

## **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención está en el campo de péptidos antimicrobianos y usos de tales péptidos para el tratamiento de infecciones.

### **ANTECEDENTES**

Los antibióticos son sustancias químicas con la capacidad, en una solución diluida, de eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos. Los antibióticos que son suficientemente no tóxicos al hospedador se usan como agentes quimioterapéuticos para tratar enfermedades infecciosas de seres humanos, animales y plantas. El término se restringía originalmente a sustancias producidas por microorganismos, pero se ha extendido para incluir compuestos sintéticos y semisintéticos de actividad química similar.

El uso extensivo y generalizado de los fármacos antimicrobianos llevó a la emergencia de cepas resistentes de microorganismos. Estos microorganismos ya no son susceptibles a los fármacos antimicrobianos actualmente disponibles. Para reducir o evitar las enfermedades infecciosas letales y mantener la salud pública, se requieren nuevos agentes antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son un componente esencial del sistema de defensa del hospedador de organismos en la naturaleza y ofrecen protección de patógenos invasores. Muestran una potente actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, parásitos y virus. Los AMP más pequeños (generalmente de alrededor de 15-40 aminoácidos) actúan en gran medida al alterar la estructura o función de las membranas celulares microbianas, no se dirigen a estructuras moleculares definidas únicas. Por lo tanto, a diferencia de los antibióticos convencionales, son eficaces independientemente de la actividad metabólica de las bacterias. Los AMP humanos tales como defensinas y catelicidina (LL-37) están presentes en leucocitos y son secretados por varios epitelios en la piel y las superficies mucosas. Además de su actividad antimicrobiana, los AMP son moléculas efectoras importantes en la inflamación, activación inmune y cicatrización. Los AMP tienen secuencias y estructuras secundarias bastante diversas, pero comparten propiedades comunes. Son habitualmente catiónicos, anfipáticos y ejercen su efecto microbicida al comprometer la integridad de la membrana bacteriana. La interacción de los AMP con la superficie de la membrana aniónica de los microbios diana lleva a la permeabilización de la membrana, lisis celular y muerte.

## COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En el primer aspecto, la invención proporciona una secuencia de aminoácidos con una longitud de 17-22 aminoácidos que comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO:12 ( $X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$ ) donde  $X_0$  está ausente o es prolina;  $X_1$  es lisina, arginina, glicina o prolina;  $X_2$  es fenilalanina, triptófano o arginina;  $X_3$  es fenilalanina, valina o triptófano;  $X_4$  es arginina, tirosina o fenilalanina;  $X_5$  es valina o alanina;  $X_6$  es tirosina o arginina o lisina o triptófano;  $X_7$  es arginina, fenilalanina o glicina;  $X_8$  es arginina, fenilalanina o glicina;  $X_9$  es isoleucina, alanina, fenilalanina, tirosina o valina;  $X_{10}$  es arginina o histidina;  $X_{11}$  es arginina o lisina;  $X_{12}$  es arginina, lisina o asparagina;  $X_{13}$  es un polipéptido con una longitud de 0-4 aminoácidos; con las condiciones de que si  $X_0$  es prolina, entonces  $X_1$  no es prolina; si dicha secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID NO: 13 (KWCFRVCYRGICYRRCR) o SEQ ID NO: 28 (KWCFRVCYRGICYRKCR) entonces  $X_{13}$  tiene una longitud de 1-4 aminoácidos; si  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más, el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es ácido aspártico o ácido glutámico; si el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 es glicina, entonces dicha glicina no está modificada con acilo o ácido palmítico; si el aminoácido es  $X_{11}$  lisina, entonces  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) no es RRRF (SEQ ID NO: 15) y si el aminoácido es GFCWYVCYRGICYRRCN (SEQ ID NO: 16) entonces la asparagina de extremo C se encuentra amidada.

En determinadas modalidades,  $X_0$  está ausente y  $X_6$  es arginina o lisina y/o  $X_7$  es arginina o lisina;  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) se selecciona del grupo que consiste en YRGI (SEQ ID NO: 17), YRGV (SEQ ID NO: 18), YRGF (SEQ ID NO: 19) y/o  $X_{10}$  es arginina; y/o  $X_3X_4X_5$  (SEQ ID NO: 20) es FRV (SEQ ID NO: 21), WYV (SEQ ID NO: 22) y/o  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más y el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es ácido aspártico.

En un conjunto particular de modalidades, la secuencia de aminoácidos tiene una longitud de 17-21 aminoácidos y comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO:12 ( $X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$ ) donde  $X_0$  está ausente;  $X_1$  es lisina, arginina o glicina;  $X_2$  es fenilalanina, triptófano o arginina;  $X_3$  es fenilalanina, valina o triptófano;  $X_4$  es tirosina o fenilalanina;  $X_5$  es valina o alanina;  $X_6$  es tirosina o arginina;  $X_7$  es arginina o glicina;  $X_8$  es arginina, fenilalanina o glicina;  $X_9$  es alanina, fenilalanina, tirosina o valina;  $X_{10}$  es arginina o histidina;  $X_{11}$  es arginina o lisina;  $X_{12}$  es arginina, lisina o asparagina;  $X_{13}$  es un polipéptido con una longitud de 0-4 aminoácidos.

En otro conjunto de modalidades de acuerdo con el primer aspecto, la secuencia de aminoácidos tiene una longitud de 18-21 aminoácidos y comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO: 1 (KWCFRVCYRGICYRRCD) o un péptido que difiere de la SEQ ID NO: 1 en uno, dos, tres o

cuatro aminoácidos, donde los aminoácidos que difieren de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en arginina o glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1; fenilalanina o arginina en la posición que corresponde a la posición 2 de la SEQ ID NO: 1; valina o triptófano en la posición que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 1; tirosina en la posición que corresponde a la posición 5 de la SEQ ID NO: 1; arginina en la posición que corresponde a la posición 8 de la SEQ ID NO: 1; glicina en la posición que corresponde a la posición 9 de la SEQ ID NO: 1; arginina en la posición que corresponde a la posición 10 de la SEQ ID NO: 1; alanina, fenilalanina o valina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1; histidina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1; lisina en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1; asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1.

Más específicamente, la secuencia de aminoácidos comprende ácido aspártico en la posición que corresponde a la posición 18 de la SEQ ID NO: 1; y/o asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1; y/o glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1; alanina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1; y/o arginina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1; en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1, o ambas.

En un conjunto de modalidades, la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que comprenden, en los extremos N correspondientes, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (RWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 3 (GWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 4 (KFCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 5 (KWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 6 (KWCFRVCRRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 7 (KWCFRVCYRGVCYRRCRD), la SEQ ID NO: 8 (KWCFRVCYRGACYRRCRD), la SEQ ID NO: 9 (KWCFRVCYRGFCYRRCRD), la SEQ ID NO: 10 (KWCFRVCYRGICYHRCRD) o la SEQ ID NO: 11 (KWCFRVCYRGICYRRCND).

En modalidades adicionales, la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 (KRCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 98 (KWCVRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 99 (KWCFFVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 100 (KWCFWVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 102 (KWCFRACYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 104 (KWCFRVCYFGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 105 (KWCFRVCYRGICYRRCRN), la SEQ ID NO: 106 (KWCWRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 107 (KWCFRVCWRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 108 (KWCFRVCYGGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 109 (KWCFRVCYRRICYRRCRD), la SEQ ID NO: 110 (KWCFRVCYRGYCYRRCRD), la SEQ ID NO:

112 (KWCFRVCYRGICYRRCKD), la SEQ ID NO: 113 (KWCFRVCYRGICYRRCAD), la SEQ ID NO: 114 (KWCFRVCYRGICYRRRCRR), la SEQ ID NO: 115 (GWCFRVCYRGICYRRRCND), la SEQ ID NO: 116 (KWCFYVCYRGICYRRRCND), la SEQ ID NO: 117 (GWCFYVCYRGICYRRRCRD), la SEQ ID NO: 118 (GWCFYVCYRGICYRRRCND).

