



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014031582-9 A2

(22) Data do Depósito: 17/12/2014

(43) Data da Publicação: 19/07/2016



(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (P-BTHTX-I)₂, PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (P-BTHTX-I)₂ E SEU USO COMO ANTIMICROBIANO

(51) Int. Cl.: C07K 14/435; C07K 1/06; A61K 38/17; A61P 31/04

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) Inventor(es): EDUARDO MAFFUD CILLI, MATHEUS APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, NORIVAL ALVES SANTOS FILHO, ESTEBAN NICOLÁS LORENZÓN, TAÍS MARIA BAUAB

(74) Procurador(es): FABIOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂, PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂ E SEU USO COMO ANTIMICROBIANO. Esta invenção descreve o processo de obtenção de peptídeos antibacterianos pela dimerização do peptídeo p-BthTX-I que, por sua vez, é derivado da região C-terminal da Lys49 PLA2s homóloga bothropstoxina I (BthTX-1). Os peptídeos diméricos propostos apresentam uma capacidade de inibição do crescimento antimicrobiano maior do que a sua forma monomérica. Ainda, a presente invenção provê ao uso dos dímeros como agentes antimicrobianos.



**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂,
PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂ E SEU USO COMO
ANTIMICROBIANO**

Campo da invenção:

[001] Esta invenção descreve o processo de obtenção de peptídeos antibacterianos pela dimerização do peptídeo p-BthTX-I que, por sua vez, é derivado da região C-terminal da Lys49 PLA₂s homóloga bothropstoxina I (BthTX-1).

[002] Os peptídeos antibacterianos são a forma dimérica do peptídeo p-BthTX-I e apresentam a capacidade de inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[003] Ainda, a presente invenção provê a dimerização do peptídeo obtido pela oxidação dos resíduos de cisteína ou pelas extremidades C-terminal ou N-terminal ou ponte lactâmica, bem como seu uso tópico ou sistêmico como agente antimicrobiano.

Fundamentos da invenção:

[004] Peçonhas e venenos animais constituem uma vasta fonte de moléculas bioativas, as quais, de forma eficiente, interferem nos processos fisiológicos essenciais da presa.

[005] Devido à sua toxicidade e os efeitos biológicos gerais, esses recursos naturais têm, há muito, atraído o interesse científico.

[006] Aproximadamente 90% do peso seco das peçonhas de serpente são constituídos por proteínas, compreendendo uma variedade de enzimas, tais como fosfolipases A₂, proteases, L-aminoácido oxidases e hialuronidases, dentre outras.

[007] As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídeos e apresentam um importante papel em várias funções celulares, incluindo manutenção dos

fosfolipídeos celulares, geração de prostaglandinas (PG) e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular. Além disso, sabe-se que estas enzimas estão envolvidas em processos inflamatórios humanos.

[008] As PLA₂s de peçonhas de serpentes (svPLA₂s) fazem parte do grupo das PLA₂s secretadas. Essas foram divididas em subgrupos, dos quais se destacam:

(i) PLA₂s Asp49, enzimas que usualmente apresentam alta atividade catalítica, e

(ii) PLA₂s homólogas (ou PLA₂s símile, do inglês *PLA₂-like*), mais especificamente as PLA₂s Lys49, as quais não possuem atividade enzimática.

[009] Apesar de não apresentarem atividade catalítica, as PLA₂s Lys49 apresentam uma atividade tóxica, tais como miotoxicidade, citotoxicidade, atividade bactericida e fungicida, dentre outras.

[010] Um exemplo dessa classe de macromoléculas é a bothropstoxina I (BthTX-I), a principal PLA₂ Lys49 oriunda da peçonha da serpente *B. jararacussu*.

[011] Estudos mostraram o efeito microbicida da BthTX-I, o qual aumentou a permeabilidade da membrana de alguns microrganismos. A ação microbicida das toxinas Lys49 pode evitar infecções nas glândulas veneníferas das serpentes ou controlar a decomposição da presa pelos microrganismos, sendo essas adaptações vantajosas para as serpentes.

[012] Em busca de elucidar qual a região dessas PLA₂ Lys49 seria a responsável pela atividade tóxica dessas moléculas, já que elas não possuem atividade catalítica, segmentos foram sintetizados e analisados.

