente, se extrajeron 6 mL de sangre venosa periférica para obtener aproximadamente 8 millones de células.

La sangre venosa periférica se extrajo mediante punción venosa periférica y se trató con 2 mM de etilendiaminotetraacetato (EDTA) como anticoagulante, diluido 1:1 en tampón B (0,85% de NaCl, 10 mM de Hepes - NaOH pH 7,4). A continuación, en un tubo cónico de centrifugación de 15 mL, se añadieron 3 mL de barrera de densidad de iodixanol a 1,077 g/mL, seguido por la adición de 6 mL de sangre diluida. Esta muestra se centrifugó a 700 g durante 20 minutos a temperatura ambiente sin frenado. Al final de la centrifugación, se recogió la interfaz celular, se diluyó 1:1 en tampón B y se centrifugó nuevamente a 150 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió luego en medio RPMI con antibiótico-antimicótico 1X. Las células se contaron con un hemocitómetro y se añadieron a una placa de polipropileno de 384 pozos a una concentración de 100.000 a 150.000 células por pozo en un volumen final de 25 μ L.

Los péptidos se prepararon en diluciones seriadas en medio RPMI y se añadieron a cada pozo por concentración y por triplicado. Posteriormente, la placa se incubó durante 18 horas a 37°C, 5% de CO₂. Luego, se añadió resazurina a una concentración final de 44 μ M, y la placa se incubó durante 4 horas adicionales. Se midió la fluorescencia de la placa utilizando un fluorómetro Synergy HTX (Biotek) a longitudes de onda de emisión y excitación de 565/600. El porcentaje de actividad metabólica se calculó en base a estos datos, comparando con controles de medio de cultivo (Blanco), Tritón 100X al 0,1% (Control de Muerte) y Control Celular no tratado. Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad metabólica} = ((X - \text{blanco}) / (\text{Control celular} - \text{blanco})) * 100$$

A partir de los datos de viabilidad, se emplea un modelo de regresión no lineal para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para péptidos que exhiben una actividad citotóxica superior al 50% de actividad metabólica.

Tabla 4. Actividad Citotóxica contra PBMCs humanos y eritrocitos.

ID	PBMCs			Hemolysis
	IC50	IC95%	R squared	µM (%)
SATANIN 1	9,88	9,032 - 10,81	0,9689	43 µM (23,64 %)
SEQ ID NO: 22	17,44	15,53 - 19,56	0,977	173,28 µM (30,91 %)
SEQ ID NO: 38	28,24	23,55 - 33,82	0,9446	172,38 µM (19,32 %)
SEQ ID NO: 29	38,40	30,42 - 47,95	0,9068	173,33 µM (19,25 %)
SEQ ID NO: 28	38,66	29,87 - 49,92	0,8884	173,33 µM (17,95 %)
SEQ ID NO: 30	44,23	39,13 - 49,51	0,9677	172,38 µM (23,66 %)
SEQ ID NO: 31	49,74	38,56 - 64,34	0,8821	173,28 µM (25,24 %)
SEQ ID NO: 32	55,39	48,63 - 62,84	0,9634	174,24 µM (44,19 %)
SEQ ID NO: 27	97,26	80,86 - 119,5	0,911	172,32 µM (10,19 %)
SEQ ID NO: 7	104,50	85,11 - 134,3	0,8475	132,2 µM (3,37 %)
SEQ ID NO: 19	111,80	102,9 - 121,7	0,9549	173,28 µM (3 %)
SEQ ID NO: 9	>133,843			133,84 µM (1,94 %)
SEQ ID NO: 6	>134,246			134,25 µM (3,23 %)
SEQ ID NO: 4	>137,106			137,11 µM (2,81 %)
SEQ ID NO: 11	>137,528			137,53 µM (1,96 %)
SEQ ID NO: 8	>139,841			139,84 µM (2,99 %)
SEQ ID NO: 5	>140,28			140,28 µM (3,62 %)
SEQ ID NO: 3	>141,974			141,97 µM (2,32 %)
SEQ ID NO: 12	>143,406			143,41 µM (1,63 %)
SEQ ID NO: 10	>143,868			143,87 µM (1,81 %)
SEQ ID NO: 2	>144,131			180,16 µM (1,07 %)
SEQ ID NO: 17	>171,437			171,44 µM (2,02 %)
SEQ ID NO: 23	>171,437			171,44 µM (1,02 %)
SEQ ID NO: 34	>171,437			171,44 µM (1,8 %)
SEQ ID NO: 18	>171,493			171,49 µM (1,86 %)
SEQ ID NO: 33	>171,493			171,49 µM (1,71 %)
SEQ ID NO: 40	>171,493			171,49 µM (3,29 %)
SEQ ID NO: 35	>171,548			171,55 µM (2,12 %)
SEQ ID NO: 16	>172,325			172,32 µM (1,24 %)
SEQ ID NO: 24	>172,325			172,32 µM (1,37 %)
SEQ ID NO: 15	>172,381			172,38 µM (1,12 %)
SEQ ID NO: 20	>172,381			172,38 µM (3,95 %)