En otras modalidades adicionales, la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31.

En el segundo aspecto, la invención proporciona un multímero que comprende una pluralidad de repeticiones de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el aspecto anterior de la invención, donde además, el aminoácido de extremo N de dicha secuencia es prolina y el aminoácido de extremo C de dicha secuencia es ácido aspártico. Ventajosamente, las repeticiones de la secuencia de aminoácidos se unen entre sí directamente, formando de ese modo enlaces D-P. En determinadas modalidades, la pluralidad es entre 2 y 20.

La invención también proporciona un método para hacer la secuencia de aminoácidos que es adecuado para hacer el multímero como se describe en el segundo aspecto de la invención. El método comprende sintetizar el multímero y poner en contacto el multímero con un ácido suave (por ejemplo, ácido fórmico) por lo cual se rompen los enlaces D-P.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un método para tratar infecciones en un animal que lo necesita, que comprende administrarle al animal una formulación que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En determinadas modalidades, la infección es una infección cutánea. En otras modalidades, la infección es mastitis, una infección respiratoria, una infección del oído, una infección del tracto urinario o una infección del tracto reproductor.

En determinadas modalidades, el animal es un animal de compañía, por ejemplo, un perro, un gato o un caballo. En una modalidad particular, el animal es un perro. En determinadas modalidades, la formulación se formula para la aplicación tópica. En algunas modalidades, la formulación es un gel, una crema, una emulsión o un rociador.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 ilustra la toxicidad de las SEQ ID NO: 1 y 13 en glóbulos rojos de ratas, seres humanos y perros *beagle*.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

### **Definiciones**

Para un mejor entendimiento de la invención, se proporcionan las siguientes definiciones no taxativas:

«Alrededor de» o «aproximadamente», cuando se usan en conexión con una variable numérica medible, hacen referencia al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza de 95 % para la media) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, cualquiera sea mayor, a menos que «alrededor de» se use en referencia a intervalos de tiempo en semanas donde «alrededor de 3 semanas» es 17 a 25 días y alrededor de 2 a alrededor de 4 semanas es 10 a 40 días.

«Emulsión» significa una composición de dos líquidos inmiscibles en la que se suspenden pequeñas gotitas de un líquido en una fase continua del otro líquido.

«Administración parenteral» hace referencia a la introducción de una sustancia, como una vacuna, en el cuerpo de un sujeto mediante una vía que no incluye el tracto digestivo. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, intramuscular, transcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intraocular e intravenosa.

«Posición [en una secuencia de interés] que corresponde a» una determinada posición de una secuencia de referencia se determina alineando la secuencia de referencia y la secuencia de interés de tal forma que los residuos de cisteína de la secuencia de interés y la secuencia de referencia se emparejan entre sí y luego determinar la posición en la secuencia de interés que coincide con la posición deseada en la secuencia de referencia.

«Farmacéuticamente aceptable» se refiere a sustancias, que dentro del alcance de la opinión médica bien fundada, son adecuadas para utilizarse en contacto con los tejidos de los sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas y similares, correspondiente a una relación beneficio a riesgo razonable y eficaces para su uso deseado.

«Cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de la secuencia de aminoácidos y/o la formulación que la contiene que induciría una respuesta en un sujeto que recibe el aminoácido o la formulación que es adecuada para prevenir o reducir signos o síntomas de infección.

«Tratar» se refiere a prevenir un trastorno, afección o enfermedad que incluye, entre otras, infecciones, a las que aplica tal término o a prevenir o reducir uno o más síntomas de tal trastorno, afección o enfermedad.

«Tratamiento» se refiere al acto de «tratar» como se define anteriormente.

## **Péptidos**

Generalmente, la invención proporciona una secuencia de aminoácidos con una longitud de 17-22 aminoácidos y que comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO:12 ( $X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$ ) donde

$X_0$  está ausente o es prolina;

$X_1$  es lisina, arginina, glicina o prolina;

$X_2$  es fenilalanina, triptófano o arginina;

$X_3$  es fenilalanina, valina o triptófano;

$X_4$  es arginina, tirosina o fenilalanina;

$X_5$  es valina o alanina;

$X_6$  es tirosina o arginina;

$X_7$  es arginina, fenilalanina o glicina;

$X_8$  es arginina, fenilalanina o glicina;

$X_9$  es isoleucina, alanina, fenilalanina, tirosina o valina;

$X_{10}$  es arginina o histidina;

$X_{11}$  es arginina o lisina;

$X_{12}$  es arginina, lisina o asparagina;

$X_{13}$  es un polipéptido con una longitud de 0-4 aminoácidos;

con las condiciones de que si  $X_0$  es prolina, entonces  $X_1$  no es prolina; si dicha secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID NO: 13 (KWCFRVCYRGICYRRCR) o la SEQ ID NO: 28 (KWCFRVCYRGICYRKCR) entonces  $X_{13}$  tiene una longitud de 1-4 aminoácidos; si  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más, el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es ácido aspártico o ácido glutámico; si el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 es glicina, entonces dicha glicina no está modificada con acilo o ácido palmítico; si el aminoácido es  $X_{11}$  lisina, entonces  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) no es RRRF (SEQ ID NO: 15) y si el aminoácido es GFCWYVCYRGICYRRCN (SEQ ID NO: 16) entonces la asparagina de extremo C se encuentra amidada.

En determinadas modalidades,  $X_0$  está ausente y  $X_6$  es arginina o lisina y/o  $X_7$  es arginina o lisina;  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) se selecciona del grupo que consiste en YRGI (SEQ ID NO: 17), YRGV (SEQ ID NO: 18), YRGF (SEQ ID NO: 19) y/o  $X_{10}$  es arginina; y/o  $X_3X_4X_5$  (SEQ ID NO: 20) es FRV (SEQ ID NO: 21), WYV (SEQ ID NO: 22); y/o  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más (por ejemplo, una longitud de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos) y el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es ácido aspártico.

En un conjunto particular de modalidades de acuerdo con el primer aspecto, la secuencia de aminoácidos tiene una longitud de 18-21 aminoácidos y comprende, en su extremo N, la SEQ ID

NO: 1 (KWCFRVCYRGICYRRCRD) o un péptido que difiere de la SEQ ID NO: 1 en uno, dos, tres o cuatro aminoácidos, donde los aminoácidos que difieren de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en arginina o glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1; fenilalanina o arginina en la posición que corresponde a la posición 2 de la SEQ ID NO: 1; valina o triptófano en la posición que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 1; tirosina en la posición que corresponde a la posición 5 de la SEQ ID NO: 1; arginina en la posición que corresponde a la posición 8 de la SEQ ID NO: 1; glicina en la posición que corresponde a la posición 9 de la SEQ ID NO: 1; arginina en la posición que corresponde a la posición 10 de la SEQ ID NO: 1; alanina, fenilalanina o valina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1; histidina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1; lisina en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1; asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1.

En diferentes modalidades, la secuencia de aminoácidos difiere de la SEQ ID NO: 1 en uno, dos o tres aminoácidos.

En determinadas modalidades, la secuencia de aminoácidos comprende ácido aspártico en la posición que corresponde a la posición 18 de la SEQ ID NO: 1; y/o asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1; y/o glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1; alanina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1; y/o arginina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1; en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1, o ambas.

En un conjunto de modalidades, la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos que comprenden, en los extremos N correspondientes, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (RWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 3 (GWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 4 (KFCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 5 (KWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 6 (KWCFRVCRRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 7 (KWCFRVCYRGVCYRRCRD), la SEQ ID NO: 8 (KWCFRVCYRGACYRRCRD), la SEQ ID NO: 9 (KWCFRVCYRGFCYRRCRD), la SEQ ID NO: 10 (KWCFRVCYRGICYHRCRD) o la SEQ ID NO: 11 (KWCFRVCYRGICYRRCND).