[013] Assim, foi demonstrado que um sítio de ligação de

heparina, na porção C-terminal dessas proteínas (região correspondente entre os resíduos de aminoácidos 115-129), poderia ser o responsável por essa toxicidade.

[014] Apesar da variabilidade evidenciada na região C-terminal das PLA₂ Lys49, um elevado número de aminoácidos catiônicos, hidrofóbicos e aromáticos podem ser observados, proporcionando um caráter anfifílico, comumente encontrado em muitos tipos de peptídeos e proteínas com propriedades antimicrobianas.

[015] As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte no mundo, especialmente nos países menos desenvolvidos.

[016] Além disso, é flagrante o aumento da resistência de várias linhagens de microrganismos em relação aos medicamentos usualmente administrados, o que salienta a importância da busca por novos compostos microbicidas.

[017] Neste contexto, o estudo de moléculas baseadas em fontes naturais, pode gerar novos peptídeos ativos com aplicações na clínica médica e na indústria biotecnológica.

[018] Assim, a presente invenção descreve o processo de obtenção de peptídeos sintéticos diméricos, denominados (p-BthTX-I)₂, o qual são derivados do peptídeo p-BthTX-I, pela oxidação do resíduo de cisteína e seu uso tópico ou sistêmico na inibição do crescimento de microrganismos, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[019] A dimerização dos peptídeos propostos é obtida pela oxidação dos resíduos de cisteína ou pelas extremidades C-terminal ou N-terminal ou ponte lactâmica.

Estado da técnica:

[020] Alguns documentos do estado da técnica descrevem

diferentes peptídeos obtidos a partir de serpentes.

[021] O documento de anterioridade CN102311492 descreve as sequências do peptídeo antibacteriano catelicidina, o qual é isolado a partir do veneno de cobra (sem especificá-la) e apresenta atividades antibacteriana e antifúngica comprovadas, em especial sobre bactérias resistentes a drogas clínicas. Ainda, o peptídeo é denominado como "aminoácido tipo D totalmente não natural".

[022] Em DE102004008417, são descritos peptídeos com ação anticâncer (atuando no fígado, no cólon e nos rins) e antibacteriana obtidos a partir do veneno da *Crotalus durissus durissus*.

[023] No estudo descrito em "*Characterization of an antibacterial peptide from indian cobra (Naja naja) venom*", são descritos peptídeos antibacterianos obtidos a partir de cobras Naja. Os peptídeos purificados mostraram uma potente atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas (como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*) e bactérias Gram-positivas (como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus subtilis*).

[024] Nos artigos "*Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from Bothrops jararaca venom*" e "*Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente Bothrops jararaca*" são descritos processo de isolamento e processos de caracterização de peptídeos oriundos do veneno da jararaca, porém, os peptídeos da presente invenção não são abordados.

[025] Nos artigos "*Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms*" (Lomonte et al., 2003) e "*Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region*" (Gebrim et al., 2009), o peptídeo p-BthTX-I foi sintetizado. Contudo, a forma dimérica não é citada e não foram realizados estudos das atividades antimicrobianas desse peptídeo.

[026] Em vista desses documentos, a matéria desta invenção é considerada nova e inventiva.

Breve descrição da invenção:

[027] Esta invenção descreve o processo de obtenção de peptídeos antibacterianos diméricos (p-BthTX-I)₂ a partir do peptídeo p-BthTX-I, bem como os referidos peptídeos e o seu uso tópico ou sistêmico como antimicrobianos.

Breve descrição das figuras:

[028] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[029] A Figura 1A representa a estrutura terciária da PLA₂ homóloga BthTX-I.

[030] A Figura 1B representa o detalhamento da região C-terminal da BthTX-I, correspondente entre os resíduos de aminoácidos 115-129.

[031] A Figura 1C representa a dimerização de p-BthTX-I por meio da oxidação dos resíduos de cisteína.

[032] A Figura 2A representa graficamente o perfil cromatográfico do peptídeo (p-BthTX-I)₂ e a figura 2B é o espectro de massas do mesmo peptídeo.

[033] A Figura 3A representa graficamente os perfis cromatográficos dos peptídeos p-BthTX-I bruto e após purificação e a Figura 3B é o espectro de massas dos peptídeos p-BthTX-I após a purificação.

Descrição detalhada da invenção:

[034] As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte no mundo. Ainda, a resistência microbiana em relação aos medicamentos usualmente administrados é uma realidade, a qual torna necessária uma busca por novas alternativas de compostos ativos contra microrganismos.

