

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 705**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2015** **PCT/US2015/042435**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16022335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015** **E 15829088 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 3179855**

54 Título: **Terapias de antibióticos peptídicos derivados del búfalo de agua**

30 Prioridad:

04.08.2014 US 201462032737 P

10.09.2014 US 201414483083

03.04.2015 US 201514678558

21.04.2015 US 201514692518

25.06.2015 US 201514750709

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2020

73 Titular/es:

CENTAUR, INC. (100.0%)

1351 Old 57 Hwy.

Olathe, Kansas 66061, US

72 Inventor/es:

GARCIA, LUIS TONATIUH MELGAREJO;

LINDE, ANNIKA y

LUSHINGTON, GERALD HENRY

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 770 705 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapias de antibióticos peptídicos derivados del búfalo de agua

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a agentes antimicrobianos y métodos de uso. Más particularmente, la descripción se refiere a péptidos antimicrobianos y usos terapéuticos de los mismos.

10 Listado de secuencias

Esta aplicación contiene un listado de secuencias en formato papel y en formato legible por computadora.

Antecedentes de la invención

15

La resistencia a los antimicrobianos está reduciendo la disponibilidad de tratamientos antimicrobianos efectivos a nivel mundial. Los organismos resistentes, incluyendo bacterias, hongos, virus y parásitos, son capaces de resistir el ataque de los medicamentos antimicrobianos, por lo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces. Las infecciones por esos organismos resistentes persisten aumentando el riesgo de propagación a otros. La evolución de cepas resistentes de organismos es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos están expuestos a fármacos antimicrobianos, y los rasgos resistentes pueden intercambiarse entre ciertos tipos de bacterias. El abuso de los medicamentos antimicrobianos también acelera la aparición de organismos resistentes.

20

Con la disminución de los tratamientos antimicrobianos eficaces debido a la aparición de organismos resistentes, se necesitan nuevas terapias antimicrobianas. El número de nuevas terapias antimicrobianas desarrolladas y aprobadas ha disminuido constantemente en las últimas tres décadas, dejando aún menos opciones para tratar organismos resistentes.

25

Por consiguiente, existe la necesidad de tratamientos antimicrobianos y terapias que tengan actividad antimicrobiana de amplio espectro. Además, existe la necesidad de inhibir eficazmente el crecimiento y la propagación de microorganismos nocivos.

30

Resumen de la invención

La presente descripción proporciona agentes antimicrobianos que tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro y métodos para inhibir el crecimiento de microorganismos. En particular, la presente descripción está dirigida a los péptidos que tienen actividad antimicrobiana y a los métodos para usar los péptidos para inhibir microorganismos.

35

La descripción proporciona agentes antimicrobianos sintéticos que tienen al menos dos secuencias peptídicas de 14 aminoácidos unidas operativamente. La secuencia de aminoácidos del péptido es generalmente la secuencia de fórmula 1 (Gly-X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄) en donde X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile; X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro; X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp; X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu; X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp; y, X₆ se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg. En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos del péptido tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 3-33. En algunos aspectos, la secuencia aminoacídica del péptido tiene al menos un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con al menos una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 3-33. Preferentemente, la secuencia aminoacídica del péptido tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia para SEC ID No: 8.

40

45

50

En algunos aspectos, el agente antimicrobiano descrito incluye una primera secuencia sintética de aminoácidos y una segunda secuencia sintética de aminoácidos unidas operativamente. Tanto la segunda secuencia aminoacídica sintética, como la primera secuencia aminoacídica sintética, es al menos una secuencia de péptidos de 14 aminoácidos. Generalmente, la segunda secuencia aminoacídica sintética también tiene una secuencia de la fórmula 1 descrita anteriormente. En algunos aspectos, la segunda secuencia aminoacídica sintética es idéntica a la primera secuencia aminoacídica sintética, creando un homodímero. En otros aspectos, la segunda secuencia aminoacídica sintética no es idéntica a la primera secuencia aminoacídica sintética, creando un heterodímero. En algunos aspectos, el agente antimicrobiano incluye una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40-4101. En algunos aspectos, el agente antimicrobiano incluye una secuencia que tiene al menos un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia para al menos una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 40-4101. Preferentemente, el agente antimicrobiano incluye una secuencia que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia para SEQ ID NO: 40.

55

60

65

En algunos aspectos, el agente antimicrobiano de la descripción incluye una secuencia enlazadora que conecta operativamente la primera secuencia aminoacídica sintética con la segunda secuencia aminoacídica sintética. Las secuencias de unión mejoran aún más la cinética de la actividad antimicrobiana del agente antimicrobiano. En algunos

aspectos, la secuencia enlazadora está diseñada para mejorar la solubilidad en medios polares. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora está diseñada para mejorar la solubilidad en medios lipofílicos. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora está diseñada para potenciar la estabilidad química en una variedad de medios químicos. Las secuencias de unión adecuadas pueden tener una longitud de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos. Preferentemente, la secuencia enlazadora tiene una longitud de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. Con mayor preferencia, la secuencia enlazadora tiene una longitud de aproximadamente 5 a 8 aminoácidos. La secuencia enlazadora adecuada puede incluir cualquier aminoácido en cada posición, siempre que no se interrumpa la actividad antimicrobiana del agente antimicrobiano. Esas secuencias de unión incluyen aquellas que permiten la alineación antiparalela de dos hélices distintas formadas por la primera y la segunda secuencias aminoacídicas sintéticas. Esas secuencias de unión también incluyen aquellas que potencian la actividad antimicrobiana de la primera y segunda secuencias aminoacídicas sintéticas. A modo de ejemplo, sin limitación, la primera posición de aminoácido de la secuencia enlazadora puede estar ocupada productivamente con un residuo aniónico tal como aspartato o glutamato, que puede potenciar la actividad antimicrobiana al estabilizar una conformación activa. Además, a modo de ejemplo, sin limitación, la secuencia enlazadora puede incluir de 5 a 8 residuos de asparagina para potenciar la solubilidad en medios polares mientras no modifique la conformación activa que corresponda al resto de la molécula. Alternativamente, la secuencia enlazadora puede incluir de 5 a 8 residuos de glicina para potenciar la solubilidad en medios polares mientras no modifique la conformación activa que corresponda al resto de la molécula. En otros aspectos, la secuencia enlazadora puede ser una forma heterogénea, compuesta de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 residuos seleccionados a partir de los siguientes aminoácidos, incluyendo, asparagina, glutamina, glicina, histidina, serina, treonina y combinaciones de los mismos. Se pueden seleccionar formulaciones heterogéneas adecuadas para potenciar la solubilidad en medios polares mientras no se modifique la conformación activa que corresponde al resto de la molécula.

En algunos aspectos, la secuencia enlazadora es generalmente la secuencia de la fórmula 2: (A1-P2-P3-...Pn), con "A" se refiere a un residuo aniónico, "P" se refiere a un residuo polar y "n" se refiere a un número entero entre aproximadamente 3 y aproximadamente 25. Los residuos aniónicos adecuados incluyen aquellos conocidos como tales en la técnica, incluyendo, sin limitación, aspartato y glutamato. Los residuos polares adecuados incluyen los conocidos como tales en la técnica, incluyendo, sin limitación, asparagina, glutamina, glicina, histidina, serina y treonina. En algunos aspectos, n es un número entero como el que incluye, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25. Preferentemente, n es un número entero tal como 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de la fórmula 2. En algunos aspectos, la secuencia aminoacídica tiene al menos un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de la fórmula 2. Preferentemente, la secuencia enlazadora tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de la fórmula 2.

En algunos aspectos, la secuencia enlazadora tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 34-39. En algunos aspectos, la secuencia aminoacídica tiene al menos un 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia para al menos una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 34-39. Preferentemente, la secuencia enlazadora tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia con al menos una secuencia proporcionada en SEQ ID NO: 34-39.

Los agentes antimicrobianos de la descripción también incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias aminoacídicas descritas en este documento, así como vectores de expresión, que codifican para un agente antimicrobiano, una variante o un fragmento de los mismos. Además, la descripción proporciona células aisladas que contienen esos ácidos nucleicos, vectores de expresión o péptidos descritos en este documento. La descripción proporciona composiciones que contienen moléculas de ácido nucleico o péptidos de la descripción, así como variantes o fragmentos de los mismos. Además, la divulgación proporciona artículos de fabricación que contienen moléculas de ácido nucleico o péptidos de la divulgación, así como variantes o fragmentos de los mismos.

La descripción proporciona agentes antimicrobianos que tienen una amplia actividad antimicrobiana contra microorganismos que incluyen bacterias, levaduras, protozoos, hongos, moho, virus y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos tienen actividad antimicrobiana contra las bacterias Grampositivas y Gramnegativas. Los agentes antimicrobianos de la descripción pueden usarse para inhibir o prevenir el crecimiento de un microorganismo. Esos microorganismos pueden incluir, sin limitación, cepas de *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacteria*, *Haemophilus* y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, las composiciones antimicrobianas pueden incluir un portador farmacéutico. En algunos aspectos, las composiciones antimicrobianas pueden incluir un aditivo alimentario.

La descripción proporciona métodos para reducir o inhibir el crecimiento o la supervivencia de un microbio. Esos métodos incluyen poner en contacto el microbio con el agente antimicrobiano.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para reducir o inhibir el crecimiento o la supervivencia de un microbio en un sujeto. El método incluye poner en contacto o administrarle al sujeto una composición que contiene un agente antimicrobiano. Se suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar una infección microbiana en un sujeto. El método incluye poner en contacto o administrarle al sujeto una composición que contiene un agente antimicrobiano descrito en este documento. Se suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto.

5 En algunos aspectos, la descripción proporciona un método para tratar la mastitis en un sujeto. El método incluye identificar a un sujeto que tiene mastitis y poner en contacto o administrarle al sujeto una composición que contiene un agente antimicrobiano. En algunos aspectos, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición se administra directamente al tejido mamario del sujeto.

10 La presente descripción proporciona además un artículo de fabricación, o kit, que incluye un recipiente y un agente antimicrobiano. El artículo de fabricación puede incluir un material de envase que contiene al agente antimicrobiano y una etiqueta que indique que el agente antimicrobiano puede usarse para tratar la mastitis. El artículo de fabricación puede incluir un material de envase que contiene al agente antimicrobiano y una etiqueta que indique que el agente antimicrobiano puede usarse para tratar una infección microbiana en un sujeto. El artículo de fabricación puede incluir un material de envase que contiene al agente antimicrobiano y una etiqueta que indica que el agente antimicrobiano puede usarse para inhibir el crecimiento o la supervivencia de los microbios. El artículo de fabricación puede incluir material de envase que contiene al agente antimicrobiano y una etiqueta que indica que el agente antimicrobiano puede usarse para inhibir el crecimiento o la supervivencia de los microbios en un sujeto.

20 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la descripción. La descripción puede entenderse mejor por la referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

25 El archivo de la patente o de la solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o de la publicación de la solicitud de la patente con dibujos en color, previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

30 La Figura 1 representa de manera gráfica la composición de aminoácidos de algunos aspectos del agente antimicrobiano. Los colores de los residuos reflejan una preferencia por lipofílico (amarillo) o básico (azul).

La Figura 2 muestra la estructura antimicrobiana del dímero activo basada en simulaciones de dinámica molecular. Los objetos verdes y amarillos son dos péptidos de composición idéntica orientados en alineación antiparalela. Los números identifican las posiciones específicas de aminoácidos que incluyen el término amino (posición 0) y el término carboxilo (posición 15). La superficie sólida representa la membrana lipídica coloreada según el lípido neutro (azul) o el aniónico (rojo).