Se pueden encontrar secuencias de aminoácidos adicionales entre la SEQ ID NO: 97 (KRCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 98 (KWCVRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 99 (KWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 100 (KWCFWVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 101 (KWCFRVYCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 102 (KWCFRACYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 103 (KWCFRVCKRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 104

(KWCFRVCYFGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 105 (KWCFRVCYRGICYRRCRN), la SEQ ID NO: 106 (KWCWRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 107 (KWCFRVCWRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 108 (KWCFRVCYGGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 109 (KWCFRVCYRRICYRRCRD), la SEQ ID NO: 110 (KWCFRVCYRGYCYRRCRD), la SEQ ID NO: 111 (KWCFRVCYRGICRYRRCRD), la SEQ ID NO: 112 (KWCFRVCYRGICYRRCKD), la SEQ ID NO: 113 (KWCFRVCYRGICYRRCAD), la SEQ ID NO: 114 (KWCFRVCYRGICYRRCRR), la SEQ ID NO: 115 (GWCFRVCYRGICYRRCND), la SEQ ID NO: 116 (KWCFYVCYRGICYRRCND), la SEQ ID NO: 117 (GWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 118 (GWCFYVCYRGICYRRCND).

Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos se puede seleccionar del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 97 (KRCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 98 (KWCVRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 99 (KWCFVVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 100 (KWCFWVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 102 (KWCFRACYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 104 (KWCFRVCYFGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 105 (KWCFRVCYRGICYRRCRN), la SEQ ID NO: 106 (KWCWRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 107 (KWCFRVCWRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 108 (KWCFRVCYGGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 109 (KWCFRVCYRRICYRRCRD), la SEQ ID NO: 110 (KWCFRVCYRGYCYRRCRD), la SEQ ID NO: 112 (KWCFRVCYRGICYRRCKD), la SEQ ID NO: 113 (KWCFRVCYRGICYRRCAD), la SEQ ID NO: 114 (KWCFRVCYRGICYRRCRR), la SEQ ID NO: 115 (GWCFRVCYRGICYRRCND), la SEQ ID NO: 116 (KWCFYVCYRGICYRRCND), la SEQ ID NO: 117 (GWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 118 (GWCFYVCYRGICYRRCND).

Los péptidos de acuerdo con la invención se pueden fabricar por métodos conocidos en la técnica que incluyen, entre otros, síntesis de péptido de fase sólida. Los péptidos también se pueden sintetizar usando técnicas de bioingeniería (por ejemplo, fermentación) en sistemas fúngicos, bacterianos o eucariotas.

En determinadas modalidades, cuando el aminoácido de extremo N del péptido antimicrobiano es prolina y el aminoácido de extremo C es ácido aspártico, el método de fabricación del péptido antimicrobiano puede implicar sintetizar un multímero del péptido antimicrobiano. En diferentes modalidades, la cantidad de monómeros en el multímero puede ser 1 a alrededor de 20, por ejemplo, alrededor de 5, alrededor de 10 o alrededor de 15. Convenientemente, los monómeros del péptido antimicrobiano se enlazarían mediante un enlace peptídico entre el ácido aspártico de extremo C de un monómero corriente arriba y la prolina de extremo N del monómero corriente abajo (enlace D-P). De manera conveniente, este enlace D-P puede escindirse mediante

hidrólisis de ácido suave (por ejemplo, ácido fórmico o cítrico). Por lo tanto, puede usarse una molécula incluida en tal descripción como por ejemplo (SEQ ID NO: 29)<sub>n</sub> o (SEQ ID NO: 31)<sub>n</sub>, donde n es un entero entre 1 y 20, en las composiciones y métodos de la invención.

### **Formulaciones**

Los péptidos de acuerdo con las modalidades que anteceden pueden formularse para suministrarse al sitio diana (es decir, el sitio que está infectado o el sitio en peligro de infectarse debido a una herida, irritación o similar). Sin limitación, los sitios incluyen la piel, ojos, orejas, glándula mamaria, tracto reproductor, vejiga urinaria, cavidades nasal y oral. La composición que comprende los péptidos de la presente invención se formula dependiendo del sitio de interés. También se proporcionan composiciones que pueden prepararse mezclando uno o más péptidos antimicrobianos descritos en la presente, con portadores, excipientes, aglutinantes, diluyentes farmacéuticamente aceptables o similares, para tratar o mejorar una variedad de infecciones bacterianas. Una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de uno o más compuestos descritos en la presente suficiente para resultar en la mejora de los síntomas de la infección. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar con métodos conocidos en la técnica tales como procesos convencionales de granulación, mezcla, disolución, encapsulación, liofilización o emulsificación, entre otros. Las composiciones pueden estar en la forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o soluciones. Las composiciones de la presente pueden formularse para varias vías de administración, por ejemplo, por administración oral, por administración tópica, por administración transmucosa, por administración rectal o por administración subcutánea así como inyección intratecal, intravenosa, intramamaria, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular o intraventricular. El compuesto o los compuestos de la presente invención también pueden administrarse de forma local, tal como inyección como una formulación de liberación sostenida. Las siguientes formas de dosificación se brindan a modo de ejemplo y no deberían interpretarse como limitantes de la presente invención.

Para la administración oral, bucal y sublingual, los polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gel y comprimidos ovalados son aceptables como formas de dosificación sólidas. Estas se pueden preparar, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales farmacéuticamente aceptables o tautómeros de estas, con al menos un aditivo o excipiente tal como un almidón u otro aditivo. Los aditivos o excipientes adecuados son sucrosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, sorbitol, almidón, ágar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatinas,

colágenos, caseína, albúmina, polímeros o glicéridos sintéticos o semisintéticos, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y/o polivinilpirrolidona. Opcionalmente, las formas de dosificación orales pueden contener otros ingredientes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente desintegrante, aglutinantes, espesantes, amortiguadores, endulzantes, agentes saborizantes o agentes perfumantes. Adicionalmente, se pueden agregar tintes o pigmentos para identificación. Los comprimidos y píldoras pueden tratarse adicionalmente con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral pueden estar en la forma de emulsiones, jarabes, elíxires, suspensiones, lechadas y soluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inactivo como agua. Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar como suspensiones o soluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como un aceite, agua, un alcohol y combinaciones de estos, entre otros. Se pueden agregar tensoactivos, agentes de suspensión o agentes emulsionantes farmacéuticamente adecuados, para la administración oral o parenteral.

Como se menciona anteriormente, las suspensiones pueden incluir aceites. Tales aceites incluyen aceite de maní, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de oliva y mezclas de aceites. La preparación de suspensión también puede contener ésteres de ácidos grasos, tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo, glicéridos de ácidos grasos y glicéridos de ácidos grasos acetilados. Las formulaciones de suspensión pueden incluir alcoholes, tales como, entre otros, etanol, alcohol isopropílico, alcohol hexadécílico, glicerol y propilenglicol. Los ésteres, tales como poli(etilenglicol), hidrocarburos de petróleo, tales como aceite mineral y vaselina y agua, entre otros, también pueden usarse en formulaciones de suspensión.

Para determinadas vías de administración, las formulaciones farmacéuticas pueden ser un rociador o aerosol que contiene solventes apropiados y opcionalmente otros compuestos tales como, entre otros, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propelente para una formulación de aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono o un solvente de baja ebullición basado en hidrocarburos. El compuesto o los compuestos de la presente invención se suministran convenientemente en la forma de una presentación de rociador de aerosol desde un nebulizador o similar.