[035] Assim, a presente invenção provê o processo de obtenção de peptídeos antibacterianos (p-BthTX-I)₂, os quais são baseados na sequência da região c-terminal da Lys49 PLA₂s homóloga bothropstoxina I (BthTX-1) e seu uso como antibacteriano.

[036] A síntese do peptídeo monomérico p-BthTX-I foi realizada em fase sólida (SPFS), utilizando o protocolo da química fluorenilmetiloxicarboxil (Fmoc). Este método baseia-se no crescimento da cadeia peptídica, através do acoplamento dos aminoácidos na sequência desejada, a partir da sua região C-terminal. O acoplamento dos aminoácidos é realizado em um suporte polimérico, o qual deve ser permeável e facilmente solvatado pelos solventes selecionados.

[037] O suporte polimérico utilizado neste processo é selecionado dentre qualquer resina utilizada para síntese de peptídeos em fase sólida, preferencialmente, a resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang, com grau de substituição entre 0,4-0,8 mmol/g.

[038] Os solventes são selecionados dentre os solventes

utilizados para síntese de peptídeos em fase sólida, preferencialmente dimetilformamida, diclorometano, N-metilmorfolina e dimetilsulfóxido.

[039] O peptídeo é sintetizado a partir da região C-terminal da BthTX-I e apresenta a sequência KKYRYHLKPFCKK, representada pela SEQ. ID. n° 1.

[040] O peptídeo, obtido em sua forma monomérica, foi, posteriormente, dimerizado por meio da oxidação dos dois resíduos de cisteína da cadeia peptídica, obtendo-se o dímero KKYRYHLKPFCKKKKYRYHLKPFCKK, conforme mostrado na SEQ. ID. n° 5.

[041] Quando a dimerização ocorre pela extremidade C-terminal através da utilização do aminoácido Lisina (Lys) com o grupo protetor Fmoc na cadeia lateral, obtém-se o dímero KKYRYHLKPFCKK(α)K(ϵ)KKCFPKLHYRYKK, conforme mostrado na SEQ. ID. n° 2.

[042] A dimerização pode também ser pela extremidade N-terminal utilizando ácido glutâmico, sem grupo protetor na cadeia lateral. Assim, obtém-se o dímero representado por KKCFPKLHYRYKK(α)E(δ)KKYRYHLKPFCKK (mostrado na SEQ. ID. n° 3).

[043] Ainda, a dimerização pode ocorrer por ponte lactâmica, cuja sequência é KKYRYHLKPFCKKKKYRYHLKPFCKK, em que a dimerização ocorre entre os resíduos E(11) e K(24) (mostrado na SEQ. ID. n° 4).

[044] Os dímeros apresentam vantagens farmacotécnicas frente aos monômeros, como maior atividade antimicrobiana, aumento da solubilidade e resistência frente a proteases.

[045] Tanto o peptídeo sintético quanto os seus dímeros possuem atividade específica sobre bactérias (tanto Gram

positivas quanto Gram negativas), não mostrando atividade contra leveduras e nem toxicidade contra eritrócitos. Mais especificamente, os peptídeos propostos são capazes de inibir o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

[046] Para a *Escherichia coli* observou-se um MIC de 16 e 4 $\mu\text{mol/L}$ para o monômero e o dímero, respectivamente, e para o *Staphylococcus aureus*, observou-se um MIC de 64 e 32 $\mu\text{mol/L}$ para o monômero e dímero, respectivamente.

[047] Ainda, os peptídeos antimicrobianos da presente invenção (monômero e dímeros) apresentam a vantagem de não gerar resistência bacteriana, devido aos seus mecanismos de ação.

[048] Em vista disso, os peptídeos podem ser utilizados como princípio ativo de formulações de uso tópico ou sistêmico para o tratamento de infecções causadas por bactérias, associados ou não a outros antibióticos, bem como formulações odontológicas para a prevenção da cárie.

[049] Ainda, os peptídeos podem ser utilizados como conservante de alimentos ou utilitários médicos, na forma de imersão ou incorporados na embalagem.

Testes realizados:

- Atividade antimicrobiana

[050] A atividade antimicrobiana foi avaliada em termos de concentração inibitória mínima (MIC), utilizando o método de microdiluição em placa.