40 La Figura 3 representa de manera gráfica los papeles de las posiciones específicas de los aminoácidos dentro de la construcción del dímero no covalente para algunos aspectos del agente antimicrobiano. La ilustración muestra las estabilizaciones intradímeras (flechas negras), las interacciones dímero-lípido de membrana (flechas amarillas) y el acoplamiento electrostático dímero-membrana (flechas rojo-azul).

45 La Figura 4 representa de manera gráfica un dímero unido covalentemente de extensión mínima basado en la formulación no covalente mostrada en la Figura 1. El dímero (dibujos animados plateados y barras de color CPK) se muestra sobre una superficie modelo de membrana, coloreada por lípidos neutros (azules) vs. lípidos aniónicos (rojos).

50 La Figura 5 Representa de manera gráfica la actividad antibiótica de los péptidos antimicrobianos de la descripción. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre los grupos (abajo del diagrama de caja), con la prueba post-hoc que muestra una diferencia entre el WB-14F en comparación con los tres grupos de control (PBS, ATBX y Non-Tx) con un nivel de significancia del 5 %.

55 La Figura 6 representa un agente antimicrobiano (SEQ ID NO: 17) presentado como barras (izquierda; como se muestra sobre el eje helicoidal) y una superficie accesible al solvente (centro y derecha, como se muestra desde las vistas frontal y lateral, con el eje helicoidal apuntando hacia arriba en el plano de la página). La coloración es la siguiente: los residuos hidrófobos son amarillos; los residuos polares están coloreados por elemento (H = cian, C = blanco, N = azul, O = rojo).

60 La Figura 7 muestra un modelo de alteración de la membrana. Formación del poro toroidal (figura 7A) en la que la superficie lipofílica del péptido coordina el medio lipídico de forma sistemática, para formar en colaboración un poro transmembrana o una difusión en el plano (figura 7B). Los péptidos o dímeros individuales alteran localmente el orden de la membrana mediante la combinación de interacciones lipofílicas péptido-membrana y la atracción catiónica de los grupos encabezados por fosfolípidos cargados negativamente (superficies rojas) por aminoácidos peptídicos cargados positivamente (superficies azules), con las bolsas locales de desorden que se agregan difusamente para formar áreas de marcada debilidad de la membrana.

65 Descripción detallada

De acuerdo con la presente descripción, se han descubierto composiciones y métodos de uso de agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento o la supervivencia de microorganismos. En particular, los agentes antimicrobianos que tienen péptidos con actividad antimicrobiana se usan para inhibir el crecimiento o la supervivencia de microorganismos. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en este documento son útiles para tratamientos antimicrobianos y terapéuticos. Además, las composiciones y métodos descritos en este documento pueden usarse cuando la resistencia a los antimicrobianos ha reducido la disponibilidad de tratamientos antimicrobianos o terapéuticos.

I. Composiciones

Las composiciones de la descripción incluyen agentes antimicrobianos que tienen actividad antimicrobiana contra al menos un microorganismo. En algunos aspectos, las composiciones de la descripción incluyen agentes antimicrobianos que tienen actividad antimicrobiana contra más de un microorganismo.

a. Ácidos nucleicos que codifican para los agentes antimicrobianos

La descripción proporciona agentes antimicrobianos que incluyen péptidos sintéticos que tienen actividad antimicrobiana. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos incluyen péptidos, un fragmento de los mismos o una variante de los mismos, así como las moléculas de ácido nucleico que codifican para el péptido sintético de la descripción. Esas moléculas de ácido nucleico pueden incluir un vector de expresión.

Se describen los ácidos nucleicos que codifican para los péptidos antimicrobianos derivados de proteínas de defensa del huésped búfalo de agua. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para los péptidos antimicrobianos de la descripción se derivaron a partir de SEC ID No: 1 y la secuencia aminoacídica codificada para SEQ ID NO: 2, que tiene la secuencia del péptido antimicrobiano de SEQ ID NO: 3. Las secuencias de nucleótidos adecuadas de la presente descripción incluyen aquellas que codifican para un péptido que tiene actividad antibacteriana tal como los péptidos proporcionados por SEC ID No: 3-33, 40-4101, y los descritos en este documento.

Se pueden usar nucleótidos mutantes de los péptidos antimicrobianos, siempre que los mutantes incluyan secuencias de ácido nucleico que codifiquen para los péptidos antimicrobianos funcionales como se describe en este documento. Los ácidos nucleicos del sujeto pueden ser mutados para alterar las propiedades del péptido codificado, tales como propiedades de expresión, propiedades de plegamiento, propiedades de solubilidad y actividad antibacteriana. Un experto en la materia reconocerá que las proteínas codificadas por ácidos nucleicos que codifican para los homólogos o mutantes pueden tener las mismas propiedades antibacterianas que los péptidos de SEC ID No: 3-33 y 40-4101, o pueden tener propiedades antibacterianas alteradas. La secuencia de ADN o el producto proteico de esa mutación generalmente será sustancialmente similar a las secuencias proporcionadas en este documento y diferirá en uno o más nucleótidos o aminoácidos. Los cambios de secuencia pueden ser sustituciones, inserciones, deleciones o una combinación de los mismos. Las técnicas para la mutagénesis de genes clonados son conocidas en la técnica. Los métodos para la mutagénesis específica de sitio se pueden encontrar en Gustin y otros, *Biotechniques* 14:22, 1993; Barany, *Gene* 37: 111-23, 1985; Colicelli y otros, *Mol. Gen. Genet.* 199: 537-9, 1985; y Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, páginas 15.3-15.108 y todos incorporados en este documento como referencia. Esos derivados de ácido nucleico mutado pueden usarse para estudiar las relaciones estructura-función de un péptido antimicrobiano particular, o para alterar las propiedades del péptido que afectan su función o regulación. En resumen, la descripción se refiere a las secuencias de codificación para los péptidos antimicrobianos tales como las que codifican para secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-33, 40-4101, y variantes o mutantes de los mismos. Además, la descripción abarca los ARN intermediarios codificados por las secuencias de ácido nucleico descritas y que se traducen en un péptido antimicrobiano de la descripción.

b. Composiciones de péptidos antimicrobianos

Un péptido sintético descrito en este documento puede obtenerse usando los métodos conocidos en la técnica, que incluyen el aislamiento a partir de una célula que exprese el péptido, la síntesis química, o el péptido puede expresarse a partir de una molécula de ácido nucleico recombinante. Los métodos de síntesis de un péptido objeto se describen en *Current Protocols in Protein Science*, Unidades 5, pub. John Wiley & Sons, Inc., 2002 y *Current Protocols in Protein Science*, Unidades 6, pub. John Wiley & Sons, Inc., 2002 y ambos se incorporan en este documento como referencia.

La descripción contempla péptidos antimicrobianos y mutantes de los mismos, que incluyen aquellos péptidos codificados por los ácidos nucleicos objeto. Los péptidos antibacterianos sintéticos, o agentes, descritos en este documento están ejemplificados por las secuencias de SEQ ID NO: 3-33 y 40-4101. Además, la descripción incluye tanto homodímeros como heterodímeros de los péptidos antibacterianos descritos en este documento.

Homólogos o péptidos que varían en secuencia a partir de las secuencias aminoacídicas de SEC ID No: 3-33 y 40-4101 que también se incluyen en la descripción. Por homólogo se entiende una proteína que tiene al menos aproximadamente un 10 %, generalmente al menos aproximadamente 25 %, 30 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más de identidad de secuencia aminoacídicas para las proteínas codificadas por SEC ID No: 3-33 o 40-4101, según se determina mediante el uso de MegAlign, el algoritmo clustal DNASTar (1998) como se

describe en Higgins, DG y Sharp, PM, Fast and Sensitive Multiple Sequence Alignments on a Microcomputer, CABIOS, 5: 151-153, 1989, ambos incorporados en este documento como referencia.

Los péptidos antimicrobianos descritos en este documento pueden ser mutados o alterados para potenciar o cambiar las propiedades biológicas de la proteína. Esas propiedades biológicas incluyen, pero no se limitan a, la estabilidad *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, vida media), solubilidad, anfifilicidad y diversos aspectos de la actividad antimicrobiana. Esos aspectos de actividad antimicrobiana incluyen, sin limitación, especificidad tisular, selectividad del objetivo microbiano, potencia antimicrobiana de amplio espectro e invarianza en función de los mecanismos de resistencia microbiana. Las mutaciones adecuadas incluyen cambios de aminoácidos individuales, deleciones de uno o más aminoácidos, truncamientos N-terminales, truncamientos C-terminales, inserciones, etc. Los mutantes se pueden generar mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular, incluida la mutagénesis aleatoria y la mutagénesis dirigida como se describe en Current Protocols in Molecular Biology, Unidad 8, pub, John Wiley & Sons, Inc., 2000 e incorporado en este documento como referencia.

La variedad de formulaciones peptídicas consideradas actualmente tiene un valor sustancial porque la variedad en su conjunto tiene un mecanismo de acción que no es susceptible a un mecanismo clave de resistencia microbiana antioxidante conferido por la expresión de la estafiloxantina de membrana. Además, la variación de la secuencia estratégica dentro de la variedad puede aplicarse para contrarrestar las defensas microbianas efectuadas por la distribución de carga de membrana adaptativa correspondiente a la modificación covalente de los lípidos aniónicos, o la mayor expresión de estafiloxantina de membrana.

Los péptidos antimicrobianos descritos en este documento se caracterizan por tener actividad antimicrobiana. Específicamente, los péptidos descritos son capaces de alterar la membrana celular de los microorganismos, lo que lleva a la destrucción del microorganismo.

Los péptidos antimicrobianos generalmente tienen una primera secuencia aminoacídica sintética de fórmula 1 ($Gly-X_1-X_2-X_3-X_1-X_1-X_1-Arg-X_4-X_1-X_5-X_6-X_6-Gly$) en donde X_1 se selecciona del grupo de Leu o Ile; X_2 se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro; X_3 se selecciona del grupo de la Arg o Trp; X_4 se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu; X_5 se selecciona del grupo de Phe o Trp; y, X_6 se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg.

Los péptidos antimicrobianos también pueden tener una segunda secuencia aminoacídica antimicrobiana sintética de la fórmula 1 ($Gly-X_1-X_2-X_3-X_1-X_1-X_1-Arg-X_4-X_1-X_5-X_6-X_6-Gly$) en donde X_1 se selecciona del grupo de Leu o Ile; X_2 se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro; X_3 se selecciona del grupo de Arg o Trp; X_4 se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu; X_5 se selecciona del grupo de Phe o Trp; y, X_6 se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg. El agente antimicrobiano puede incluir un homodímero de péptidos antimicrobianos, donde una primera secuencia antimicrobiana sintética antimicrobiana tiene la misma secuencia que una segunda secuencia antimicrobiana sintética. El agente antimicrobiano puede incluir un heterodímero de péptidos antimicrobianos, donde una primera secuencia antimicrobiana sintética antimicrobiana tiene una secuencia diferente a una segunda secuencia antimicrobiana sintética. Esa diferencia puede ser por una o más secuencias aminoacídicas.