Las formas de dosificación inyectables generalmente incluyen suspensiones acuosas o suspensiones oleosas que se pueden preparar usando un dispersante o agente humectante adecuado y un agente de suspensión. Las formas inyectables pueden estar en una fase de solución o en la forma de una suspensión, que se prepara con un solvente o diluyente. Los solventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. De manera alternativa, los aceites estériles pueden utilizarse como solventes o agentes de suspensión. Generalmente, el aceite o ácido graso no es volátil, inclusive aceites, ácidos grasos, mono-, di- o triglicéridos naturales o sintéticos.

Para la inyección, la formulación farmacéutica puede ser un polvo adecuado para la reconstitución con una solución apropiada tal como se describió anteriormente. Los ejemplos de estos incluyen liofilización, polvos secados de forma giratoria o secados por pulverización, polvos amorfos, gránulos, precipitados o partículas. Para la inyección, las formulaciones pueden opcionalmente contener estabilizantes, modificadores del pH, tensoactivos, modificadores de biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los compuestos se pueden formular para la administración parenteral por inyección tal como inyección en bolo o infusión continua. Una forma de dosificación unitaria para inyección puede estar en ampollas o recipientes de dosis múltiples. Para la administración rectal, las formulaciones farmacéuticas pueden estar en la forma de un supositorio, un ungüento, un enema, un comprimido o una crema para liberación del compuesto en los intestinos, colon sigmoide y/o el recto. Los supositorios rectales se preparan mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros farmacéuticamente aceptables del compuesto, con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, que está presente en una fase sólida a temperaturas de almacenamiento normales y presente en una fase líquida a esas temperaturas adecuadas para liberar un fármaco dentro del cuerpo, tal como en el recto. Se pueden emplear aceites en la preparación de formulaciones del tipo gelatina suave y supositorios. Agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas y glicerol pueden emplearse en la preparación de formulaciones de suspensión que también pueden contener agentes de suspensión como pectinas, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o carboximetilcelulosa, así como amortiguadores y conservantes.

Además de las formas de dosificación representativas descritas anteriormente, los expertos en la técnica generalmente conocen excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables y, por lo tanto, están incluidos en la presente invención. Dichos excipientes y portadores se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (1991).

Las formulaciones de la invención pueden ser diseñadas como de rápida acción, liberación rápida, acción prolongada y liberación sostenida. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas también se pueden formular para la liberación controlada o la liberación lenta.

Las presentes composiciones también pueden comprender, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de administración. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas se pueden comprimir en sedimentos o cilindros e implantarse intramuscularmente o subcutáneamente como inyecciones de depósito o como implantes tales como stent. Tales implantes pueden emplear materiales conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

La composición también puede contener medicaciones antipruríticas que incluyen, entre otras, oclatinib y sales de este (por ejemplo, APOQUEL® y anticuerpos anti-IL-31 (por ejemplo, CYTOPOINT™).

La composición también puede comprender un esteroide o una medicina antifúngica. Los esteroides adecuados incluyen, entre otros, betametasona, acetónido de triamcinolona, aceponato de hidrocortisona, hidrocortisona, triamcinolona, acetato de metilprednisolona y similares. Las medicinas antifúngicas adecuadas incluyen, entre otras, clotrimazol, econazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol.

Las composiciones pueden contener, por ejemplo, de alrededor de 0.1 % en peso, a alrededor de 90 % o más en peso, del péptido antimicrobiano, dependiendo del método de administración. En los casos en que las composiciones comprenden unidades de dosificación, cada unidad puede contener, por ejemplo, de alrededor de 0.5 mg a alrededor de 10 mg por dosis del péptido antimicrobiano. Por ejemplo, una dosis de la composición puede contener alrededor de 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg. La composición puede contener alrededor de 1 mg a alrededor de 5 mg del péptido antimicrobiano por dosis o alrededor de 1.5 mg a alrededor de 5 mg del péptido antimicrobiano por dosis, o alrededor de 2.5 mg a alrededor de 7.5 mg por dosis o alrededor de 1.5 mg a alrededor de 2.5 mg por dosis, dependiendo de la gravedad de la herida y el tamaño del animal.

## **Métodos**

En incluso otro aspecto, la invención también proporciona métodos para tratar o prevenir una infección bacteriana en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más

compuestos descritos en la presente al sujeto. Los sujetos adecuados que se pueden tratar incluyen perros, gatos, caballos, ganado, ovejas, cerdos, aves de corral, primates (por ejemplo, monos rhesus o cynomolgus (también conocidos como cangrejeros o monos de cola larga), titís, tamarindos, chimpancés, macacos), conejos y roedores (ratas, ratones, cobayos y similares). En determinada modalidad, el sujeto es un perro y el péptido antimicrobiano de la invención se suministra de manera tópica, intranasal, intraocular o intraaural. El péptido antimicrobiano puede suministrarse en forma de gotas, pulverizador, crema, gel, ungüento y similares.

Las infecciones que se pueden tratar con los compuestos descritos incluyen infecciones externas en los oídos, infecciones del oído medio, tal como otitis media aguda, infecciones de los senos craneales, infecciones oculares, infecciones de la cavidad bucal, tales como infecciones en los dientes, las encías y la mucosa, infecciones del tracto respiratorio superior, infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones genitourinarias, infecciones gastrointestinales, infecciones ginecológicas, septicemia, infecciones óseas y de las articulaciones, infecciones cutáneas y de la estructura de la piel, quemaduras, profilaxis antibacteriana de cirugía y profilaxis antibacteriana en pacientes inmunodeprimidos, tales como pacientes que reciben quimioterapia para el cáncer, o pacientes de trasplantes de órganos. Estas infecciones se pueden tratar en un marco de un hospital o comunidad mediante varias vías de administración como se describe en la presente.

Los compuestos o las composiciones descritas en la presente también se pueden usar profilácticamente. Por consiguiente, uno o más de los compuestos o composiciones de la presente pueden administrarse a un sujeto que se considera que está en riesgo de desarrollar una infección microbiana. Los sujetos en riesgo de desarrollar una infección microbiana incluyen individuos que han estado expuestos a un microorganismo particular, tal como una especie bacteriana patogénica; individuos con un sistema inmune comprometido o sujetos que son particularmente vulnerables a la infecciones debido a defensas naturales comprometidas (por ejemplo, en las que la piel está comprometida debido a quemaduras o cortes).

Los péptidos antimicrobianos descritos en la presente pueden usarse para el tratamiento o prevención de trastornos infecciosos provocados por una variedad de organismos bacterianos, inclusive infecciones por especies bacterianas patogénicas. Ejemplos no taxativos de infección bacteriana incluyen bacterias aerobias y anaerobias Gram positivas y Gram negativas tales como Staphylococci, por ejemplo, *S. aureus*; Enterococci, por ejemplo, *E. faecalis*; Streptococci, por ejemplo, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*; Escherichia species, por ejemplo, *E. coli*, inclusive cepas de *E. coli* enterotoxigénicas, enteropatogénicas, enteroinvasivas, enterohemorrágicas y enteroagregativas; cepas de Propionibacterium por ejemplo *P. acnes*; Haemophilus, por ejemplo, *H. influenza*; Moraxella, por ejemplo, *M. catarrhalis*. Otros ejemplos incluyen Mycobacteria, por

ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avian-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. genavense*, *M. leprae*, *M. xenopi*, *M. simiae*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense*, *M. celatum*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. fortuni* y *M. marinum*; Corynebacteria, por ejemplo, *C. diphtheriae*; especie Pseudomonas, por ejemplo, *P. aeruginosa*; especie Borrelia, por ejemplo, *B. burgdorferi*; especie Listeria, por ejemplo, *L. monocytogenes*; especie Bacillus, por ejemplo, *B. cereus*; especie Bordetella, por ejemplo, *B. bronchiseptica*; especie Klebsiella, especie Clostridium, por ejemplo, *C. perfringens*, *C. tetani*; especie Chlamydia, por ejemplo, *C. psittaci*; especie Rickettsia, por ejemplo, *R. rickettsii* y *R. prowazekii*; especie Salmonella, por ejemplo, *S. typhimurium*; especie Yersinia, por ejemplo, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*; especie Klebsiella, por ejemplo, *K. pneumoniae*; y Mycoplasma, por ejemplo, *M. pneumonia*, especie Actinobacillus, *H. parasuis* y *Trueperella pyogenes*.