SEQ ID NO: 25	>172,381			172,38 μ M (1,59 %)
SEQ ID NO: 39	>172,381			172,38 μ M (2,31 %)
SEQ ID NO: 21	>172,436			172,44 μ M (5,76 %)
SEQ ID NO: 36	>172,436			172,44 μ M (3,14 %)
SEQ ID NO: 37	>172,436			172,44 μ M (9,93 %)
SEQ ID NO: 26	>173,334			173,33 μ M (6,12 %)
SEQ ID NO: 13	>193,118			193,12 μ M (3,81 %)
SEQ ID NO: 41	>218,195			218,2 μ M (1,23 %)
SEQ ID NO: 14	>224,955			224,95 μ M (3,84 %)

Ejemplo 7. Actividad Inmunomoduladora

A partir del patrón de diseño SEQ ID NO:1, se seleccionaron y evaluaron las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 19 por su capacidad para neutralizar la actividad proinflamatoria del lipopolisacárido (LPS) en la inducción de la citocina proinflamatoria TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de un individuo sano.

En resumen, las PBMCs se extrajeron mediante sedimentación en gradiente de densidad con iodixanol, se cultivaron en medio RPMI 1X (suplementado con antibiótico-antimicótico 1X). Se sembraron 250.000 células por pozo en placas de cultivo celular de poliestireno de 96 pocillos. El LPS a 10 ng/mL se mezcló con 15 μ g/mL (aproximadamente 0,5 μ M) de cada péptido, se incubó durante 30 minutos a 37 °C y luego se agregó a las células para una incubación de 18 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Después de este período, se recolectó el sobrenadante y se midieron los niveles de TNF- α utilizando el kit de ensayo HCXTO-MAG-60K, HCYTNFA-MAG (Merck-MILLIPLEX® MAP), en comparación con las células estimuladas solo con LPS y las células tratadas solo con el péptido sin LPS (Figura 8).

Los péptidos, específicamente SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, demostraron una reducción en las concentraciones de TNF- α en las células tratadas con LPS, alcanzando niveles incluso más bajos que los controles, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control de LPS. Esta evidencia indica una actividad inmunomoduladora de los péptidos diseñados, con aplicaciones potenciales en sepsis, infecciones y terapias dirigidas para modular la respuesta inflamatoria.

Ejemplo 8. Actividad Antiparasitaria

A partir del patrón de diseño SEQ ID NO:1, se seleccionaron y evaluaron las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14,

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 para la actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii*.

Ejemplo 8.1. Actividad Antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*

Los péptidos sintetizados se evaluaron por su capacidad tripanocida en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en fase logarítmica de crecimiento (genotipo DTU I) [55]. Los parásitos se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en PBS 1X suplementado con 20 mM de glucosa y se sembraron en placas de 384 pocillos con 1000.000 de parásitos por pocillo y un volumen final de 25 µL. Se mezclaron diluciones seriadas de los péptidos con los parásitos para lograr concentraciones finales de 100 µg/mL a 1,56 µg/mL, junto con controles de nifurtimox a 29 µg/mL (100 µM). La placa se incubó durante 24 horas a 28 °C, se agregó resazurina a una concentración final de 44 µM y se midieron los datos de fluorescencia utilizando un fluorímetro Synergy HTX (Biotek) a longitudes de onda de emisión y excitación de 565/600. El porcentaje de actividad metabólica se calculó en base a estos datos, comparando contra controles de medio de cultivo y parásitos no tratados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Metabólica} = ((X - \text{blanco}) / (\text{control de crecimiento} - \text{blanco})) * 100$$

Se observó que los péptidos SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19 exhibieron un comportamiento similar al reducir la viabilidad celular de *Trypanosoma cruzi* con valores de IC₅₀ de 58 y 34 µM, respectivamente. Los péptidos SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 29 demostraron actividad tripanocida contra epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones aún más bajas en el rango de 4,8 y 8 µM (Figura 9; Tabla 5). Esto se compara con el control antiparasitario Nifurtimox, que mostró un IC₅₀ de 79 µM. Los nuevos péptidos (SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 29) exhiben una actividad tripanolítica 16 y 9 veces más eficiente que el antibiótico aprobado para el tratamiento de esta enfermedad en humanos.