[051] Para a determinação da MIC, bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram incubadas com diluição seriada do peptídeo em microplacas esterilizadas de 96 poços em um volume final de 100 μL ,

compostos de 50 µL da cultura bacteriana e 50 µL de peptídeo dissolvido em água.

[052] A quantidade inicial de bactéria foi de 1×10^7 UFC/mL, aproximadamente. Como controle da ausência de proliferação bacteriana, ampicilina foi incubada com a suspensão bacteriana. Controles de meio de cultura (Muller-Hinton) e do solvente (água) também foram realizados.

[053] A inibição do crescimento foi determinada visualmente com ajuda de resazurina, após incubação por 24 h a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata.

- *Atividade hemolítica:*

[054] A atividade hemolítica foi avaliada em termos de concentração hemolítica 50 (HC₅₀, ou seja, concentração de peptídeo que produz 50% de hemólise), utilizando o método de microdiluição em placa.

[055] Hemácias de sangue humano foram separadas do plasma por centrifugação e lavadas 3 vezes com tampão PBS. Uma suspensão celular a 2 % (v/v) e diluições seriadas dos peptídeos foram usadas (100 µL da solução diluída do peptídeo para 100 µL da suspensão celular).

[056] Depois da incubação a 37 °C por 1 h, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram pipetadas em microplacas de 96 poços. A absorbância a 405 nm foi determinada usando um leitor de microplaca.

[057] O valor de 100% de hemólise foi determinado utilizando 100 µL da suspensão celular misturada com 100 µL de Triton X-100 1% (v/v), enquanto que o valor de 0% de hemólise foi obtido utilizando 100 µL da suspensão celular com 100 µL de tampão PBS. O valor de HC₅₀ foi determinado

seguinte equação:

$$\% \text{ Hemólise} = 100 \times [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) / (Abs_{triton} - Abs_{branco})]$$

[058] O ensaio foi realizado em duplicata.

Resultados:

[059] Após a síntese, os peptídeos foram purificados e caracterizados (conforme mostram as Figuras 2A, 2B, 3A e 3B). Posteriormente, foi realizada a dimerização através da oxidação dos resíduos de cisteína, obtendo-se (p-BthTX-I)₂.

[060] A técnica de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI) também foi utilizada para a caracterização. Nestas análises, foram confirmadas as massas moleculares dos peptídeos p-BthTX-I e (p-BthTX-I)₂, o qual apresentaram valores de 1739,1 Da e 3476,2 Da, respectivamente.

[061] Como mostrado na Tabela 1 abaixo, observa-se que os peptídeos foram obtidos com elevado grau de pureza (acima de 98%), em alto rendimento e as identidades destas moléculas foram confirmadas por espectrometria de massa com ionização por electrospray.

Tabela 1: Dados da síntese e purificação dos peptídeos

Peptídeo	Sequência	Massa (Da)
p-BthTX-I	(H ₃ N ⁺)KKYRYHLKPFCKK(COO ⁻)	1739,1
(p-BthTX-I)₂	[(H ₃ N ⁺)KKYRYHLKPFCKK(COO ⁻)] ₂	3476,2

[062] A atividade antimicrobiana dos peptídeos em relação às bactérias Gram negativas (*E. coli*), Gram positivas (*S. aureus*) e à *Candida albicans* foi avaliada.

[063] O monômero e o dímero apresentaram alta atividade antibacteriana, sendo que o dímero se mostrou mais ativo que o monômero.

[064] Nenhum dos peptídeos apresentou atividade contra *C. albicans* e atividade hemolítica (vide Tabela 2).

Tabela 2: Atividades biológicas dos peptídeos sintéticos

Cepas	MIC ($\mu\text{mol/L}$)	
	p-BthTX-I	(p-BthTX-I) ₂
<i>E. coli</i>	16	4
<i>S. aureus</i>	64	32
<i>C. albicans</i>	> 128	> 128
HC ₅₀	> 128	> 128
GM*	40	18
TI**	12,8	28,4

[065] Em que:

HC₅₀: valor obtido como a média da concentração de peptídeo que produz 50% de hemólise;

GM: médias geométricas dos valores da MIC;

*GM: foi calculada apenas com base na MIC da atividade dos peptídeos sobre as linhagens bacterianas;

TI: índice terapêutico, calculado como a relação da HC₅₀ sobre o GM.