En determinados aspectos, las bacterias se seleccionan de *Staphylococci*, por ejemplo, *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*. Las bacterias también pueden seleccionarse de Streptococci, por ejemplo, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. suis*. Además, las bacterias de la familia Pasteurellaceae son adecuadas para el tratamiento con las composiciones descritas en la presente. Las bacterias Pasteurellaceae adecuadas incluyen *M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni*, especie Escherichia, por ejemplo, *E. coli*, y especie Klebsiella.

En determinadas modalidades, las bacterias son *S. pseudintermedius* y/o *P. aeruginosa*.

Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar en diferentes regímenes de frecuencia. Por ejemplo, los regímenes adecuados incluyen 4 veces por día a una vez por semana, por ejemplo, tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, día por medio, cada tres días, dos veces por semana, cada cinco días, etc. De manera similar, las invenciones descritas en la presente pueden administrarse en regímenes de diferente duración, por ejemplo, en una única administración, durante dos días, durante tres días, durante cuatro días, durante una semana, durante dos semanas, durante un mes, durante seis semanas, etc. La duración, la frecuencia y la cantidad del péptido antimicrobiano por dosis, así como la especie y el estado de la herida y/o estado de la infección, pueden considerarse juntos al determinar el régimen de dosis, tiempo y frecuencia para la administración de las composiciones antimicrobianas reivindicadas en la presente.

Los siguientes ejemplos se presentan como modalidades ilustrativas pero no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención. Muchos cambios, variaciones, modificaciones y otros usos y aplicaciones de esta invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Actividad antimicrobiana y seguridad *in vitro*

Los péptidos de acuerdo con las SEQ ID NO como se enumeran en la Tabla 1 se prepararon por un fabricante comercial (CS Bio, Menlo Park, California) usando síntesis de fase sólida. La actividad antimicrobiana se evaluó al determinar la concentración de inhibición mínima (MIC) contra *S. aureus* y *E. coli*. En resumen, se realizaron MIC de microcaldo usando metodología CLSI (VET01-S2). Para las cepas de ATCC *S. aureus* y *E. coli*, se usó TSA con ágar de sangre de caballo lisada al 5 % para un cultivo durante la noche a aire ambiente a 37 °C. Se hizo una solución madre de 0.5 mM para cada péptido con agua de cultivo celular, ácido acético al 0.01 % y se diluyó serialmente y se esparció (10 µL) en una placa de 96 pocillos para una concentración de titulación de dosis de ensayo de 50 µM a 0.05 µM. 0.5 de estándar McFarland de cada cepa se diluyeron 1:250 en caldo Mueller-Hinton (MHB). Después se agregaron 90 µL de la suspensión de cultivo con un fármaco en una placa de 96 pocillos para incubación durante la noche por 18-20 horas. La MIC se determinó visualmente en el primer pocillo sin crecimiento visible a la concentración correspondiente.

Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Tabla 1.

**TABLA 1**

| SEQ           | Estructura            | S.aureus<br>ATCC 29213<br>µM | E.coli<br>ATCC 25922<br>µM |
|---------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|
| SEQ ID NO: 23 | KFCVYVCYRGICYRRCK     | 1.6                          | 0.4                        |
| SEQ ID NO: 24 | KWCFRVCYRGVCYRRCR     | 1.6                          | 0.4                        |
| SEQ ID NO: 1  | KWCFRVCYRGICYRRCRD    | 1.6                          | 0.4                        |
| SEQ ID NO: 13 | KWCFRVCYRGICYRRCR     | 3.1                          | 0.8                        |
| SEQ ID NO: 91 | GFCWYVCYRGFCYRRCN     | 3.1                          | 0.8                        |
| SEQ ID NO: 92 | RGGRLCYCRRRFCVCVGR    | 3.1                          | 3.1                        |
| SEQ ID NO: 93 | RRWCFRVCYRGFCYRKCR    | 3.1                          | 1.6                        |
| SEQ ID NO: 28 | KWCFRVCYRGICYRKCR     | 3.1                          | 1.6                        |
| SEQ ID NO: 94 | GFCWYVCRRRFCYRRCN     | 3.1                          | 0.4                        |
| SEQ ID NO: 25 | KWCFRVCRRRFCYRRCR     | 3.1                          | 0.8                        |
| SEQ ID NO: 26 | GFCWYVCYRGICYRRCN-NH2 | 3.1                          | 0.8                        |
| SEQ ID NO: 27 | GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH2 | 3.1                          | 0.8                        |

|               |                        |      |     |
|---------------|------------------------|------|-----|
| SEQ ID NO: 95 | GFCWYVCRRRFCYRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 33 | PGFCWYVCRRRFCYRRCN     | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 34 | PFCWYVCRRRFCYRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 35 | GFCWYVCRRRFCHRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 36 | GVCVYVCRRRFCYRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 37 | GVCVYVCRRRFCYRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 38 | GFCWYVCRRRFCYRRCN-NH2  | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 39 | PGFCWYVCRRRFCYRRCN     | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 40 | GFCWYVCRRRH CYRRCN     | 6.2  | 0.8 |
| SEQ ID NO: 41 | KFCVYVCRRRFCYRRCK      | 6.2  | 0.8 |
| SEQ ID NO: 42 | GHCWYVCRRRFCYRRCN      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 43 | GFCWYVCRRRFCYRRCS      | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 44 | *GFCWYVCYRGICYRRCN-NH2 | 6.2  | 0.4 |
| SEQ ID NO: 45 | *GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH2 | 6.2  | 0.8 |
| SEQ ID NO: 16 | GFCWYVCYRGICYRRCN      | 6.25 | 0.4 |
| SEQ ID NO: 46 | GFCWYVCYRGFCYRRCN      | 6.25 | 0.4 |
| SEQ ID NO: 47 | KFCWRVCRRRFCRRRCN      | 12.5 | 0.8 |
| SEQ ID NO: 48 | GFCWYVCRRGFCYRRCN      | 12.5 | 0.4 |
| SEQ ID NO: 49 | KWCFRVCRRNGVCYRRCR     | 12.5 | 0.2 |
| SEQ ID NO: 50 | GFCWYTCRRRFCYRRCN      | 12.5 | 0.4 |
| SEQ ID NO: 51 | GFCWYVCYRGFCHRRCN      | 25   | 6.2 |
| SEQ ID NO: 52 | GFCWYVCRRRFCHRRCN      | 25   | 0.8 |
| SEQ ID NO: 53 | **GFCWYVCRRRFCYRRCN    | 25   | 50  |
| SEQ ID NO: 54 | KFCWNVCRRRFCHRRCK      | 25   | 0.4 |
| SEQ ID NO: 55 | GFCWYVCRRGICYRRCN      | 25   | 0.8 |
| SEQ ID NO: 56 | GFCWYVCRRGICYRRCN      | 25   | 0.8 |
| SEQ ID NO: 57 | GFCWNVCRRRFCRRRCN      | 25   | 0.4 |
| SEQ ID NO: 58 | KFCVNVCYRGICHRRCK      | 25   | 0.2 |
| SEQ ID NO: 59 | KFCVNVCRRRFCHRRCK      | 25   | 0.8 |
| SEQ ID NO: 60 | KFCVNVCRRRFCRRRCK      | 25   | 0.4 |
| SEQ ID NO: 61 | GFCWYVCYRGFCYQQCN      | 25   | 6.2 |
| SEQ ID NO: 62 | GFCWYVCYRGFCYDDCN      | 25   | 50  |
| SEQ ID NO: 63 | GFCWYVCPKGYCYRRCN      | 50   | 50  |