Los péptidos antimicrobianos normalmente varían en longitud de aproximadamente 14 residuos de aminoácidos a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o más residuos de aminoácidos. Preferentemente, los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de 14 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos que incluyen homodímeros de los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de aproximadamente 28 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos que incluyen homodímeros de los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de aproximadamente 35 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos que incluyen heterodímeros de los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de aproximadamente 28 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, los agentes antimicrobianos que incluyen heterodímeros de los péptidos antimicrobianos tienen una longitud de aproximadamente 35 residuos de aminoácidos. Un experto en la técnica reconocerá que la longitud de un homodímero o heterodímero de los péptidos antimicrobianos depende de la longitud del péptido antimicrobiano utilizado en el correspondiente homodímero o heterodímero.

El agente antimicrobiano puede incluir una secuencia enlazadora para conectar una primera secuencia antimicrobiana sintética con una segunda secuencia antimicrobiana sintética. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora conectada a un primer y segundo péptido antimicrobiano produce una formulación de un dímero unida covalentemente. Se pueden usar secuencias de unión adecuadas para mejorar la cinética antimicrobiana. En un aspecto, la secuencia enlazadora potencia la cinética al estimular a la estructura dimerizada a permanecer en una conformación propicia para la actividad antimicrobiana. En un aspecto, la secuencia enlazadora puede usarse para potenciar la liberación del dímero. Esas secuencias de unión pueden incluir formulaciones específicas de aminoácidos que favorecen la solubilidad en los medios polares o lipofílicos. En otro aspecto, la secuencia enlazadora puede usarse para potenciar la estabilidad química dentro de medios diferentes.

Las secuencias de unión adecuadas pueden diseñarse para proporcionar mejoras específicas. Una secuencia enlazadora puede tener una longitud de cualquier tamaño que no altere la actividad antimicrobiana del péptido antimicrobiano. En

algunos aspectos, la secuencia enlazadora puede tener una longitud de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos de aminoácidos. Preferentemente, la secuencia enlazadora tiene una longitud de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácidos. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora tiene una longitud de aproximadamente 7 residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos de la secuencia enlazadora pueden diseñarse para proporcionar mejoras específicas. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora incluye principalmente aminoácidos polares. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora incluye al menos una secuencia de SEQ ID NO: 34-39. En algunos aspectos, la secuencia enlazadora incluye la secuencia de SEQ ID NO: 34.

c. Composiciones Farmacéuticas

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que incluye al menos un agente antimicrobiano descrito en este documento. Para preparar la composición farmacéutica, se sintetiza u obtiene de otro modo un agente antimicrobiano, un péptido antimicrobiano, un homodímero, un heterodímero o combinaciones de los mismos, se purifica según sea necesario o se desee y luego se liofiliza y estabiliza. El agente antimicrobiano puede ajustarse luego a la concentración apropiada y combinarse con otros agentes o portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin limitación, un portador, diluyente, excipiente, sal o combinaciones de los mismos, que sean compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen un agente antimicrobiano descrito en este documento pueden prepararse mediante los procedimientos conocidos en la técnica usando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede formularse con excipientes, diluyentes o portadores comunes, y formarse en tabletas, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, aerosoles y similares. Los ejemplos de excipientes, diluyentes y portadores que son adecuados para esas formulaciones incluyen tampones, así como rellenos y diluyentes tales como almidón, celulosa, azúcares, manitol y derivados de silicio. También se pueden incluir agentes aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y otros derivados de la celulosa, alginatos, gelatina y polivinilpirrolidona.

II. Métodos

Las composiciones de la presente descripción que incluyen al menos un agente antimicrobiano son útiles en los métodos para reducir el crecimiento o la supervivencia de microorganismos. Un experto en la técnica apreciará los numerosos métodos de uso de los agentes antimicrobianos descritos en este documento. Por consiguiente, los métodos incluidos en este documento son ejemplos y no limitan el alcance por el cual se pueden usar los agentes antimicrobianos. Los métodos de la descripción incluyen reducir el crecimiento o la supervivencia de microorganismos, tratar a un sujeto que tiene una infección por microorganismo y tratar a un sujeto que tiene mastitis, así como otros métodos que usan los agentes antimicrobianos descritos en este documento.

Los microorganismos contra los cuales un agente antimicrobiano descrito en este documento es activo incluyen bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, levaduras, hongos, mohos, virus, parásitos unicelulares y otros microorganismos conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma canigenitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Staphylococcus hyicus*, *Coagulase negative staphylococci*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus hyicus*, *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus xylosum*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma* spp. (*Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma alkalescens*), *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*), *Enterobacter* spp. (*E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. agglomerans*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. taylorae*, *E. turicensis*, *E. sakazakii*, *Enterobacter* *solii*), *Citrobacter* spp. (*C. amalonaticus*, *C. braakii*, *C. diversus*, *C. farmeri*, *C. freundii*, *C. gillennii*, *C. koseri*, *C. murlinae*, *C. rodentium*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*), *Proteus* spp. (*P. hauseri*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens*, *P. penneri*, *P. vulgaris*), *Enterococci*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp. (*P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. argentinensis*, *P. borbori*, *P. citronellolis*, *P. flavescens*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. oleovorans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. resinovorans*, *P. straminea*), grupo *P. chlororaphis* (*P. agarici*, *P. asplenii*, *P. aurantiaca*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. corrugata*, *P. fragi*, *P. lundensis*, *P. taetrolens*), grupo *P. fluorescens* (*P. antarctica*, *P. azotoformans*, *P. brassicacearum*, *P. brenneri*, *P. cedrina*, *P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. libanensis*, *P. mandelii*, *P. marginalis*, *P. mediterranea*, *P. meridiana*, *P. migulae*, *P. mucidolens*, *P. orientalis*, *P. panacis*, *P. protegens*, *P. proteolytica*, *P. rhodesiae*, *P. synxantha*, *P. thivervalensis*, *P. tolaasii*, *P. veronii*), grupo *P. pertucinogena* (*P. denitrificans*, *P. pertucinogena*), grupo *P. putida* (*P. cremoricolorata*, *P. fulva*, *P. monteillii*, *P. mosselii*, *P. oryzihabitans*, *P. parafulva*, *P. plecoglossicida*, *P. putida*), grupo *P. stutzeri* (*P. balearica*, *P. luteola*, *P. stutzeri*), grupo *P. syringae* (*P. amygdali*, *P. avellanae*, *P. caricapapayae*, *P. cichorii*, *P. coronafaciens*, *P. ficuserectae*, *P. meliae*, *P. savastanoi*, *P. syringae*, *P. viridiflava*), *incertae sedis* (*P. abietaniphila*, *P. acidophila*, *P. agarici*, *P. alcaliphila*, *P. alkanolytica*, *P. amylocladramosa*, *P. asplenii*, *P. azotifigens*, *P. cannabina*, *P. coenobios*, *P. congelans*, *P. costantini*, *P. cruciviae*, *P. delhiensis*, *P. excubis*, *P. extremorientalis*, *P. frederiksbergensis*, *P. fuscovaginae*, *P. gelidicola*, *P. grimontii*, *P. indica*, *P.*

- jessenii, *P. jinjuensis*, *P. kilonensis*, *P. knackmussii*, *P. koreensis*, *P. lini*, *P. lutea*, *P. moraviensis*, *P. otitidis*, *P. pachastrellae*, *P. palleroniana*, *P. papaveris*, *P. peli*, *P. perolens*, *P. poae*, *P. pohangensis*, *P. protegens*, *P. psychrophila*, *P. psychrotolerans*, *P. rathonis*, *P. reptilivora*, *P. resiniphila*, *P. rhizosphaerae*, *P. rubescens*, *P. salomonii*, *P. segitis*, *P. septica*, *P. simiae*, *P. suis*, *P. thermotolerans*, *P. tremae*, *P. trivialis*, *P. turbinellae*, *P. tuticorinensis*, *P. umsongensis*, *P. vancouverensis* es decir, *P. vranovensis*, *P. xanthomarina*), *Prototheca*, *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus* spp. (*B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. aminovorans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. azotoformans*, *B. badius*, *B. boroniphilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. fastidiosus*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. galliciensis*, *B. globigii*, *B. globisporus*, *B. infernus*, *B. insolitus*, *B. larvas*, *B. laterosporus*, *B. lentimorbus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. macquariensis*, *B. marinus*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. Mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. pasteurii*, *B. polymyxa*, *B. popilliae*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatus*, *B. weihenstephanensis*), *Pasteurella* spp. (*P. aerogenes*, *P. anatis*, *P. avium*, *P. bettyae*, *P. caballi*, *P. canis*, *P. dagmatis*, *P. gallicida*, *P. gallinarum*, *P. granulomatis*, *P. langaaensis*, *P. lymphangitidis*, *P. mairii*, *P. multocida*, *P. oralis*, *P. pneumotropica*, *P. skyensis*, *P. stomatis*, *P. testudinis*, *P. trehalosi*, *P. ureae*, *P. volantium*), *Serratia* spp. (*S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea*, *S. symbiotica*), y otros microorganismos conocidos en la técnica. Esos parásitos unicelulares incluyen, sin limitación, leishmania, treponema, giardia y otros conocidos en la técnica.
- En algunos aspectos, los microorganismos contra los cuales un agente antimicrobiano descrito en este documento es activo también pueden incluir bacterias médicas relevantes. Esas bacterias de relevancia médica pueden incluir, sin limitación, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. saprophiticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*; *Streptococcus agalactiae*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. equisimilis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumonia*, *S. pyogenes*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *S. suis*; *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*; *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*; *Moraxella catarrhalis*, *M. lacunata*, *M. nonliquefaciens*, *M. urethralis*; *Kingella kingae*, *K. denitrificans*; *Eikenella corrodens*; *Bacillus alvei*, *B. anthracis*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*; *Clostridium botulinum*, *C. bifermentans*, *C. butyricum*, *C. carnis*, *C. clostridioforme*, *C. difficile*, *C. fallax*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. ramosum*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. tertium*, *C. tetani*; *Listeria monocytogenes*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Propionibacterium acnes*, *Streptobacillus moniliformis*; *Calymmatobacterium granulomatis*; *Bacteroides distasonis*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus*, *B. vulgatus*; *Fusobacterium mortiferum*, *F. nucleatum*, *F. necrophorum*; *Gemella morbillorum*; *Peptostreptococcus* (*P. anaerobius*, *P. asaccharolyticus*, *P. hydrogenalis*, *P. magnus*, *P. melaninogenica*, *P. micros*, *P. tetradius*, *P. prevotii*); *Porphyromonas* (*P. asaccharolytica*, *P. gingivalis*); *Prevotella* (*P. melaninogenica*, *P. oris*, *P. buccae*); *Veillonella parvula*; *Salmonella choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. gastroenteritis*, *S. paratyphi-A*, *S. schottmuelleri*, *S. typhi*, *S. typhimurium*; *Shigella boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*; *Arcobacter cryaerophila*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*; *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. sputorum*, *C. upsaliensis*; *Helicobacter pylori*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*; *Vibrio cholera*, *V. damsela*, *V. fetus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisiae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*; *Citrobacter freundii*, *C. diversus* (*C. koseri*); *Escherichia coli*; *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*; *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae*; *Proteus mirabilis*; *Serratia marcescens*; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. maltophilia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. putida*, *P. putrefaciens*, *P. stutzeri*; *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. suis*; *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida*; *Yersinia enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Francisella tularensis*; *Haemophilus influenza*, *H. parainfluenzae*, *H. ducreyi*, *H. aegyptius*; *Bordetella avium*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*; *Corynebacterium difteria*, *C. kutscheri*, *C. pseudotuberculosis*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. renale*, *C. xerosis*, *C. ulcerans*; *Mycobacterium africanum*, *M. avium-intracellulare*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. microti*, *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. ulcerans*; *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. caviae*; *Actinomyces bernardiae*, *A. bovis*, *A. denticolens*, *A. gerencseriae*, *A. georgiae*, *A. hordeovulneris*, *A. howellii*, *A. hyovaginalis*, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. neuii*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes*, *A. radingae*, *A. slackii*, *A. suis*, *A. turicensis*, *A. viscosus*; *Propionibacterium propionicus*; *Streptomyces somaliensis*; *Leptospira interrogans*, *L. biflexa*, *Borrelia burgdorferi*; *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. turicatae*; *Spirillum minus*; *Treponema pallidum*, *T. carateum*; *Mycoplasma fermentans*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. penetrans*, *M. pirum*, *M. pneumoniae*; *Ureaplasma urealyticum*; *Rickettsia akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. japonica*, *R. prowazekii*, *R. rickettsii*, *R. sibirica*, *R. typhi*; *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi*, *E. ewingii*, *E. phagocytophila*, *E. platys*, *E. risticii*, *E. sennetsu*; *Orientia tsutsugamushi*; *Coxiella burnetii*; *Bartonella bacilliformis*; *B. henselae*, *B. Quintana*; *Chlamydia pneumoniae*, *C. psittaci*, *C. trachomatis*; *Legionella ansa*, *L. dumollii*, *L. feelei*, *L. micdadei*, *L. pneumophila*, y otras bacterias médicamente relevantes conocidas en la técnica o aún por descubrir.