**Como as amostras não apresentaram hemólise, foi utilizado o valor 256 $\mu\text{mol/L}$ para este cálculo.

[066] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de peptídeos diméricos (p-BthTX-I)₂ **caracterizado** pelo fato da síntese ser realizada em fase sólida usando o fluorenilmetiloxycarboxil (Fmoc) e a dimerização ser realizada por oxidação.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na síntese, os aminoácidos serem acoplados em um suporte polimérico permeável e solvatado por solventes.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de o suporte polimérico ser uma resina utilizada para síntese de peptídeos em fase sólida, preferencialmente, a resina Fmoc-Lys(Boc)-Wang com grau de substituição entre 0,4-0,8 mmol/g.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de os solventes serem selecionados dentre dimetilformamida, diclorometano, N-metilmorfolina e dimetilsulfóxido.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de, na dimerização, os dois resíduos de cisteína da cadeia peptídica serem oxidados.

5. Peptídeos diméricos (p-BthTX-I)₂ **caracterizados** por serem baseados na sequência da região c-terminal da Lys49 PLA₂s homóloga bothropstoxina I (BthTX-1) e apresentarem as sequências de aminoácidos conforme descritas nas SEQ. ID. n° 2, 3 ou 4.

6. Peptídeos, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** por apresentarem atividade específica sobre bactérias Gram positivas e negativas, mais especificamente, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

7. Peptídeos, de acordo com a reivindicação 5 ou 6, **caracterizado** por não apresentarem atividade contra leveduras e nem toxicidade contra eritrócitos.

8. Uso dos peptídeos dimericos (p-BthTX-I)₂ **caracterizado** por serem no preparo de formulações de uso tópico ou sistêmico para o tratamento de infecções causadas por bactérias, associados ou não a outros antibióticos, bem como formulações odontológicas para a prevenção da cárie.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** por ainda ser como conservante de alimentos ou utilitários médicos, na forma de imersão ou incorporados na embalagem.