|               |                    |    |      |
|---------------|--------------------|----|------|
| SEQ ID NO: 64 | GFCWYVCKNGFCYRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 65 | RKGCKCKNGFCVCR-NH2 | 50 | 6.25 |
| SEQ ID NO: 66 | GFCWNVCRRRFCHRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 67 | GFCWNVCRRRFCHRRCN  | 50 | 1.6  |
| SEQ ID NO: 68 | GFCWNVCYRGICHRRCN  | 50 | 1.6  |
| SEQ ID NO: 69 | KVCVNVCKQGICRKRCK  | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 70 | GCWYVCRNGVCYRRCN   | 50 | 25   |
| SEQ ID NO: 71 | GFCWYVCRNGVCYRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 72 | GFCWNVCYRGFCHRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 73 | GFCWYVCYRGFCYHHCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 74 | NVCVVCRRRGFCNRRCK  | 50 | 12.5 |
| SEQ ID NO: 75 | KCVRVCRRRACRRRCK   | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 76 | KCVRVCRRRGFCNRRCK  | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 77 | GFCWYVCKNGYCYRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 78 | GFCWYVCRNGYCYRRCN  | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 79 | GFCWYVCRNGYCHRRCN  | 50 | 6.2  |
| SEQ ID NO: 80 | GFCWYVCYRGICHRRCN  | 50 | 1.6  |
| SEQ ID NO: 81 | KCVRVCRRRGFCNRRCK  | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 82 | GFCRYVCYRGICRRRCN  | 50 | 6.2  |
| SEQ ID NO: 83 | KFCVNVCRNGICRRRCK  | 50 | 1.6  |
| SEQ ID NO: 84 | GVCVNVCCRRRFCHRRCN | 50 | 3.1  |
| SEQ ID NO: 85 | KKVCVNVCKQGICHKRCK | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 86 | KKVCVNVCRQGICHRRCK | 50 | 50   |
| SEQ ID NO: 87 | GFCRYVCRRGICRRRCN  | 50 | 12.5 |
| SEQ ID NO: 88 | KFCVNVCYRGICRRRCK  | 50 | 0.4  |
| SEQ ID NO: 89 | KCRRVCRRGFCYVVCN   | 50 | 25   |
| SEQ ID NO: 90 | GHCHHVCRRRHCHRRCN  | 50 | 50   |

\* se refiere a N-acetilación

\*\* se refiere a modificación de ácido N-palmitico

SEQ ID NO: 1 se seleccionó para una investigación más profunda. La toxicidad de la SEQ ID NO: 1 a células sanguíneas eucariotas se comparó con la de la taquiplesina (SEQ ID NO: 13). Se empleó un ensayo de hemólisis de glóbulo rojo bien referenciado y estándar contra múltiples especies para evaluar el potencial de lisis de los péptidos. Los glóbulos rojos (RBC, por sus siglas en inglés) se prepararon y aislaron por varios pasos de centrifugación y lavado para retirar la fracción de plasma. Una titulación de dosis (50  $\mu$ M a 0.05  $\mu$ M) de péptidos de prueba y péptido de control melitina se esparcieron de soluciones madre de 50 mM en una placa de 384 pocillos. Los RBC preparados se incubaron con péptido durante una hora a 37 °C. Se midió el porcentaje de hemólisis por densidad óptica a 405 nm y utilizando TritonX100 al 1 % como un efecto de cien por ciento (HPE) y amortiguador de fosfato solo como efecto de cero por ciento (ZPE).

Los inventores han descubierto sorprendentemente que la SEQ ID NO: 1 no solo tenía una mejor actividad antimicrobiana sino que también tenía una menor toxicidad de glóbulos rojos. Los resultados de los experimentos que usan glóbulos rojos de seres humanos, perros *beagle* y ratas se ilustran en la Figura 1. Brevemente, la SEQ ID NO: 1 fue 2-4 menos tóxica para los glóbulos rojos de seres humanos, perros *beagle* y ratas que la SEQ ID NO: 13. En glóbulos rojos de ratones y bovinos, las diferencias fueron insignificantes.

Los derivados adicionales de la SEQ ID NO: 1 se sintetizaron por síntesis de fase sólida como se describe anteriormente. La actividad antimicrobiana se evaluó determinando MIC contra *S. aureus* y *E. coli*, como se describe anteriormente. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2

| SEQ ID        | Secuencia          | S.aureus<br>ATCC 29213<br>μM | E.coli 2<br>ATCC 5922<br>μM |
|---------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|
| SEQ ID NO: 3  | GWCFRVCYRGICYRRCRD | 6.2                          | 3.1                         |
| SEQ ID NO: 4  | KFCFRVCYRGICYRRCRD | 3.1                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 5  | KWCFYVCYRGICYRRCRD | 6.2                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 2  | RWCFRVCYRGICYRRCRD | 12.5                         | 0.8                         |
| SEQ ID NO: 6  | KWCFRVCRRGICYRRCRD | 12.5                         | 3.1                         |
| SEQ ID NO: 96 | KWCFRVCYGRICYRRCRD | 3.1                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 7  | KWCFRVCYRGVCYRRCRD | 6.2                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 8  | KWCFRVCYRGACYRRCRD | 3.1                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 9  | KWCFRVCYRGFCYRRCRD | 6.2                          | 3.1                         |
| SEQ ID NO: 10 | KWCFRVCYRGICYHRCRD | 6.2                          | 1.6                         |
| SEQ ID NO: 11 | KWCFRVCYRGICYRRCND | 6.2                          | 0.8                         |
| SEQ ID NO: 1  | KWCFRVCYRGICYRRCRD | 3.1                          | 0.8                         |

La actividad antimicrobiana de los péptidos enumerados en la Tabla 2 contra diferentes cepas de MSSP (*Staphylococcus pseudintermedius* susceptible a meticilina) y MRSP (*Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina) se evaluó en más profundidad. Los resultados están en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Tabla 3. MIC contra cepas seleccionadas de MSSP

| SEQ | 49051 | 71990 | 72036 | 72191 | 76986 | 77378 | 78032 | 81923 | 84250 | 84658 | 86000 | 86001 |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.4   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   |
| 4   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.4   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   |
| 5   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 2   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 3.1   | 1.6   | 3.1   | 1.6   | 1.6   |
| 6   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 1.6   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   |
| 96  | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |

|    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 7  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 8  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 9  | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.4 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 0.8 |
| 10 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 11 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.4 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.4 | 0.8 |
| 1  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |

**Tabla 4. MIC contra cepas seleccionadas de MRSP**

| SEQ ID | 71994 | 72035 | 72192 | 76923 | 79882 | 80729 | 81926 | 86002 | 87655 | 88493 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 3      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 4      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 5      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 2      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 6      | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   |
| 96     | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 7      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 8      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 3.1   | 1.6   | 1.6   |
| 9      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 10     | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 11     | 1.6   | 1.6   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 0.8   | 1.6   |
| 1      | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |

Los péptidos adicionales se sintetizaron como se describe anteriormente. Las propiedades antimicrobianas de estos péptidos se determinaron y se resumen a continuación.