ID	Actividad antiparasitaria sobre epimastigotes de <i>T. cruzi</i>		
	IC ₅₀ µM	95% CI (profile likelihood)	R squared
SEQ ID NO: 15	58,42	44,26 - 94,97	0,9084
SEQ ID NO: 19	34,13	30,52 - 39,41	0,9041
SEQ ID NO: 32	4,819	4,553 - 5,108	0,9919
SEQ ID NO: 29	8,073	7,163 - 9,084	0,9707
Satanin 1	9,025	8,351 - 9,983	0,9869
Nifurtimox	79,16	49,08 - 199,9	0,6365

Tabla 5. Actividad Antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*

Ejemplo 8.2. Actividad antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii*

Para evaluar la actividad antiparasitaria de los péptidos contra *Toxoplasma gondii*, se cultivaron taquizoítos RH GFP+ en células THP1 cultivadas en medio RPMI 1640 Gibco 1X (ref 11875-093), suplementado con piruvato de sodio 1 mM, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, glucosa 2,5 g/L, FBS 2%, Antibiótico/Antimicótico 1X (15240-062 GIBCO) y L-Glutamina 2 mM. Se tomaron aproximadamente 500.000-600.000 células/mL e infectaron a una relación de infectividad de 5:1. Las células se dejaron crecer durante 6 días a 37°C, 5% de CO₂, y los taquizoítos se recogieron del sobrenadante por centrifugación a 500 rpm durante 5 minutos y 1800 rpm durante 15 minutos. Luego, los taquizoítos se re-suspendieron en DMEM sin rojo de fenol, suplementado con Penicilina/Estreptomicina 1X. Los taquizoítos se contaron con un hemocitómetro y se ajustaron a una concentración final de 50.000 parásitos por pocillo en un volumen final de 25 µL.

Estos se mezclaron en una placa de polipropileno de 384 pocillos con diluciones seriadas de péptidos para concentraciones finales que van desde 100 µg/mL hasta 1,56 µg/mL. La pirimetamina, un antibiótico, se utilizó como control en diluciones seriadas que van desde una concentración final de 50 µM hasta 6,25 µM. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, se agregó resazurina a una concentración final de 44 µM y se permitió incubar durante 5 horas adicionales. Después de esto, se leyeron los datos de fluorescencia utilizando un fluorímetro Synergy HTX (Biotek) a longitudes de onda de emisión y excitación de 565/600. A partir de estos datos, se calculó el porcentaje de actividad metabólica comparando con los controles de medio y parásitos no tratados, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Metabólica} = ((X - \text{blanco}) / (\text{control de crecimiento} - \text{blanco})) * 100$$

Se observó que los péptidos SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 29 demostraron actividad antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii* con valores de IC₅₀ superiores a la pirimetamina antiparasitaria (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad Antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii*

ID	Actividad antiparasitaria sobre <i>T. gondii</i>		
	IC ₅₀ µM	95% CI (profile likelihood)	R squared
SEQ ID NO: 32	32,43	26,89 to 42,32	0,8733

SEQ ID NO: 29	30,27	27,72 to 33,52	0,971
Satanin1	22,61	16,17 to 40,55	0,6113
Pirimetamin	65,00	53,26 to 91,15	0,8485