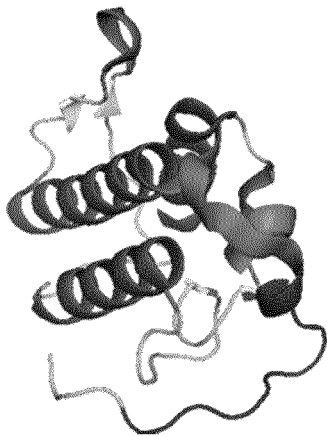


FIGURA 1A

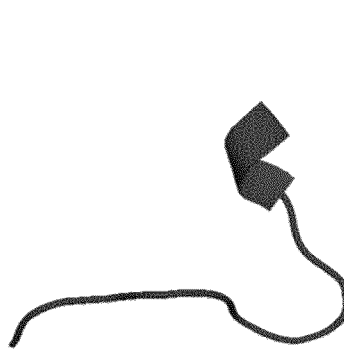


FIGURA 1B

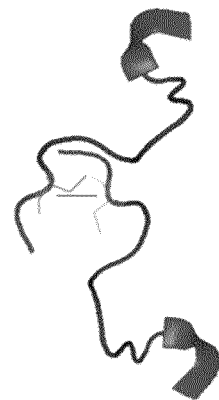


FIGURA 1C

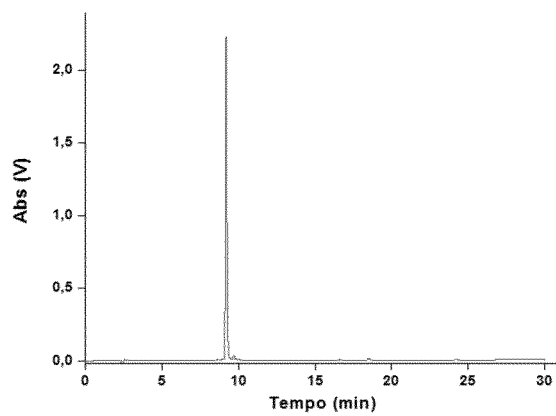


FIGURA 2A

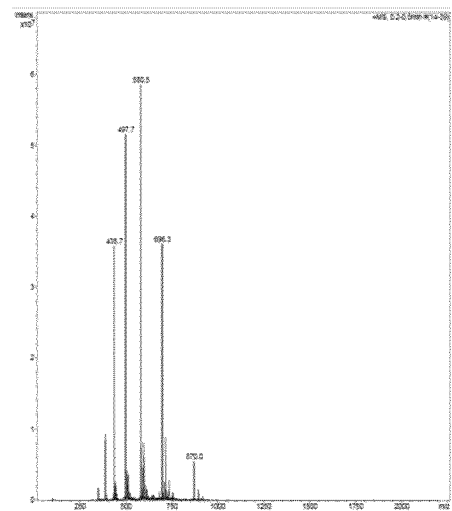


FIGURA 2B

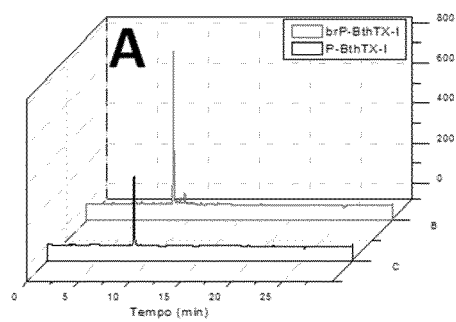


FIGURA 3A

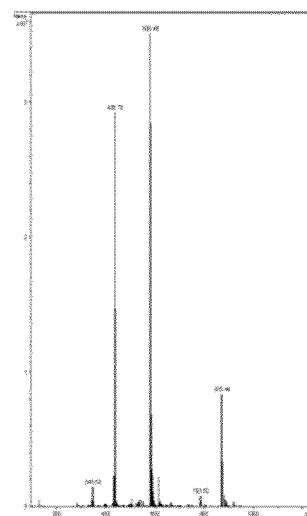


FIGURA 3B

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂,
PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂ E SEU USO COMO
ANTIMICROBIANO**

Esta invenção descreve o processo de obtenção de peptídeos antibacterianos pela dimerização do peptídeo p-BthTX-I que, por sua vez, é derivado da região C-terminal da Lys49 PLA₂s homóloga bothropstoxina I (BthTX-1).

Os peptídeos diméricos propostos apresentam uma capacidade de inibição do crescimento antimicrobiano maior do que a sua forma monomérica. Ainda, a presente invenção provê ao uso dos dímeros como agentes antimicrobianos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



97777057F7515AD3

Campo 2



051D7CF876418C41

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem - Bipeptídeo.txt
- Data de Geração do Código: 16-12-2014
- Hora de Geração do Código: 10:40:19
- Código de Controle:
 - Campo 1: 97777057F7515AD3
 - Campo 2: 051D7CF876418C41

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

<120> PROCESSO DE OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂, PEPTÍDEOS DIMÉRICOS (p-BthTX-I)₂ E SEU USO COMO ANTIMICROBIANO

<130> 14AUIN020 - Bipeptídeo

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Bothropstoxina I

<400> 1

Lys Lys Tyr Arg Tyr His Leu Lys Pro Phe Cys Lys Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Dímero da Bothropstoxina I (dimerização pela extremidade C-terminal)

<400> 2

Lys Lys Tyr Arg Tyr His Leu Lys Pro Phe Cys Lys Lys Lys Lys Lys
1 5 10 15

Cys Phe Pro Lys Leu His Tyr Arg Tyr Lys Lys
20 25

<210> 3

<211> 27
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Dímero da Bothropstoxina I (dimerização pela extremidade N-terminal)

<400> 3

Lys	Lys	Cys	Phe	Pro	Lys	Leu	His	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Lys	Glu	Lys	Lys
1				5				10					15		

Tyr	Arg	Tyr	His	Leu	Lys	Pro	Phe	Cys	Lys	Lys
			20					25		

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Dímero da Bothropstoxina I (dimerização por ponte lactâmica)

<400> 4

Lys	Lys	Tyr	Arg	Tyr	His	Leu	Lys	Pro	Phe	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Tyr
1				5				10					15		

Arg	Tyr	His	Leu	Lys	Pro	Phe	Lys	Lys	Lys
			20				25		

<210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Dímero da Bothropstoxina I

<400> 5

Lys	Lys	Tyr	Arg	Tyr	His	Leu	Lys	Pro	Phe	Cys	Lys	Lys	Lys	Lys	Tyr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

Arg Tyr His Leu Lys Pro Phe Cys Lys Lys
20 25