En algunos aspectos, los microorganismos contra los cuales un agente antimicrobiano descrito en este documento es activo también pueden incluir bacterias veterinarias relevantes. Esas bacterias relevantes pueden incluir, sin limitación, *Acholeplasma laidlawii*; *Acinetobacter lwoffii*; *Actinobacillus equuli*, *A. lignieresii*, *A. pleuropneumoniae*, *A. rossii*, *A. suis*; *Actinobaculum suis*; *Actinomyces bovis*, *A. viscosus*; *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*; *Aliivibrio salmonicida*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Arcobacter butzleri*; *Avibacterium paragallinarum*; *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*; *Bacteroides fragilis*; *Bartonella clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. henselae*, *B. vinsonii*; *Bibersteinia trehalosi*; *B. avium*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*; *Borrelia afzelii*, *B. anserinae*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*; *Brachyspira aalborgi*, *B. alvinipulli*, *B. hyodysenteriae*, *B. intermedia*, *B. pilosicoli*, *B. suanatina*; *Brochothrix thermosphacta*; *Brucella abortus*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. pinnipedialis*, *B. suis*; *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*; *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. lari*, *C. upsaliensis*; *Chlamydia trachomatis*;

- Chlamydophila abortus*, *C. felis*, *C. psittaci*; *Citrobacter freundii*; *Clostridium botulinum*, grupo I, II, III, IV; *Clostridium chauvoei*, *C. difficile*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. piliforme*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. tetani*; *Corynebacterium bovis*, *C. diphtheriae*, *C. kutscheri*, *C. pseudotuberculosis*, *C. renale*, *C. ulcerans*; *Coxiella burnetii*; *Dermatophilus congolensis*; *Dichelobacter nodosus*; *Edwardsiella ictaluri*, *E. tarda*; *Ehrlichia canis*, *E. ruminantium*;
5 *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*; *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Escherichia coli*; *Flavobacterium columnare*, *F. psychrophilum*; *Francisella noatunensis*, *F. tularensis*; *Fusobacterium canifelinum*, *F. equinum*, *F. necrophorum*; *Gallibacterium anatis*; *Haemophilus parasuis*; *Helicobacter hepaticus*, *H. pylori*; *Histophilus somni*; *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*; *Lactobacillus plantarum*; *Lawsonia intracellularis*; *Legionella pneumophila*; *Leptospira borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kirschneri*; *Listeria innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*; *Listonella anguillarum*; *Mannheimia granulomatis*,
10 *M. haemolytica*, *M. varigen*; *Melissococcus plutonius*; *Microcystis aeruginosa*; *Moraxella bovis*, *M. osloensis*; *Morganella morganii*; *Mycobacterium avium*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. tuberculosis*; *Mycoplasma agalactiae*, *M. bovis*, *M. capricolum*, *M. felis*, *M. gallisepticum*, *M. haemofelis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae*, *M. meleagridis*, *M. mycoides*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. suis*, *M. synoviae*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Neorickettsia risticii*; *Sémola Nicoletella*; *Asteroides nocardia*; *Larvas de Paenibacillus*; *Pasteurella caballi*, *P. dagmatis*, *P. multocida*, *P. pneumotropica*;
15 *Peptoniphilus indolicus*; *Plesiomonas shigelloides*; *Prevotella melaninogenica*; *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*; *Pseudomonas aeruginosa*, *P. anguilliseptica*; *Renibacterium salmoninarum*; *Rhodococcus equi*; *Rickettsia prowazekii*, *R. rickettsia*; *Riemerella anatipestifer*; *Salmonella spp.*, *S. enterica*; *Serratia marcescens*; *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*; *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. felis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi*; *Estenotrofomona maltophilia*; *Streptobacillus moniliformis*; *Streptococcus agalactiae*; *S. canis*, *S. devriesei*, *S. dysgalactiae*,
20 *S. equi*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. suis*, *S. uberis*; *Taylorella asinigenitalis*, *T. equigenitalis*; *Treponema pallidum*, *T. paraluisuniculi*, *T. pedis*, *T. phagedenis*; *Trueperella pyogenes*; *Ureaplasma diversum*; *Vibrio alginolyticus*, *V. cholera*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*; *Yersinia enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. ruckeri* y otras bacterias veterinarias relevantes conocidas en la técnica o aún por descubrir.
- 25 El método para reducir el crecimiento o la supervivencia de microorganismos incluye poner en contacto una población de microorganismos con un agente antimicrobiano de la presente descripción. El método puede incluir primero la identificación de una población de microorganismos.
- 30 Los métodos descritos en este documento incluyen métodos de inhibición de la supervivencia o el crecimiento de un microorganismo. El término "inhibir" incluye una disminución en cualquier cantidad detectable, por ejemplo, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, y puede ser determinado por métodos conocidos en la técnica. Los métodos ejemplares para detectar la inhibición incluyen una determinación por conteo, tal como un cultivo bacteriano o un título viral, o mediante la evaluación de uno o más síntomas asociados con la infección por un microorganismo. Los síntomas asociados con la infección por un microorganismo son conocidos en la técnica. Esos síntomas son
35 característicos de un microorganismo infeccioso particular y la condición resultante.
- Una composición que puede favorecer el crecimiento o la supervivencia de un microorganismo puede ponerse en contacto con una cantidad efectiva del agente antimicrobiano de varias maneras. Por ejemplo, si la composición es un producto alimenticio, el agente antimicrobiano se puede agregar directamente al alimento, puede incorporarse a la matriz del
40 material de envase o puede recubrirse sobre el material de envasado, en cuyo caso el agente antimicrobiano puede liberarse durante el almacenamiento, al disolverse el material de encapsulación, al entrar en contacto con la humedad o a una temperatura predeterminada. Si la composición es un fluido corporal, el agente antimicrobiano se puede agregar directamente al fluido corporal.
- 45 Se puede poner en contacto a un sujeto con el agente antimicrobiano de varias maneras, incluyendo, sin limitación, la administración usando las vías comúnmente conocidas en la técnica. Esas vías incluyen la vía oral, parenteral (incluidas las vías subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), rectal, vaginal, dérmica, transdérmica (tópica), transmucosa, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratoria). Los medios de administración pueden ser por inyección, usando una bomba o cualquier otro mecanismo apropiado.
- 50 Un agente antimicrobiano descrito en este documento puede administrarse a un sujeto en dosis única, en dosis múltiples, de manera continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. La administración de los agentes antimicrobianos puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas. Se contempla tanto la administración local como la
55 sistémica.
- La dosis que se administra a un sujeto puede ser cualquier cantidad apropiada para reducir o prevenir la infección o para tratar al menos un síntoma asociado con la infección. Algunos factores que determinan las dosis apropiadas son bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden abordarse con experimentación de rutina. Por ejemplo, la determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y farmacocinéticas se puede realizar mediante el uso de ensayos químicos y biológicos estándar y mediante el uso de las técnicas de modelado matemático conocidas en las técnicas químicas, farmacológicas y toxicológicas. La utilidad terapéutica y el régimen de dosificación pueden extrapolarse de los resultados de esas técnicas y mediante el uso de modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos apropiados. Otros
60 factores dependerán de los parámetros individuales del paciente, que incluyen edad, condición física, tamaño, peso,

condición a tratar, gravedad de la condición y cualquier tratamiento concurrente. La dosificación también dependerá del agente elegido y de si se pretende lograr la prevención o el tratamiento, y si el agente se modifica químicamente.

La cantidad precisa que se administra a un sujeto será responsabilidad del médico a cargo. Sin embargo, para lograr los efectos deseados, un agente antimicrobiano descrito en este documento puede administrarse en dosis únicas o divididas. Por ejemplo, de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 500 a 750 mg/kg, de al menos aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 300 a 500 mg/kg, al menos aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 a 300 mg/kg o al menos aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 a 100 mg/kg de peso corporal, aunque otras dosis pueden proporcionar resultados beneficiosos.

El peso absoluto de un determinado agente antimicrobiano descrito en este documento incluido en una dosis unitaria puede variar ampliamente. Por ejemplo, se pueden administrar aproximadamente 0,01 a aproximadamente 2 g, o aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg, de al menos un agente antimicrobiano. Alternativamente, la dosis unitaria puede variar de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 50 g, de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 35 g, de aproximadamente 0,1 g a aproximadamente 25 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 12 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 8 g, de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 4 g, o de aproximadamente 0,5 g a aproximadamente 2 g.

Las dosis diarias de los agentes antimicrobianos también pueden variar. Esas dosis diarias pueden variar, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 g/día a aproximadamente 50 g/día, de aproximadamente 0,01 g/día a aproximadamente 25 g/día, de aproximadamente 0,1 g/día a aproximadamente 12 g/día, de aproximadamente 0,5 g/día a aproximadamente 8 g/día, de aproximadamente 0,5 g/día a aproximadamente 4 g/día, y de aproximadamente 0,5 g/día a aproximadamente 2 g/día.

Se puede usar un agente antimicrobiano solo o en combinación con un segundo medicamento. El segundo medicamento puede ser un agente antimicrobiano conocido tal como, pero sin limitación, un β -lactámico, un macrólido u otros antibióticos, por ejemplo, azitromicina, doxiciclina, tetraciclina y eritromicina; un agente antifúngico como clotrimazol, nistatina, fluconazol, ketoconazol, anfotericina B, caspofungina o voriconazol; un agente efectivo contra un protozoo como, por ejemplo, metronidazol o timidazol. El segundo medicamento también puede ser un agente antiviral, como abacavir, aciclovir, amantadina, didanosina, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, ganciclovir, Gardasil, lamivudina, nevirapina, nelfinavir, oseltamivir, ribavirina, rimantadina, ritonavir, estavudina, valaciclovir, vidarabina, zalcitabina, zidovudina. La cantidad efectiva del segundo medicamento seguirá las recomendaciones del fabricante del segundo medicamento, el juicio del médico a cargo y se guiará por los protocolos y los factores administrativos para las cantidades y la dosificación como se indica en la PHYSICIAN'S DESK REFERENCE (como se conoce comúnmente en la técnica).

La efectividad del método de tratamiento puede evaluarse monitoreando al sujeto en busca de signos o síntomas de la infección microbiana como se discutió anteriormente, así como determinando la presencia o la cantidad de microorganismos presentes en el sujeto mediante los métodos conocidos en la técnica.