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] H.-K. Kang, C. Kim, C. H. Seo, y Y. Park, «The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review.», *J. Microbiol. Seoul Korea*, vol. 55, n.º 1, pp. 1-12, ene. 2017, doi: 10.1007/s12275-017-6452-1.
- [2] Awatef Ouertani, Amor Mosbah, y Ameer Cherif, «Anti-Microbial Peptides: The Importance of Structure-Function Analysis in the Design of New AMPs», en *Insights on Antimicrobial Peptides*, Shymaa Enany, Jorge Masso-Silva, y Anna Savitskaya, Eds., Rijeka: IntechOpen, 2022, p. Ch. 2. doi: 10.5772/intechopen.99801.
- [3] F. Jiang *et al.*, «N-terminal signal peptides facilitate the engineering of PVC complex as a potent protein delivery system.», *Sci. Adv.*, vol. 8, n.º 17, p. eabm2343, abr. 2022, doi: 10.1126/sciadv.abm2343.
- [4] W. Kamysz, A. Krollicka, K. Bogucka, T. Ossowski, J. Lukasiak, y E. Lojkowska, «Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Against Plant Pathogenic *Pectobacterium* Species», *J. Phytopathol.*, vol. 153, pp. 313-317, jun. 2005, doi: 10.1111/j.1439-0434.2005.00976.x.
- [5] A. A. Bahar y D. Ren, «Antimicrobial peptides.», *Pharm. Basel Switz.*, vol. 6, n.º 12, pp. 1543-1575, nov. 2013, doi: 10.3390/ph6121543.
- [6] P. Bulet, C. Hetru, J. L. Dimarcq, y D. Hoffmann, «Antimicrobial peptides in insects; structure and function.», *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 23, n.º 4-5, pp. 329-344, jul. 1999, doi: 10.1016/s0145-305x(99)00015-4.
- [7] R. I. Lehrer y T. Ganz, «Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence.», *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 11, n.º 1, pp. 23-27, feb. 1999, doi: 10.1016/s0952-7915(99)80005-3.
- [8] A. Nascimento, W. Fontes, A. Sebben, y M. S. Castro, «Antimicrobial Peptides from Anurans Skin Secretions», *Protein Pept. Lett.*, vol. 10, pp. 227-38, jul. 2003, doi: 10.2174/0929866033478933.
- [9] B. Bechinger y S.-U. Gorr, «Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance.», *J. Dent. Res.*, vol. 96, n.º 3, pp. 254-260, mar. 2017, doi: 10.1177/0022034516679973.
- [10] Y. Rosenfeld, N. Papo, y Y. Shai, «Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action.», *J. Biol. Chem.*, vol. 281, n.º 3, pp. 1636-1643, ene. 2006, doi: 10.1074/jbc.M504327200.
- [11] R. Spohn *et al.*, «Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance», *Nat. Commun.*, vol. 10, n.º 1, p. 4538, oct. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-12364-6.
- [12] A.-S. Brunel y B. Guery, «Multidrug resistant (or antimicrobial-resistant) pathogens - alternatives to new antibiotics?», *Swiss Med. Wkly.*, vol. 147, p. w14553, 2017, doi: 10.4414/sm.w.2017.14553.
- [13] H. G. Boman, «Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.», *J. Intern. Med.*, vol. 254, n.º 3, pp. 197-215, sep. 2003, doi: 10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x.
- [14] H.-Y. Yi, M. Chowdhury, Y.-D. Huang, y X.-Q. Yu, «Insect antimicrobial peptides and