**Tabla 5. Efecto de secuencias antimicrobianas seleccionadas en cepas de MSSP**

| SEQ ID | 71990 | 72036 | 72191 | 76986 | 77378 | 78032 | 81923 | 84250 | 84658 | 86000 | 86001 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 97     | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 1.6   | 1.6   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 1.6   | 1.6   |
| 98     | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   |
| 99     | 1.6   | 1.6   | 3.1   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 1.6   | 3.1   | 3.1   | 3.1   | 1.6   |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 100 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 102 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 103 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 6.2 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| 104 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 3.1 | 1.6 |
| 105 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 |
| 106 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 107 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 108 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| 109 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 110 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 |
| 112 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 113 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 114 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 1.6 |
| 115 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 116 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 117 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 118 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 |
| 28  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 29  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 30  | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |
| 31  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 |

**Tabla 6**

**Efecto de péptidos antimicrobianos en diferentes bacterias. MR = MRSP, SA = *S. aureus*,**

**EC = *E. coli***

**SP = *S. pseudintermedius***

| SEQ ID | MR 71994 | MR 72035 | MR 72192 | MR 76923 | MR 79882 | MR 80279 | MR 81926 | MR 86002 | MR 87665 | MR 88493 | SA 29213 | EC 25922 | SP 49051 |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 97     | 1.6      | 3.1      | 3.1      | 1.6      | 1.6      | 3.1      | 1.6      | 3.1      | 3.1      | 3.1      | 6.2      | 3.1      | 3.1      |
| 98     | 1.6      | 3.1      | 1.6      | 1.6      | 0.8      | 1.6      | 1.6      | 1.6      | 1.6      | 1.6      | 3.1      | 1.6      | 1.6      |
| 99     | 1.6      | 3.1      | 3.1      | 1.6      | 1.6      | 1.6      | 3.1      | 3.1      | 1.6      | 1.6      | 6.2      | 1.6      | 3.1      |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|
| 100 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 6.2  | 0.8 | 1.6 |
| 102 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 6.2  | 1.6 | 1.6 |
| 103 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 25   | 6.2 | 3.1 |
| 104 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 6.2  | 3.1 | 1.6 |
| 105 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 6.2  | 3.1 | 1.6 |
| 106 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1  | 3.1 | 1.6 |
| 107 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 3.1 | 1.6 |
| 108 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 12.5 | 0.8 | 3.1 |
| 109 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 1.6 | 1.6 |
| 110 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 6.2  | 1.6 | 3.1 |
| 112 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 1.6 | 1.6 |
| 113 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 6.2  | 1.6 | 1.6 |
| 114 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 3.1 | 6.2  | 1.6 | 3.1 |
| 115 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 0.8 | 1.6 |
| 116 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 6.2  | 0.8 | 1.6 |
| 117 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 6.2  | 0.8 | 1.6 |
| 118 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 12.5 | 1.6 | 3.1 |
| 28  | 1.6 | 3.1 | 3.1 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 6.2  | 0.8 | 1.6 |
| 29  | 1.6 | 1.6 | 0.8 | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 1.6 | 1.6 |
| 30  | 1.6 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 1.6 | 1.6 |
| 31  | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 1.6 | 3.1  | 1.6 | 1.6 |

La seguridad de los péptidos enumerada en la tabla 2 se determinó midiendo la viabilidad celular. Las células de queratinocito epitelial derivado de caninos (CPEK, por sus células en inglés) se propagaron para determinar la viabilidad celular en presencia de péptidos. Las células se cultivaron de una solución madre congelada en un medio calentado previamente CnT-09-5 (con suplementos) en un matraz T75 y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células se lavaron con amortiguador de fosfato y se rellenaron con un medio calentado previamente CnT-05-9 y se repitió por varios días hasta que las células alcanzaron una densidad de  $6.6 \times 10^4$  células/mL. Después las células se transfirieron a una placa de 384 pocillos, se dejaron sedimentar y se dosificaron con péptidos y péptido de control de melitina (50 µM a 0.05 µM) y se incubaron durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Se agregaron TritonX100 al 0.1 % como (HPE)

y amortiguador de fosfato solo como (ZPE) a las placas para calcular el efecto porcentual una vez que el ensayo se había terminado con 10  $\mu$ L de reactivos de ensayo CELLTITER-GLO® para una lectura luminiscente. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

**Tabla 7**

| SEQ NO: | ID | CPEK (50 $\mu$ M) | cRBC (50 $\mu$ M) |
|---------|----|-------------------|-------------------|
| 3       |    | 42.1              | 67.1              |
| 4       |    | 16.6              | 67.1              |
| 5       |    | 28.6              | 3.1               |
| 2       |    | -1.7              | 64.0              |
| 6       |    | 4.1               | 1.1               |
| 96      |    | 51.9              | 101.4             |
| 7       |    | 11.3              | 84.1              |
| 8       |    | 24.6              | 30.2              |
| 9       |    | 52.3              | 101.3             |
| 10      |    | 31.5              | 101.1             |
| 11      |    | 22.0              | 57.8              |
| 1       |    | 21.5              | 20.5              |

La seguridad de los péptidos enumerada en la tabla 6 se determinó midiendo la viabilidad celular como se describió anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 8.

**Tabla 8**

| SEQ ID | cRBC (50 $\mu$ M) | CPEK (50 $\mu$ M) |
|--------|-------------------|-------------------|
| 97     | 31.2              | 12.9              |
| 98     | 35.0              | 9.3               |
| 99     | 100.0             | 19.9              |
| 100    | 100.0             | 29.5              |
| 102    | 23.9              | -2.1              |
| 103    | 7.9               | -0.5              |
| 104    | 100.6             | 6.0               |
| 105    | 97.9              | 8.6               |
| 106    | 101.5             | 25.2              |

|     |       |      |
|-----|-------|------|
| 107 | 101.8 | 26.3 |
| 108 | 27.7  | 9.6  |
| 109 | 99.8  | 19.2 |
| 110 | 46.3  | 10.7 |
| 112 | 61.0  | 14.2 |
| 113 | 86.3  | 15.7 |
| 114 | 97.9  | 11.9 |
| 115 | 94.6  | 5.1  |
| 116 | 87.0  | 16.0 |
| 117 | 97.8  | 14.7 |
| 118 | 98.3  | 9.1  |
| 28  | 94.4  | 19.4 |
| 29  | 68.2  | 17.5 |
| 30  | 63.5  | 17.0 |
| 31  | 43.5  | 11.0 |

Estos datos demuestran que los péptidos antimicrobianos de la presente invención no son solo eficaces contra las cepas evaluadas de bacterias sino que también son seguros, particularmente para administración no sistémica, por ejemplo, tópica.

Todas las publicaciones citadas en la memoria descriptiva, tanto las publicaciones de patente como las publicaciones que no son patentes, indican el nivel de experiencia de los expertos en la técnica con la cual está relacionada esta invención. Todas estas publicaciones se incorporan en su totalidad en la presente mediante esta referencia en la misma medida que si cada publicación individual se indicara específica e individualmente como incorporada mediante esta referencia.

Si bien la invención en la presente se describió con referencia a modalidades particulares, se debe comprender que estas modalidades son meramente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, se debe entender que se pueden hacer numerosas modificaciones a las modalidades ilustrativas y que se pueden inventar otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

## **REIVINDICACIONES**

1. Una secuencia de aminoácidos con una longitud de 17-22 aminoácidos y que comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO:12 ( $X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$ ) donde

$X_0$  está ausente o es prolina;

$X_1$  es lisina, arginina, glicina o prolina;

$X_2$  es fenilalanina, triptófano o arginina;

$X_3$  es fenilalanina, valina o triptófano;

$X_4$  es arginina, tirosina o fenilalanina;

$X_5$  es valina o alanina;

$X_6$  es tirosina, arginina, lisina o triptófano;

$X_7$  es arginina, fenilalanina o glicina;

$X_8$  es arginina o glicina;

$X_9$  es isoleucina, alanina, fenilalanina, tirosina o valina;

$X_{10}$  es arginina o histidina;

$X_{11}$  es arginina o lisina;

$X_{12}$  es arginina, lisina, alanina o asparagina;

$X_{13}$  es un polipéptido con una longitud de 0-4 aminoácidos;

con las condiciones de que

si  $X_0$  es prolina, entonces  $X_1$  no es prolina;

si dicha secuencia de aminoácidos comprende la SEQ ID NO: 13 (KWCFRVCYRGICYRRCR) o la SEQ ID NO: 28 (KWCFRVCYRGICYRKCR) entonces  $X_{13}$  tiene una longitud de 1-4 aminoácidos;

si  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más, entonces el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es asparagina, arginina, ácido aspártico o ácido glutámico;

si el aminoácido en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 es glicina, entonces dicha glicina no está modificada con acilo o ácido palmítico;

si el aminoácido es  $X_{11}$  lisina entonces  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) no es RRRF (SEQ ID NO: 15); y

si el aminoácido es GFCWYVCYRGICYRRCN (SEQ ID NO: 16) entonces la asparagina de extremo C se encuentra amidada.

2. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, donde  $X_0$  es prolina.

3. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde  $X_6$  es arginina o tirosina.
4. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde  $X_7$  es arginina o glicina.
5. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 4, donde  $X_7$  es arginina.
6. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde  $X_9$  es isoleucina, alanina, fenilalanina o valina.
7. La secuencia de aminoácidos de la reivindicación 1, donde  $X_9$  es isoleucina.
8. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde  $X_1$  es lisina.
9. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde  $X_{12}$  es arginina, lisina o asparagina.
10. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde  $X_{13}$  tiene una longitud de 1 aminoácido o más y el aminoácido de extremo N en  $X_{13}$  es ácido aspártico o ácido glutámico.
11. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde  $X_6X_7X_8X_9$  (SEQ ID NO: 14) se selecciona del grupo que consiste en YRGI (SEQ ID NO: 17), YRGV (SEQ ID NO: 18), YRGF (SEQ ID NO: 19).
12. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde  $X_{10}$  es arginina.
13. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde  $X_{11}$  es arginina.
14. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde  $X_3X_4X_5$  (SEQ ID NO: 20) es FRV (SEQ ID NO: 21), WYV (SEQ ID NO: 22).
15. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde  $X_1$  es prolina.

16. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el aminoácido de extremo C de dicha secuencia es ácido aspártico.

17. Un multímero que comprende una pluralidad de repeticiones de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 16.

18. El multímero de la reivindicación 17, donde dichas repeticiones se unen entre sí directamente.

19. El multímero de la reivindicación 17 o 18, donde la pluralidad es entre 2 y 20.

20. Un método para hacer la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende:

- a) sintetizar un multímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17-19; y
- b) poner dicho multímero en contacto con un ácido suave rompiendo de ese modo los enlaces D-P.

21. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en KFCVYVCYRGICYRRCK (SEQ ID NO: 23), KWCFRVCYRGVCYRRCR (SEQ ID NO: 24), KWCFRVCRRRFCYRRCR (SEQ ID NO: 25), GFCWYVCYRGICYRRCN-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 26), y GFCWYVCYRGFCYRRCN-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 27), PKWCFRVCYRGICYRRCR (SEQ ID NO: 28); PKWCFRVCYRGICYRRCRD (SEQ ID NO: 29); PWCFRVCYRGICYRRCR (SEQ ID NO: 30); PWCFRVCYRGICYRRCRD (SEQ ID NO: 31).

22. La secuencia de aminoácidos de la reivindicación 1, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una longitud de 18-21 aminoácidos y comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO: 1 (KWCFRVCYRGICYRRCRD) o la SEQ ID NO: 29 (PKWCFRVCYRGICYRRCRD) o un péptido que difiere de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 29 en uno, dos, tres o cuatro aminoácidos, donde los aminoácidos que difieren de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 29 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en

arginina o glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1;  
fenilalanina o arginina en la posición que corresponde a la posición 2 de la SEQ ID NO:

1;

valina o triptófano en la posición que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 1;  
tirosina en la posición que corresponde a la posición 5 de la SEQ ID NO: 1;

arginina en la posición que corresponde a la posición 8 de la SEQ ID NO: 1;  
glicina en la posición que corresponde a la posición 9 de la SEQ ID NO: 1;  
arginina en la posición que corresponde a la posición 10 de la SEQ ID NO: 1;  
alanina, fenilalanina o valina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1;  
histidina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1;  
lisina en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1;  
asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1

23. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende ácido aspártico en la posición que corresponde a la posición 18 de la SEQ ID NO: 1.

24. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-23, que comprende asparagina en la posición que corresponde a la posición 17 de la SEQ ID NO: 1.

25. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-24, que comprende glicina en la posición que corresponde a la posición 1 de la SEQ ID NO: 1.

26. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-25, que comprende alanina en la posición que corresponde a la posición 11 de la SEQ ID NO: 1.

27. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-26, donde la arginina está presente en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1; en la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1, o ambas.

28. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-27, que comprende arginina en la posición que corresponde a la posición 14 de la SEQ ID NO: 1 y la posición que corresponde a la posición 15 de la SEQ ID NO: 1.

29. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-28, donde dicha secuencia de aminoácidos tiene una longitud de 18 aminoácidos.

30. La secuencia de aminoácidos de cualquiera de las reivindicaciones 22-29, donde el péptido difiere de la SEQ ID NO: 1 en tres, dos o un aminoácido.

31. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 22, que comprende, en su extremo N, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (RWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 3

(GWCFRVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 4 (KFCFRVCYRGICYRRCRD); la SEQ ID NO: 5 (KWCFYVCYRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 6 (KWCFRVCRRGICYRRCRD), la SEQ ID NO: 7 (KWCFRVCYRGVCYRRCRD), la SEQ ID NO: 8 (KWCFRVCYRGACYRRCRD), la SEQ ID NO: 9 (KWCFRVCYRGFCYRRCRD), la SEQ ID NO: 10 (KWCFRVCYRGICYHRCRD), la SEQ ID NO: 11 (KWCFRVCYRGICYRRCND).

32. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 12.

33. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 31, que comprende la SEQ ID NO:4 o la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 8.

34. Un método para tratar infecciones cutáneas en un animal que lo necesita, que comprende administrarle al animal una formulación que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, 22-33.

35. Un método para tratar infecciones cutáneas en un animal que lo necesita, que comprende administrarle al animal una formulación que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-33.

36. El método de la reivindicación 34 o la reivindicación 35, donde dicha formulación se administra por vía tópica.

37. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33-36, donde el animal es un perro.

38. Un método para tratar mastitis en un animal que lo necesita, que comprende administrarle al animal una formulación que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, 22-33.

39. El método de la reivindicación 38, donde dicha formulación se administra a la glándula mamaria del animal.

40. El método de la reivindicación 38 o 39, donde dicho animal es un bovino, ovino, porcino o caprino hembra.

41. Un método para tratar una infección respiratoria en un animal que lo necesita, que comprende administrarle al animal una formulación que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, 22-33.

42. El método de la reivindicación 41, donde dicho animal es un bovino, un ovino, un porcino, un caprino, un equino, un felino o un animal canino.

43. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, 22-33 para el tratamiento de una afección médica en un animal.

44. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22-33 para el tratamiento de una afección médica en un animal.

45. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, donde la afección médica es una infección cutánea.

46. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43-45, donde el animal es un perro.

47. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, donde la afección médica es una infección respiratoria o mastitis.

48. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 45-47, formulada para una administración tópica.

49. La secuencia de aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 48, formulada en una crema, un ungüento, un rociador o una emulsión.

**RESUMEN**

Se proporcionan péptidos antimicrobianos de la fórmula general  $X_0X_1X_2CX_3X_4X_5CX_6X_7X_8X_9CYX_{10}X_{11}CX_{12}X_{13}$ . También se proporcionan ciertas formulaciones que contienen estos péptidos y métodos de uso de estos péptidos para tratar infecciones cutáneas en un animal que lo necesita.