III. Kits

La presente descripción proporciona artículo de fabricación y kits que contienen materiales útiles para el tratamiento de las afecciones descritas en este documento. El artículo de fabricación puede incluir un recipiente de una composición como se describe en este documento con una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que tiene un agente antimicrobiano descrito en este documento, que es eficaz para inhibir el crecimiento de un microorganismo o tratar una afección causada por un microorganismo. La etiqueta en el recipiente puede indicar que la composición es útil para tratar condiciones específicas y también puede indicar instrucciones para la administración.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente por un experto en la técnica. Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de que haya una pluralidad de definiciones para un término en este documento, las de esta sección prevalecerán a menos que se indique lo contrario.

Como se emplea en este documento, "administrar" se usa en su sentido más amplio para referirse al contacto con un sujeto con una composición descrita en este documento.

Como se usa en este documento, el término "actividad antimicrobiana" se refiere a la actividad microbicida o microbiostática o una combinación de las mismas, contra uno o más microorganismos. La actividad microbicida se refiere a la capacidad de matar o causar daño irreversible a un microorganismo objetivo. La actividad microbiostática se refiere a la capacidad de inhibir el crecimiento o la capacidad proliferativa de un microorganismo objetivo sin matarlo necesariamente o dañarlo irreversiblemente.

Como se usa en este documento, el término "identidad" o "identidad de secuencia" se refiere a una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos, así como dos o más secuencias de polinucleótidos, concretamente, una secuencia de referencia y una secuencia dada para comparar con la secuencia de referencia. La identidad de secuencia se determina comparando la secuencia dada con la secuencia de referencia después de que las secuencias se hayan alineado de manera óptima para producir el mayor grado de similitud de secuencia, según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de esas secuencias. Tras esa alineación, la identidad de secuencia se comprueba posición por posición. Por ejemplo, las secuencias son "idénticas" en una posición particular si en esa posición, los nucleótidos o los residuos de aminoácidos son idénticos. El número total de esas identidades de posición se divide entonces por el número total de nucleótidos o residuos en la secuencia de referencia para dar el porcentaje (%) de identidad de secuencia. La identidad de secuencia se puede calcular fácilmente mediante los métodos conocidos, incluidos, pero no limitando, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, AN, et., Oxford University Press, Nueva York (1988), Biocomputación: Informatics and Genome Projects, Smith, DW, ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, AM y Griffin, HG, eds., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo y otros, Applied Math., 48: 1073 (1988), cuyas enseñanzas se incorporan aquí como referencia.

Como se usa en este documento, el término "inhibir" se refiere a una disminución en cualquier cantidad que incluye, sin limitación, un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %.

El término "ácido nucleico" se usa en este documento para referirse a un polímero de ácidos nucleicos de desoxirribosa, así como ácidos nucleicos de ribosa. El término incluye moléculas lineales, así como moléculas circulares cerradas covalentemente. Incluye moléculas monocatenarias, así como moléculas bicatenarias.

Como se usa en este documento, "sujeto" se refiere a un organismo vivo que tiene un sistema nervioso central. En particular, los sujetos incluyen, pero no se limitan, a sujetos humanos o pacientes y animales de compañía. Los ejemplares de animales de compañía pueden incluir mamíferos domesticados (por ejemplo, perros, gatos, caballos), mamíferos con un valor comercial significativo (por ejemplo, vacas lecheras, ganado vacuno, animales deportivos), mamíferos con valores científicos significativos (por ejemplo, especímenes cautivos o libres de especies en peligro de extinción), o mamíferos que de otra manera tienen valor. Los sujetos adecuados también incluyen: ratones, ratas, perros, gatos, ungulados como vacas, cerdos, ovejas, caballos y cabras, lagomorfos como conejos y liebres, otros roedores y primates como monos y simios. En algunos aspectos, los sujetos pueden ser diagnosticados con una infección microbiana, pueden estar en riesgo de una infección microbiana o pueden estar experimentando una infección microbiana. Los sujetos pueden ser de cualquier edad, incluidos recién nacidos, adolescentes, adultos, de mediana edad o de la tercera edad.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en este documento para referirse a una cantidad suficiente que aumente en algún grado beneficioso, preferentemente que aumente en al menos aproximadamente 1 a 100 por ciento, con mayor preferencia en al menos aproximadamente 5 a 95 por ciento, y con mayor preferencia en al menos 8 por ciento o más, la mejora de la cura o en la infección en comparación con los controles no tratados. Una "cantidad efectiva" es una cantidad farmacéutica efectiva que está destinada a calificar la cantidad de un agente o compuesto, que cuando se administra a un sujeto, logrará el objetivo de curar un lugar infectado, inhibir el crecimiento de un microorganismo, o beneficiar de otra manera el ambiente receptor.

El término "variante" se refiere a las secuencias de nucleótidos o aminoácidos que tienen secuencias similares y que funcionan de la misma manera.

Las designaciones de aminoácidos pueden incluir designaciones de nombre completo, de tres letras o de una sola letra, como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción.

Como se podrían realizar varios cambios en las composiciones y los métodos anteriores sin apartarse del alcance de la descripción, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que figuran a continuación, se interprete como ilustrativa y no en un sentido limitante.

55 Ejemplos

Ejemplo 1: Actividad antimicrobiana de agentes antimicrobianos.

Los agentes antimicrobianos descritos son derivados de la SEQ. ID. NO.: 3, que tiene 14 aminoácidos y un amplio espectro de actividad antimicrobiana. Los agentes antimicrobianos de la descripción se sintetizaron y analizaron para evaluar la actividad antimicrobiana. Inicialmente, el agente antimicrobiano de SEQ ID NO.: 3 se evaluó por la inhibición de patógenos clínicos aislados de la mastitis común (Tabla 1).

Tabla 1. La actividad antimicrobiana del agente antimicrobiano de SEQ ID NO.: 3 se expresa como concentración inhibitoria mínima (MIC).

Aislamiento clínico de patógenos	MIC (μ M)	Cepa de bacterias
335 BS	12,5	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
335 B-15	25,0	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
404 C-18	12,5	Especies de <i>Corynebacterium</i>
416 B-10	25,0	<i>Staphylococcus aureus</i>
331 C-10	25,0	<i>Staphylococcus aureus</i>
422 C-10	25,0	<i>Staphylococcus aureus</i>

Se evaluaron agentes antimicrobianos adicionales para determinar la actividad antimicrobiana, incluidos 23 análogos computacionalmente derivados de SEQ ID NO: 3. Estos análogos se agruparon en dos series funcionales, incluyendo aquellas sintetizadas para mejorar la helicidad (Tabla 2; AP) y aquellas sintetizadas para potenciar la actividad (Tabla 2; IND, QT y WX). La actividad antimicrobiana de los análogos sintéticos proporcionados en la Tabla 2 fue evaluada mediante el uso de técnicas estándar como las descritas en Sang y otros 2007 Dev. Comp. Immunol, e incorporadas en este documento por referencia. En base a los datos recopilados, se identificaron tres agentes antimicrobianos sintéticos (Tabla 2, filas sombreadas) que tienen una actividad antimicrobiana superior comparado con el agente de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 19 (tabla 2).

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de los análogos contra el *Staphylococcus aureus* expresada como concentración mínima inhibitoria

Péptido	Puntaje helicoidal	MW	MIC
A (SEQ ID NO: 3)	3.64	1774.8	16.0
B (SEQ ID NO: 4)	11.12	1748.84	64.0
C (SEQ ID NO: 5)	14.39	1776.22	>256.0
D (SEQ ID NO: 6)	20.37	1790.25	>256.0
E (SEQ ID NO: 7)	3.72	1744.18	256.0

	F (SEQ ID NO: 8)	13.13	1718.14	8.0
5	G (SEQ ID NO: 9)	16.91	1746.19	16.0
	H (SEQ ID NO: 10)	23.70	1760.22	16.0
10	I (SEQ ID NO: 11)	3.12	1774.21	16.0
	J (SEQ ID NO: 12)	9.80	1748.17	>256.0
15	K (SEQ ID NO: 13)	12.75	1776.22	>256.0
	L (SEQ ID NO: 14)	18.22	1790.25	>256.0
	M (SEQ ID NO: 15)	3.15	1744.28	>256.0
25	N (SEQ ID NO: 16)	11.47	1718.14	4.0
	O (SEQ ID NO: 17)	14.84	1746.19	4.0
30	P (SEQ ID NO: 18)	18.73	1760.22	64.0
	IND (SEQ ID NO: 19)	3.64	1901.27	64.0
35	Q (SEQ ID NO: 20)	0.17	1758.16	>256.0
40	R (SEQ ID NO: 21)	13.2	1783.22	32.0
45	S (SEQ ID NO: 22)	21.7	1767.17	256.0
	T (SEQ ID NO: 23)	11.7	1831.22	>256.0
50	W (SEQ ID NO: 24)	5.0	1788.19	>256.0
55	X (SEQ ID NO: 25)	6.2	1797.20	>256.0

Ejemplo 2. Análisis estructural/funcional de los agentes antimicrobianos.

Se evaluaron los mecanismos de estructura/función para los agentes antimicrobianos descritos en este documento. Con el fin de desarrollar una mejor comprensión de los efectos de diferentes aminoácidos en diferentes posiciones, así como desarrollar el péptido o los péptidos sintéticos más activos y estables desde el punto de vista biológico, se utilizó el Modelado de las Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (QSAR) para guiar la optimización de formulaciones antimicrobianas multi-fármaco resistentes al *Staphylococcus aureus*.

Entre los cuatro mecanismos principales para la acción peptídica celular antimicrobiana, dos modelos (el del tapón del barril y el del poro toroidal) requieren péptidos helicoidales anfifílicos estables, y un tercero (difusión en el plano) requiere una significativa estabilización intramolecular que se puede lograr por elementos estructurales secundarios (hélices o

hojas) o por elementos estructurales terciarios (enlaces disulfuro o puentes salinos) que pueden garantizar la preservación de la anfifilicidad peptídica. Para las familias de péptidos que se sabe que poseen actividad antimicrobiana y tienen aspectos estructurales indicativos de formación de hélice (es decir, pocas o ninguna prolina; secuencia con alternancia polar - no polar en un período de aproximadamente 4 monómeros), es razonable suponer que la conformación bioactiva del péptido es helicoidal y que el mecanismo de acción es uno de los tres enumerados anteriormente. A partir de esta suposición, los agentes antimicrobianos proporcionados en este documento se han diseñado para tener una alta propensión helicoidal (como se predice a través del software Agadir) y para mostrar una anfifilicidad sustancial en la conformación helicoidal. Esos atributos se representan en la Figura 5 para uno de los agentes antimicrobianos más potentes descritos en este documento, SEQ ID NO: 17.

La firma clásica del modelo del tapón de barril es una alternancia periódica de parches hidrófobos, aniónicos, hidrófobos y catiónicos, lo que permite que los péptidos se autoensamblen electrostáticamente en las membranas celulares en los poros estables que excluyen los lípidos circundantes y comprometen la integridad de la membrana. Los agentes antimicrobianos descritos en este documento son estrictamente catiónicos, obviando así el modelo del tapón del barril ya que un péptido dado generalmente se asocia más preferentemente con el medio lipídico que con otros péptidos. Sin embargo, todavía pueden interferir significativamente con la membrana a través de cualquiera de los dos modelos posibles restantes representados en la Figura 7.