- their applications.», *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 98, n.º 13, pp. 5807-5822, jul. 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5792-6.
- [15] M. Ntwasa, A. Goto, y S. Kurata, «Coleopteran Antimicrobial Peptides: Prospects for Clinical Applications», *Int. J. Microbiol.*, vol. 2012, pp. 1-8, 2012, doi: 10.1155/2012/101989.
- [16] Á. M. Casanova-Torres y H. Goodrich-Blair, «Immune Signaling and Antimicrobial Peptide Expression in Lepidoptera.», *Insects*, vol. 4, n.º 3, pp. 320-338, sep. 2013, doi: 10.3390/insects4030320.
- [17] M. Kloor *et al.*, «A Frameshift Peptide Neoantigen-Based Vaccine for Mismatch Repair-Deficient Cancers: A Phase I/IIa Clinical Trial.», *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 26, n.º 17, pp. 4503-4510, sep. 2020, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3517.
- [18] H. G. Boman, «Antibacterial peptides: Key components needed in immunity», *Cell*, vol. 65, n.º 2, pp. 205-207, abr. 1991, doi: 10.1016/0092-8674(91)90154-Q.
- [19] G. A. Téllez Ramirez *et al.*, «New Insect Host Defense Peptides (HDP) From Dung Beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Transcriptomes», *J. Insect Sci.*, vol. 21, n.º 4, p. 12, jul. 2021, doi: 10.1093/jisesa/ieab054.
- [20] F. Ramos-Martín, C. Herrera-León, V. Antonietti, P. Sonnet, C. Sarazin, y N. D'Amelio, «The potential of antifungal peptide Sesquin as natural food preservative.», *Biochimie*, vol. 203, pp. 51-64, dic. 2022, doi: 10.1016/j.biochi.2022.03.015.
- [21] A. L. Carboni, M. A. Hanson, S. A. Lindsay, S. A. Wasserman, y B. Lemaitre, «Cecropins contribute to *Drosophila* host defense against a subset of fungal and Gram-negative bacterial infection.», *Genetics*, vol. 220, n.º 1, ene. 2022, doi: 10.1093/genetics/iyab188.
- [22] L. Silvestro y P. H. Axelsen, «Membrane-induced folding of cecropin A.», *Biophys. J.*, vol. 79, n.º 3, pp. 1465-1477, sep. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76398-3.
- [23] J. Lee, C. H. Seo, T. Luchian, y Y. Park, «Antimicrobial Peptide CMA3 Derived from the CA-MA Hybrid Peptide: Antibacterial and Anti-inflammatory Activities with Low Cytotoxicity and Mechanism of Action in *Escherichia coli*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, n.º 1, pp. 495-506, ene. 2016, doi: 10.1128/AAC.01998-15.
- [24] G. Dalhammar y H. Steiner, «Characterization of inhibitor A, a protease from *Bacillus thuringiensis* which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects.», *Eur. J. Biochem.*, vol. 139, n.º 2, pp. 247-252, mar. 1984, doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08000.x.
- [25] C. Cultid, C. Medina, L. Constantino, B. Martinez, y A. Escobar, *Escarabajos coprófagos (Scarabaeinae) del eje cafetero: Guía para el estudio ecológico (Field Guide)*. 2012. doi: 10.13140/RG.2.1.1013.9049.
- [26] D. C. Henao Arias *et al.*, «Novel antimicrobial cecropins derived from *O. curvicornis* and *D. satanas* dung beetles.», *Peptides*, vol. 145, p. 170626, nov. 2021, doi: 10.1016/j.peptides.2021.170626.
- [27] N. Izumiya y M. Muraoka, «Racemization test in peptide synthesis», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 91, n.º 9, pp. 2391-2392, abr. 1969, doi: 10.1021/ja01037a045.
- [28] J. Bradshaw, «Cationic antimicrobial peptides : issues for potential clinical use.», *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.*, vol. 17, n.º 4, pp. 233-240, 2003, doi: 10.2165/00063030-200317040-00002.
- [29] H. Ulvatne, «Antimicrobial peptides: potential use in skin infections.», *Am. J. Clin. Dermatol.*, vol. 4, n.º 9, pp. 591-595, 2003, doi: 10.2165/00128071-200304090-00001.
- [30] I. Greco *et al.*, «Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides», *Sci. Rep.*, vol. 10, n.º 1, p. 13206, ago. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-69995-9.
- [31] L. Gentilucci, R. De Marco, y L. Cerisoli, «Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization.», *Curr. Pharm. Des.*, vol. 16, n.º 28, pp. 3185-3203, 2010, doi: 10.2174/138161210793292555.
- [32] B. Gao y S. Zhu, «Mesobuthus Venom-Derived Antimicrobial Peptides Possess