Los altos grados de estabilidad helicoidal y anfifilicidad evidentes en las formulaciones de péptidos sugieren fuertemente o bien la formación de poros toroidales que abarcan las membranas celulares de los microbios induciendo la fuga de iones celulares (Figura 7A), o también la formación de dímeros cuyas interacciones selectivas lipídicas alteran la regularidad geométrica y estabilidad de la membrana lipídica, donde estas interacciones incluyen interacciones de cationes peptídicos con aniones lipídicos, y la alteración del péptido arilo de las interacciones lipídicas alifáticas/alifáticas.

En base a los ejemplos descritos en este documento, las formulaciones de los péptidos antimicrobianos potentes basadas principalmente en la mejora de los perfiles de la propensión helicoidal y de la anfifilicidad sugieren que la actividad observada surge de uno de los dos mecanismos anteriores. La naturaleza altamente sistemática de los péptidos (rigurosamente hidrófobos, excepto las argininas en cada cuarta o quinta posición) argumenta a favor del modelo más estructuralmente regular de un poro toroidal (que podría asumir funcionalmente el papel de un canal voltaje-dependiente para comprometer el pH celular según el péptido KvAP). Sin embargo, la corta longitud de los péptidos del agente antimicrobiano (-21 Å de extremo a extremo en la conformación helicoidal) implica que pueden no ser lo suficientemente largos como para atravesar la membrana, lo que argumentaría a favor del modelo de difusión en el plano.

Se han resuelto algunas reglas cualitativas muy básicas para explicar las tendencias observadas de la actividad antimicrobiana.

1) Dado el Trp en la posición 4 de secuencia, la actividad del péptido es proporcional a la compacidad estérica del residuo lipofílico en la posición 3 (es decir, Pro> Ala> Val> Leu), lo que sugiere que la compacidad espacial es óptima hacia el extremo N-terminal del péptido,

2) Si la posición 4 tiene algo más que un gran lipófilo, la deformación del segmento principal inducida por la prolina es intolerable en la posición 3, y la prolina no se tolera en ninguna otra posición,

3) Dada la Arg en la posición 4, la actividad peptídica varía de acuerdo con Ala-3> Val-3> Leu-3> Pro-3, lo que quiere decir que la compacidad espacial es deseable, pero la deformación del segmento principal inducida por la prolina es inaceptable en este caso, y

4) El intercambio de los residuos en las posiciones 12 y 13 no tiene un efecto importante sobre la actividad, pero los cambios significativos en solo uno de estos residuos matan la actividad, lo que indica que el equilibrio lipofílico/electropositivo en esta región es crítico para la actividad.

Para diferenciar entre los dos mecanismos de paradigmas de acción descritos en la sección anterior, una estrategia sería sustituir selectivamente los residuos aromáticos (es decir, Phe, Trp) por alifáticos (Ile, Leu) y viceversa. Estas sustituciones generalmente deben preservar la anfifilicidad que se requiere en ambos modelos, y algunas sustituciones pueden potenciar la estabilidad helicoidal (que también favorece a ambos modelos), sin embargo, su efecto puede variar de la siguiente manera:

a) Los grupos arilo, siendo planos, son más compactos que los grupos alquilo ramificados en las cadenas laterales de la Ile y Leu y se apilan mejor con los grupos planos de las guaninas en las argininas requeridas, lo que puede favorecer la formación de poros ordenados que interactúan bien con la membrana, mientras que

b) Los grupos alquilo son intrínsecamente más atractivos para el medio lipídico donde predomina el alquilo, pero su naturaleza ramificada tiende a producir más desorden estructural según el escenario de difusión en el plano.

Después de dilucidar algunas tendencias importantes de la estructura/función, se realizaron cálculos de Agadir sobre sustituciones conservadoras (es decir, aquellas que cambian un poco pero no mucho el tamaño y el carácter electrostático de un residuo) para optimizar aún más la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos WB. Por lo tanto, los péptidos

enumerados a continuación (SEQ ID NO: 26-33) fueron sintetizados y evaluados para capitalizar su estabilidad helicoidal (Tabla 3).

Tabla 3. Agentes antimicrobianos optimizados para la estabilidad helicoidal.

Péptido	Secuencia
WB14-F1 (SEQ ID NO: 26)	GLARILLRLLFFRG
WB14-N1 (SEQ ID NO: 27)	GLARILLRLLFRFG
WB14-O1 (SEQ ID NO: 28)	GLVRILLRLLFRFG
WB14-O2 (SEQ ID NO: 29)	GLVRILLRLLLRFG
WB14-O3 (SEQ ID NO: 30)	SLVRILLRLLLRFG
WB14-O4 (SEQ ID NO: 31)	GLTRILLRLLLRFG
WB14-O5 (SEQ ID NO: 32)	GLVRILLRLLLRYG
WB14-O6 (SEQ ID NO: 33)	GLVRILLRLLLRFS

Ejemplo 3. La actividad antimicrobiana de los análogos de agentes antimicrobianos.

Los análogos de los agentes antimicrobianos adicionales optimizados para la estabilidad helicoidal en el Ejemplo 2 (Tabla 3) fueron evaluados para la actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de los análogos sintéticos proporcionados en la Tabla 3 fue evaluada mediante el uso de técnicas estándar como las descritas en Sang y otros 2007 Dev. Comp. Immunol, e incorporadas en este documento por referencia. La actividad antimicrobiana de los agentes se proporciona en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los agentes optimizados de estabilidad helicoidal contra *Staphylococcus aureus* (Concentración Mínima Inhibitoria: MIC en µg/ml).

Péptido	SEQ ID No.	Secuencia	MIC duplicados
WB14-A	SEQ ID NO: 3	GLPWILLRWLFFRG	8.0, 16.0
WB14-F	SEQ ID NO: 8	GLARILLRWLFFRG	2.0, 4.0
WB14-N	SEQ ID NO: 16	GLARILLRWLFRFG	4.0, 4.0
WB14-O	SEQ ID NO: 17	GLVRILLRWLFRFG	16.0, 8.0
WB14-F1	SEQ ID NO: 26	GLARILLRLLFFRG	8.0, 8.0
WB14-N1	SEQ ID NO: 27	GLARILLRLLFRFG	128, 128
WB14-O1	SEQ ID NO: 28	GLVRILLRLLFRFG	64, 128
WB14-O2	SEQ ID NO: 29	GLVRILLRLLLRFG	256, 128
WB14-O3	SEQ ID NO: 30	SLVRILLRLLLRFG	128, 128
WB14-O4	SEQ ID NO: 31	GLTRILLRLLLRFG	256, 256
WB14-O5	SEQ ID NO: 32	GLVRILLRLLLRYG	64, 128
WB14-O6	SEQ ID NO: 33	GLVRILLRLLLRFS	> 256, >256

Los resultados indicaron que el agente antimicrobiano que tiene SEQ ID NO: 8 fue el péptido sintético antimicrobiano más eficaz. La actividad antimicrobiana de SEQ ID NO: 8 se evaluó adicionalmente contra aislados clínicos de bacterias que causan mastitis (Tabla 5).

Tabla 5. La actividad antimicrobiana in vitro del péptido WB-14F (SEQ ID NO.: 8) contra aislados clínicos de bacterias que causan mastitis.

Aislamiento Clínico	Cepa bacteriana	Resistencia a múltiples fármacos	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
335-B05	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	++	8,0
335-B15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++++	16,0
404-C18	Especies de <i>Corynebacterium</i>	++	16,0
416-B10	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	2,0
212-B05	<i>Escherichia coli</i>	++	4,0
BAA 44 * (ATCC)	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++++	4,0
El WB-14F se sintetizó bajo las siguientes condiciones: > 95% de pureza; Sal de TFA; Todos eran L-aminoácidos; Sin modificación terminal; * ATCC cat. No. BAA 44.			

Ejemplo 4. Análisis in vivo de la actividad antimicrobiana.

El agente antimicrobiano de SEQ ID NO: 8 se evaluó mediante el uso de un modelo in vivo de infección bacteriana para evaluar la actividad antimicrobiana del agente. Se usaron los siguientes métodos y materiales.

Cepa bacteriana. *Staphylococcus aureus* se aisló de la leche de vacas lecheras con mastitis clínica (Centro de Diagnóstico de Enfermedades del Ganado, Universidad de Kentucky, Lexington, KY). A su llegada, se rayaban las bacterias en placas de agar sangre (TSA + 5 % de sangre de oveja de Remel, Kansas City, MO) y se cultivaban a 37 °C durante 24 horas. Una nueva colonia bacteriana individual recogida de la placa de agar se inoculó en 10 ml de caldo Muller Hinton II (MHB) y se cultivó a 37 °C durante 4-6 horas hasta alcanzar una absorbancia de 0,8 con un filtro de espectrofotómetro de 625 nm. A esta absorbancia, se ha documentado que el MHB contiene 1×10^5 Unidades formadoras de colonias (UFC) en un volumen de 50 μL .

Síntesis del péptido de defensa del huésped búfalo de agua. El péptido WB-14F (SEQ ID NO: 8; GLARILLRWLFFRG) se sintetizó químicamente (Peptide2.0; Chantilly, VA). Después de la síntesis, la molécula WB-14F eluyó en un solo pico en el RP-HPLC, y se confirmó por Espectrometría de Masas. La pureza final del péptido fue > 97 % con un peso molecular de 1718,4. El péptido se liofilizó y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Modelo de ratón de la Mastitis. Para el experimento, se usaron 56 ratones Balb/c hembra (BW ~ 50 g) a los 7-10 días de lactancia. Se usaron cuatro grupos de $n = 14$ ratones para cada experimento como se describe a continuación. Para la inoculación intramamaria, el protocolo descrito por Chandler (J. Med. Microbiol. V3; 273-282: 1970) con modificaciones menores. Brevemente, las madres lactantes fueron separadas de las crías 4 horas antes de la inoculación. Luego, a las crías se les permitió amamantar durante 1 hora antes de la inoculación para vaciar las glándulas mamarias. Los crías se separaron nuevamente de la madre y nunca más se reunieron con ella después. Después de eso, los ratones fueron anestesiados con una combinación de Tiletamina/Zolazepam (Zoletil® 100, Virbac) a una dosis de 100 mg/kg IM, y las glándulas mamarias se desinfectaron con alcohol al 70 %. Usando un microscopio estereoscópico, se inoculó intramamariamente 50 μL de la suspensión preparada previamente de *S. aureus* (que contiene 1×10^5 UFC). Las inyecciones se realizaron lentamente, usando una aguja 33 G (Hamilton, Kent, Reino Unido), en los pezones abdominales izquierdo y derecho (L4 y R4). Después de la inoculación, a los ratones se les permitió recuperarse de la anestesia.

Efecto terapéutico del WB-14F en comparación con los grupos controles y los grupos tratados con antibióticos. Los ratones ($n = 14/\text{grupo}$) fueron tratados intramamariamente usando la técnica estereoscópica de la siguiente manera: Grupo 1: WB-14F (32 μg diluido en 50 μL de PBS estéril por glándula); Grupo 2: Control, solución salina tamponada con fosfato estéril (50 μL por glándula); Grupo 3: Ceftiofur (400 μg diluidos en 50 μL de aceite mineral por glándula); Grupo 4: infectado pero no tratado. Todos los grupos (excepto el Grupo 4) recibieron los tratamientos 24 horas después de la infección cada 24 horas por 3 días consecutivos (total de 3 tratamientos).

Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en glándulas mamarias. Todos los ratones fueron sacrificados (usando CO_2) siguiendo las directrices de la eutanasia de la AVMA 24 horas después del último tratamiento. Las glándulas mamarias infectadas (L4 y R4) se extrajeron de manera individual mediante disección de tejidos blandos y se homogeneizaron en 1 ml de PBS estéril en tubos Falcon mediante el uso de un homogeneizador de tejido Polytron (Kinematica, Suiza). Diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , y 10^{-3}) de los homogenizados se colocaron en placas cuantitativamente para determinar el número de UFC por glándula. Los resultados se reportaron como el promedio de los resultados de las dos glándulas (L4 y R4) de cada animal.

Análisis estadístico. La prueba de Kruskal-Wallis con la prueba posterior de Dunn se realizó usando el software GraphPad Prism Versión 5.0a para Mac, GraphPad Software, San Diego, California, EE. UU. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$) entre los grupos (Figura 5), con la prueba post-hoc que muestra una diferencia entre el WB-14F y los tres grupos de control (PBS, ATBX y N1901.27on-Tx) con un nivel de significancia del 5 %.

Ejemplo 5. Análisis estructural/funcional de agentes antimicrobianos de dímeros peptídicos unidos.

Un componente clave del diseño preliminar y el cribado de las formulaciones del dímero peptídico de enlace covalente implicaba el uso de simulaciones de dinámica molecular.

- 5 La dependencia observada de la actividad específica de secuencia en los estudios in vivo se corrobora estrechamente por las interacciones intradímeras observadas en las simulaciones de dinámica molecular de dímeros peptídicos no enlazados (no covalentes). Las simulaciones posteriores de dinámica molecular han producido pruebas contundentes de que las interacciones evidentes en los dímeros no covalentes (que se muestran gráficamente en la figura 3) se conservan o amplifican en dímeros con enlaces covalentes especialmente formulados (como se muestra en la figura 4).
- 10 Las características estructurales claves de los sistemas de dímeros de unión covalente y no covalentes que mejor corroboran las actividades experimentales in vivo incluyen 1) preservación de la estructura helicoidal del monómero, 2) retención del acoplamiento lipófilo y electrostático del intradímero, además de una fuerte evidencia de las dos interacciones intermoleculares siguientes: 3) acoplamiento no polar membrana/péptido por medio del cual los aminoácidos peptídicos de anillo interactúan con los lípidos de membrana para insertar grupos anillos entre las moléculas individuales de lípidos, y 4) acoplamiento electrostático membrana/péptido entre residuos catiónicos de péptidos y grupos aniónicos cabezas de lípidos. Para cada una de estas cuatro clases de interacción, se definieron métricas cuantitativas específicas basadas en el porcentaje relativo del tiempo de simulación en el cual los átomos específicos del péptido residen dentro de distancias establecidas de átomos específicos de las parejas de interacción intramolecular o intermolecular. Específicamente, se usó la preservación constante de distancias interatómicas no polares de no más de 4.0 Angstroms para identificar la preservación de las características no polares claves, y se usó la preservación constante de distancias interatómicas polares de no más de 2,5 Angstroms para identificar la preservación de las características polares claves.
- 15 Las cuatro características estructurales descritas anteriormente fueron encontradas a través de simulaciones de dinámica molecular que están particularmente bien conservadas o amplificadas por las siguientes formulaciones de enlaces covalentes específicos: DNNNNNN (SEQ ID NO: 34); DGGGGGG (SEQ ID NO: 38); DNNNNN (SEQ ID NO: 35); y, DGGGGG (SEQ ID NO: 37), en donde cada uno de los casos anteriores el extremo N-terminal de la secuencia enlazadora se acopla covalentemente a través de un enlace peptídico normal al extremo C-terminal del primer monómero peptídico, y el extremo C-terminal de la secuencia enlazadora se acopla covalentemente a través de un enlace peptídico normal al extremo N-terminal del segundo monómero peptídico.
- 20 La invención descrita de manera representativa en este documento puede practicarse adecuadamente en ausencia de cualquier elemento, que no se describe específicamente en este documento. Sin embargo, es evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchos cambios, variaciones, modificaciones, otros usos y aplicaciones del método, y también cambios, variaciones, modificaciones, otros usos y aplicaciones que no se aparten del alcance de la descripción son considerados cubiertos por la descripción, que está limitada solo reivindicaciones que siguen.
- 25
- 30
- 35

REIVINDICACIONES

1. Una composición antibiótica que comprende un péptido antibiótico, en donde el péptido comprende una secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4103:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-X₆-Gly en donde
 5 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu o Ile,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 10 X₆ se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg.

2. Una composición antibiótica que comprende un péptido antibiótico, en donde el péptido comprende una secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4102:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-X₆-Gly en donde
 15 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 20 X₆ se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg.

3. Una composición antibiótica que comprende un péptido antibiótico, en donde el péptido comprende:
 - a. una primera secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4103:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-X₆-Gly en donde
 25 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu o Ile,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu,
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 30 X₆ se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg;
 - b. una segunda secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4103:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-X₆-Gly en donde
 35 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu o Ile,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile, o Leu,
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 X₆ se selecciona del grupo de Phe, Trp o Arg; y,
 - c. una secuencia enlazadora, en donde la secuencia enlazadora conecta operativamente la primera secuencia aminoacídica y la segunda secuencia aminoacídica.

4. Una composición antimicrobiana que comprende un péptido antibiótico, en donde el péptido comprende:
 - a. una primera secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4102:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-Arg-X₆-Gly en donde
 45 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 50 X₆ se selecciona del grupo de Phe o Trp;
 - b. una segunda secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4102:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-Arg-X₆-Gly en donde
 55 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
 X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro,
 X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
 X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu
 X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
 X₆ se selecciona del grupo de Phe o Trp; y,
 - c. una secuencia enlazadora, en donde la secuencia enlazadora conecta operativamente la primera secuencia aminoacídica y la segunda secuencia aminoacídica.

5. Una composición antimicrobiana que comprende un péptido antibiótico, en donde el péptido comprende:
 - a. una primera secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4103:
 Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-X₆-Gly en donde
 65 X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,

- X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu o Ile,
X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu,
X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
X₆ se selecciona del grupo de Phe o Trp;
b. una segunda secuencia aminoacídica sintética que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4102:
Gly-X₁-X₂-X₃-X₁-X₁-Arg-X₄-X₁-X₅-Arg-X₆-Gly en donde
X₁ se selecciona del grupo de Leu o Ile,
X₂ se selecciona del grupo de Ala, Val, Leu, Ile o Pro,
X₃ se selecciona del grupo de Arg o Trp,
X₄ se selecciona del grupo de Trp, Ile o Leu,
X₅ se selecciona del grupo de Phe o Trp, y
X₆ se selecciona del grupo de Phe o Trp; y,
c. una secuencia enlazadora, en donde la secuencia enlazadora conecta operativamente la primera secuencia
aminoacídica y la segunda secuencia aminoacídica.
6. La composición antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición inhibe el crecimiento de microorganismos.
 7. La composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, hongos, levaduras, mohos y combinaciones de los mismos.
 8. La composición antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacteria*, *Haemophilus*, y combinaciones de los mismos.
 9. La composición antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además un portador farmacéutico.
 10. La composición antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 9, en donde la secuencia aminoacídica sintética tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia para SEC ID No: 8.
 11. Un método *in vitro* para la inhibición del crecimiento de un microorganismo que comprende poner en contacto el microorganismo, durante un tiempo y bajo condiciones efectivas para inhibir el crecimiento del microorganismo, con una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 10.
 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, hongos, levaduras, mohos y combinaciones de los mismos.
 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacteria*, *Haemophilus*, y combinaciones de los mismos.
 14. El método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinomyces pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, y combinaciones de los mismos.
 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde el crecimiento de un microorganismo se inhibe en al menos 10 %.
 16. Una composición antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el uso en el tratamiento de una infección microbiana.
 17. La composición antimicrobiana para el uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición antibiótica comprende además un portador farmacéutico.
 18. La composición antimicrobiana para el uso de acuerdo con la reivindicación 16 o 17, en donde dicha composición antimicrobiana inhibe el crecimiento de un microorganismo que causa infección por mastitis en al menos 10 %.
 19. Una composición antimicrobiana de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para el uso en el tratamiento de la mastitis.
 20. La composición antimicrobiana para el uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la composición antibiótica se administra al tejido mamario del sujeto.

21. La composición antimicrobiana para el uso de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en donde dicha composición antimicrobiana inhibe el crecimiento de un microorganismo que causa infección por mastitis en al menos 10 %.

Figura 1

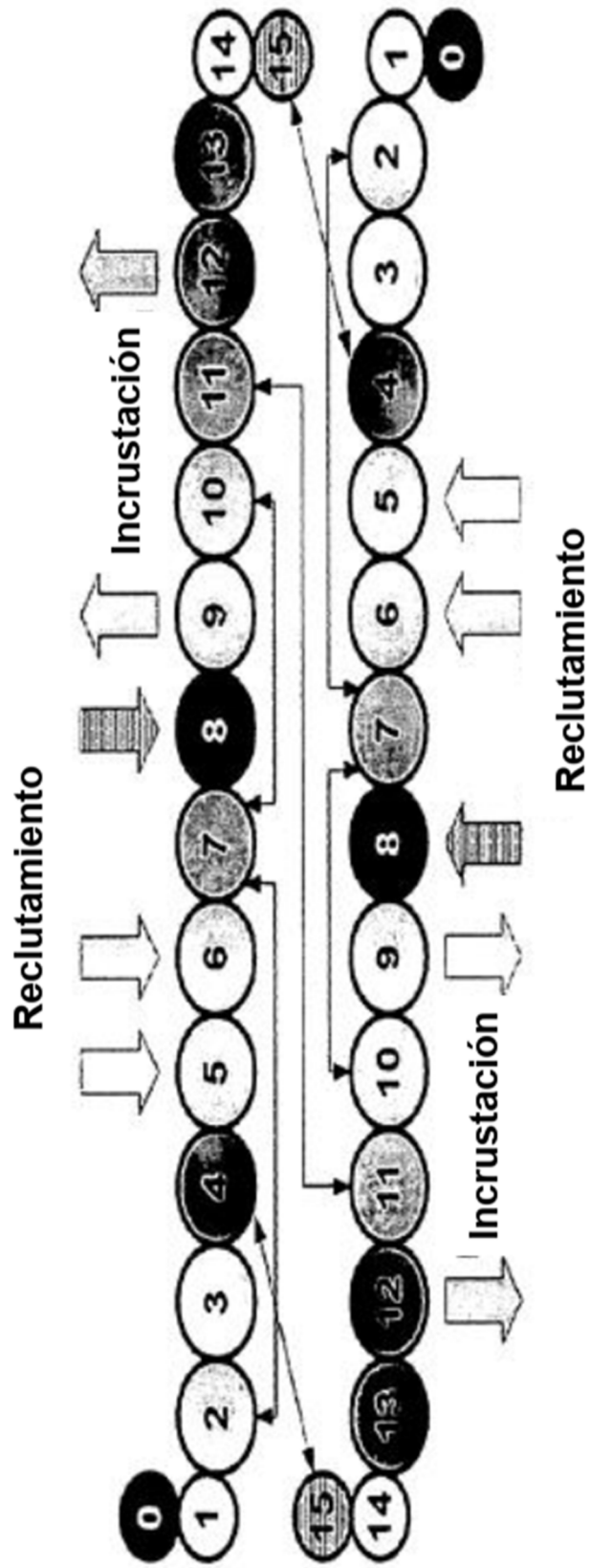


- 1 = G
- 2 = L o I
- 3 = [(A o V o I o L) si 4 = R] o [(P) si 4 = W]
- 4 = [(R) si 3 = (A o V o I o L)] o [(W) si 3 = P]
- 5 = I o L
- 6 = L o I
- 7 = L o I
- 8 = R
- 9 = W o I o L
- 10 = L o I
- 11 = F o W
- 12 = [(F o W) si 13 = (R)] o [(R) si 13 = (F o W)]
- 13 = [(R) si 12 = F o W] o [(F o W) si 12 = (R)]
- 14 = G