- Intrinsic Multifunctionality and Differential Potential as Drugs», *Front. Microbiol.*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00320.
- [33] Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, y H. Yi, «Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields.», *Front. Microbiol.*, vol. 11, p. 582779, 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.
- [34] M. D. T. Torres, S. Sothiselvam, T. K. Lu, y C. de la Fuente-Nunez, «Peptide Design Principles for Antimicrobial Applications.», *J. Mol. Biol.*, vol. 431, n.º 18, pp. 3547-3567, ago. 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2018.12.015.
- [35] P. Cardoso *et al.*, «Scientists' warning to humanity on insect extinctions», *Biol. Conserv.*, vol. 242, p. 108426, feb. 2020, doi: 10.1016/j.biocon.2020.108426.
- [36] R. M. Epand y H. J. Vogel, «Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action.», *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1462, n.º 1-2, pp. 11-28, dic. 1999, doi: 10.1016/s0005-2736(99)00198-4.
- [37] M. D'Hondt *et al.*, «Related impurities in peptide medicines.», *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 101, pp. 2-30, dic. 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.06.012.
- [38] B. Mendes, C. Proaño-Bolaños, F. R. Gadelha, J. R. Almeida, y D. C. Miguel, «Cruzioseptins, antibacterial peptides from *Cruziophyla calcarifer* skin, as promising leishmanicidal agents.», *Pathog. Dis.*, vol. 78, n.º 6, p. ftaa053, sep. 2020, doi: 10.1093/femspd/ftaa053.
- [39] Y. Hao, N. Yang, D. Teng, X. Wang, R. Mao, y J. Wang, «A review of the design and modification of lactoferricins and their derivatives.», *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.*, vol. 31, n.º 3, pp. 331-341, jun. 2018, doi: 10.1007/s10534-018-0086-6.
- [40] T. Yacoub, M. Rima, M. Karam, J. Sabatier, y Z. Fajloun, «Antimicrobials From Venomous Animals: An Overview», *Molecules*, 2020, doi: 10.3390/molecules25102402.
- [41] S. André *et al.*, «Functional Characterization of Temporin-SHe, a New Broad-Spectrum Antibacterial and Leishmanicidal Temporin-Sh Paralog From the Sahara Frog (*Pelophylax Saharicus*)», *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, doi: 10.3390/ijms21186713.
- [42] M. Jiang *et al.*, «I2APP: A Two-Step Machine Learning Framework for Antiparasitic Peptides Identification», *Front. Genet.*, 2022, doi: 10.3389/fgene.2022.884589.
- [43] H. Zhang *et al.*, «Design, Synthesis, and Optimization of Macrocyclic Peptides as Species-Selective Antimalaria Proteasome Inhibitors», *J. Med. Chem.*, 2022, doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00611.
- [44] H. Jenssen, P. Hamill, y R. E. W. Hancock, «Peptide antimicrobial agents.», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 19, n.º 3, pp. 491-511, jul. 2006, doi: 10.1128/CMR.00056-05.
- [45] A. F. Lacerda, P. B. Pelegrini, D. M. de Oliveira, É. A. R. Vasconcelos, y M. F. Grossi-de-Sá, «Anti-parasitic Peptides from Arthropods and their Application in Drug Therapy.», *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 91, 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.00091.
- [46] L. Lama *et al.*, «Development of human cGAS-specific small-molecule inhibitors for repression of dsDNA-triggered interferon expression.», *Nat. Commun.*, vol. 10, n.º 1, p. 2261, may 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08620-4.
- [47] C. Junqueira *et al.*, « $\gamma\delta$ T Cells Suppress Plasmodium Falciparum Blood-Stage Infection by Direct Killing and Phagocytosis», *Nat. Immunol.*, 2021, doi: 10.1038/s41590-020-00847-4.
- [48] R. J. Lundie *et al.*, «Blood-Stage Plasmodium Infection Induces CD8 + T Lymphocytes to Parasite-Expressed Antigens, Largely Regulated by CD8 α + Dendritic Cells», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2008, doi: 10.1073/pnas.0806727105.
- [49] C. Castillo *et al.*, «Host-Parasite Interaction: Changes in Human Placental Gene Expression Induced by *Trypanosoma Cruzi*», *Parasit. Vectors*, 2018, doi: 10.1186/s13071-018-2988-0.
- [50] F. Mei *et al.*, «Collagen Peptides Isolated From Salmo Salar and Tilapia Nilotica Skin Accelerate Wound Healing by Altering Cutaneous Microbiome Colonization via Upregulated NOD2 and BD14», *J. Agric. Food Chem.*, 2020, doi: 10.1021/acs.jafc.9b08002.

- [51] E. Ruoslahti, «Tumor penetrating peptides for improved drug delivery.», *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 110-111, pp. 3-12, feb. 2017, doi: 10.1016/j.addr.2016.03.008.
- [52] L. Roth *et al.*, «Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide.», *Oncogene*, vol. 31, n.º 33, pp. 3754-3763, ago. 2012, doi: 10.1038/onc.2011.537.
- [53] D. Nobuoka *et al.*, «Intratumoral peptide injection enhances tumor cell antigenicity recognized by cytotoxic T lymphocytes: a potential option for improvement in antigen-specific cancer immunotherapy.», *Cancer Immunol. Immunother. CII*, vol. 62, n.º 4, pp. 639-652, abr. 2013, doi: 10.1007/s00262-012-1366-6.
- [54] I. Wiegand, K. Hilpert, y R. E. W. Hancock, «Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances», *Nat. Protoc.*, vol. 3, n.º 2, pp. 163-175, feb. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.
- [55] C. Hernández *et al.*, «Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units.», *Parasit. Vectors*, vol. 9, n.º 1, p. 620, dic. 2016, doi: 10.1186/s13071-016-1907-5.