Figura 2

Figura 3



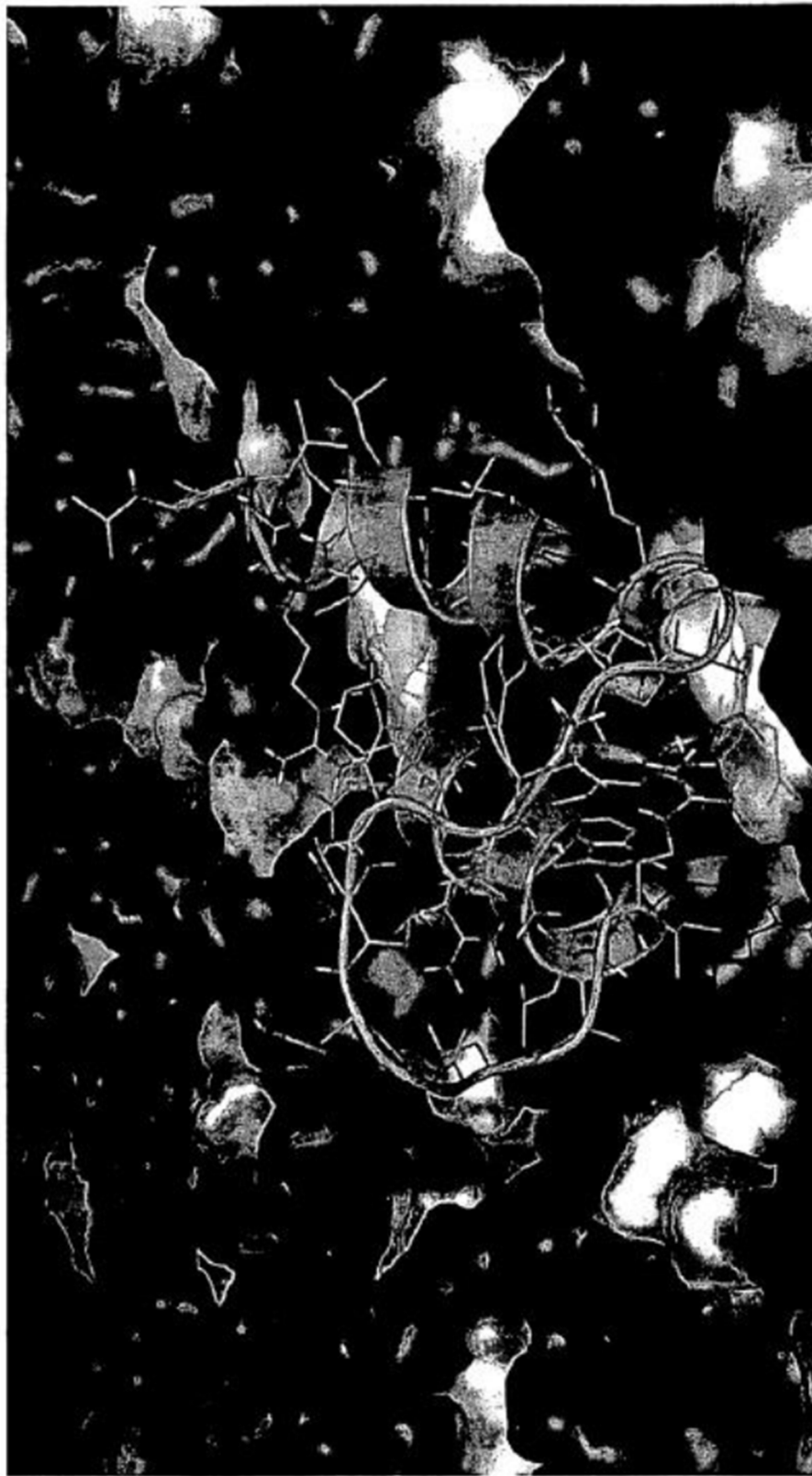


Figura 4

Figura 5

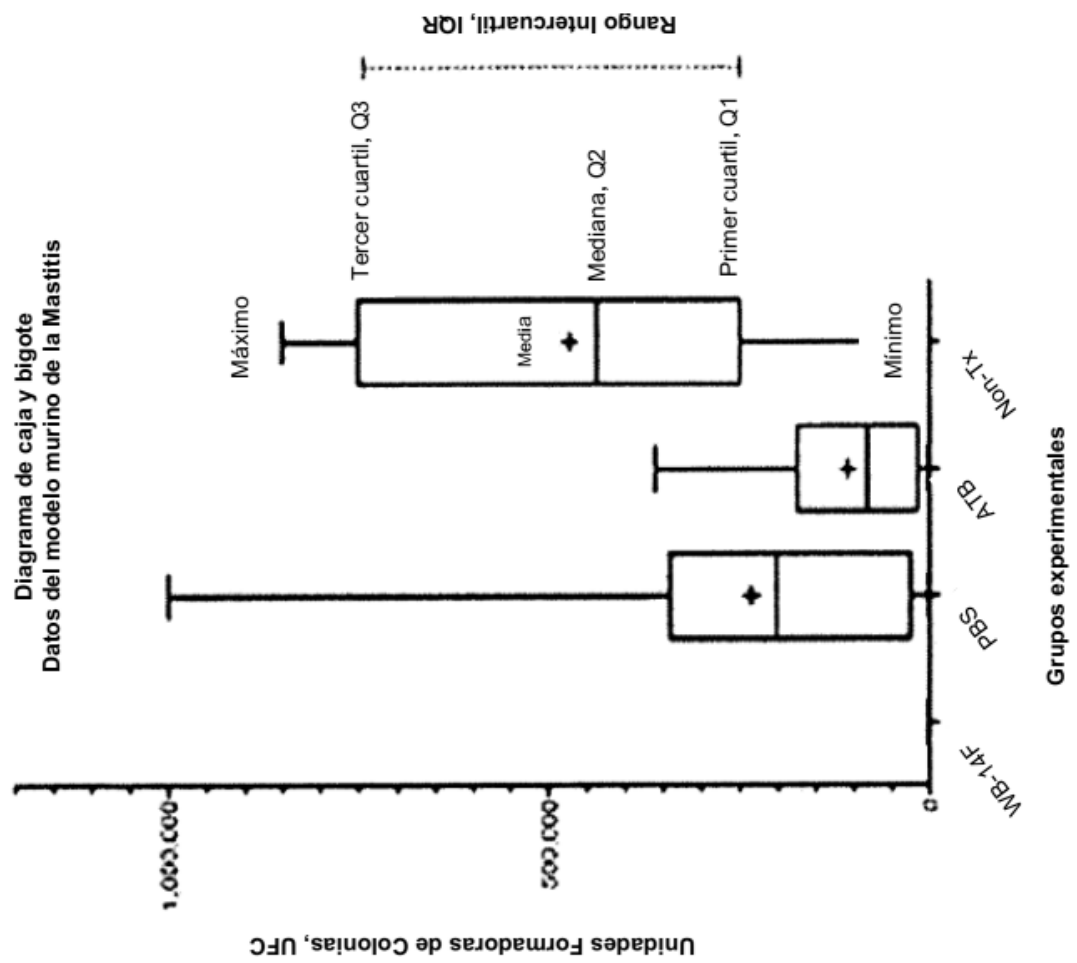




Figura 6

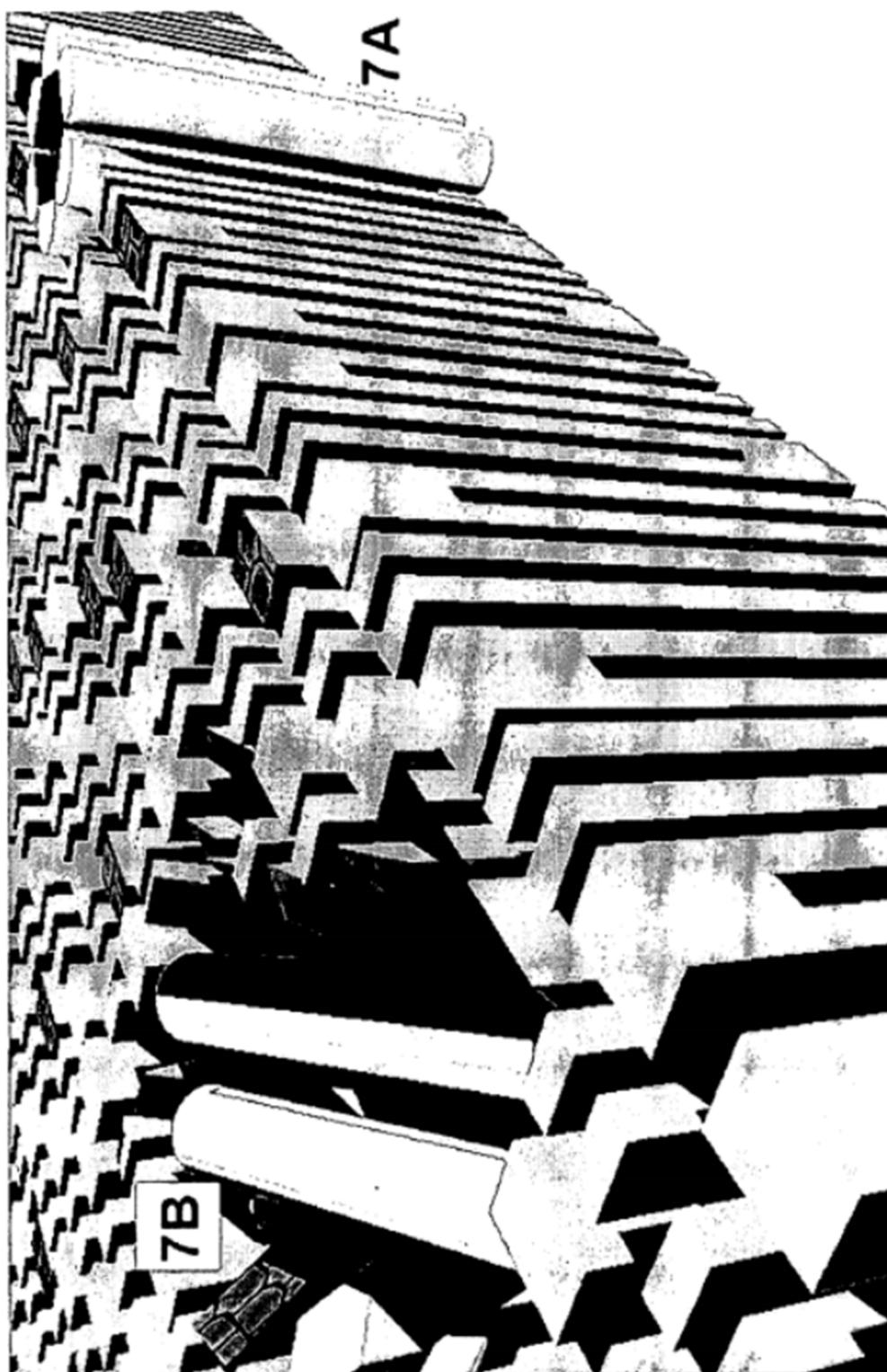


Figura 7