8. LISTADO DE SECUENCIAS

```
<ST26SequenceListing      dtdVersion="V1_3"      fileName="peptidos.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-
11-07">
  <ApplicantFileReference>7473247</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>CO</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>7473247</ApplicationNumberText>
    <FilingDate/>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="es">Universidad del Quindio</ApplicantName>
  <InventorName      languageCode="es">Germán      Alberto      Téllez
Ramírez</InventorName>
  <InventorNameLatin>German Alberto Tellez Ramirez</InventorNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="en">NEWLY      DESIGNED      PEPTIDES      WITH
ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGAL, ANTIPARASITIC, ANTITUMORAL, HEALING, AND
IMMUNOMODULATORY CHARACTERISTICS</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>41</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            <INSDQualifier id="q2">
              <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier id="q5">
              <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>equal      to      =Arg      OR      Lys      OR
Gly</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>4</INSDFeature_location>
```

```

<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier id="q6">
    <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>equal to =Arg OR Lys</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>8</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q7">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>equal to =Phe OR Ile</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>9</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>equal to =Glu OR Leu OR
      Lys</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>15</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q9">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>equal to =Ile OR Val</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>17</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q10">
      <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>equal to =GL OR Lys OR
      Leu</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>18</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>

```

```

        <INSDQualifier id="q11">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>equal to =His OR Lys</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>MUTAGEN</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>21</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier id="q12">
          <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>equal to =Glu OR Leu OR
            Lys</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>XSKXWRKXXKRVKKXFXXTKXAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKVFEHTKEA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

```

```

    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q16">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>RSKKWRKIEKRVKKIFEKTKEA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q18">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="5">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q20">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q22">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q24">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

        </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEKFKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q26">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEA</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q28">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>KSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>

```

```

</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEA</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEKTKEAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>22</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..22</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKEA</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>20</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..20</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>17</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..17</INSDFeature_location>

```

```

    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q38">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFE</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q40">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKLAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>

```

```

        <INSDQualifier id="q42">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKLAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q46">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFEHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

        </INSDFeature>
    </INSDSeg_feature-table>
    <INSDSeg_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKKAK</INSDSeg_sequence>
</INSDSeg>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
    <INSDSeg>
        <INSDSeg_length>23</INSDSeg_length>
        <INSDSeg_moltype>AA</INSDSeg_moltype>
        <INSDSeg_division>PAT</INSDSeg_division>
        <INSDSeg_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q48">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeg_feature-table>
        <INSDSeg_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKLAK</INSDSeg_sequence>
    </INSDSeg>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
    <INSDSeg>
        <INSDSeg_length>23</INSDSeg_length>
        <INSDSeg_moltype>AA</INSDSeg_moltype>
        <INSDSeg_division>PAT</INSDSeg_division>
        <INSDSeg_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q50">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeg_feature-table>
        <INSDSeg_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKLAK</INSDSeg_sequence>
    </INSDSeg>
</SequenceData>

```

```

<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKLAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="22">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q56">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKEAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="23">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q58">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFKHTKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKEAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>

```

```

        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q62">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKKIFLHTKKAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q64">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKLAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q66">

```

```

        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q68">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKLAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q70">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKLAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="30">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="31">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q74">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFEHTKLAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="32">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q76">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFLHTKLAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="33">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q78">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="34">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>

```

```

<INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
      <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q80">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFEHTKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q82">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKKAK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="36">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>

```

```

        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier id="q84">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKKAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="37">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q86">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFKHKKAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="38">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q88">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFLKRVKKIFKHTKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="39">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q90">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>
        <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFLHTKEAK</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="40">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>
                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
                <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_qual>
                    <INSDQualifier>
                        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier id="q92">
                        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
                        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
                    </INSDQualifier>
                </INSDFeature_qual>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

```

```
<INSDSeq_sequence>GSKRWRKFKKRVKKIFKHTKEAK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="41">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>14</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..14</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q94">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSKRWRKFEKRVKK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```