



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 879**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05778505 .7**
96 Fecha de presentación : **18.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778720**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Peptidos antimicrobianos comprensivos de un motivo que contiene arginina y/o lisina.**

30 Prioridad: **18.08.2004 GB 0418414**
14.03.2005 US 79795

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.02.2011

73 Titular/es: **NOVABIOTICS LIMITED**
Cruickshank Building Craibstone
Aberdeen AB21 9TR, GB

72 Inventor/es: **O'Neil, Deborah**

74 Agente: **García Egea, Isidro José**

ES 2 351 879 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

Péptidos antimicrobianos comprensivos de un motivo que contiene arginina y/o lisina.

5 La presente invención proporciona péptidos antimicrobianos. La invención se relaciona adicionalmente con composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos antimicrobianos y el uso de los péptidos en el tratamiento de, entre otras, las infecciones microbianas.

10 Una familia principal de péptidos antibacterianos endógenos, los beta-defensinas, son secretados por las células epiteliales que surcan los conductos digestivos, respiratorios y genitourinarios de los mamíferos superiores. Son también producidos por keratinocitos en el interior de la piel. Su papel principal es el de proporcionar una primera línea de defensa esencial contra las infecciones que se produzcan por estos conductos por organismos patógenos.

15 Las defensinas son una de las clases más investigadas de péptidos antimicrobianos. Esta clase consiste de moléculas ricas en cisteína con tres puentes disulfidos. Se encuentran en plantas, insectos y diversos mamíferos. En los humanos, se encuentran dos clases de defensinas que difieren entre sí en cuanto a espaciamiento y vinculaciones entre los seis residuos de cisteína. La primera de estas clases es la de alfa-defensinas (seis tipos) que han sido aisladas a partir de los neutrófilos (HNP1-4, péptido neutrófilo humano) y en las células de paneth del conducto gastrointestinal (alfa-defensinas 5 y 6). La segunda clase, las beta-defensinas, son más largas, más básicas y se manifiestan a lo largo de
20 en el interior de los conductos digestivo, respiratorio y urogenital y la piel. La hBD1 (beta-defensina humana 1) es secretada de forma continua y las beta-defensinas humanas 2, 3 y 4 (hBD2, hBD3 y hBD4) son producidas en respuesta a una infección o inflamación. La manifestación y secreción de la hBD2 es activada por estimulación bacterial, en particular por bacterias flageladas (Harder y otros, en *Nature*, 1997; 387:861) e IL1 [alfa] e IL2 [beta] (Interleucina 1) (Liu y otros, en *Journal Invest Dermatol* 2002; 118; 275-281). En algunas zonas de los tejidos, tanto la Necrosis de Tumor factor alfa (NTF-alfa) como el lipopolisacárido (LPS) pueden jugar igualmente un papel en la inducción de la manifestación de hBD2. Algunos experimentos *in vitro* han revelado que el hBD2 es activo contra bacterias negativas Gram tales como la *Escherichia coli* (*E. coli*) y, en menor medida, las bacterias positivas Gram tales como el *Streptococcus pneumoniae* (*Str. Pneumoniae*). El hBD2 también muestra actividad de exterminio *in vitro* contra la levadura *Candida albicans*. La manifestación y secreción de hBD3 es inducida por estimulación bacterial, NTF-alfa y, especialmente, Interferon gamma ($\text{IFN}\gamma$) que tienen también la propiedad común de ser moléculas implicadas en procesos inflamatorios.

35 Además de la protección antimicrobiana innata, de espectro amplio, potente, constitutiva y regulada que las beta-defensinas proporcionan, estas moléculas, en particular hBD2, tienen también la aptitud de movilizar el arma adaptativa de la respuesta inmune por medio de efectos quimiotácticos sobre células dendríticas inmaduras y T-linfocitos de memoria (Yang y otros, *Ciencia*, 1999; 286: 525-528).

40 De forma importante, se está llegando a la evidencia de que las beta-defensinas no solamente proporcionan defensa contra la infección de microbios patógenos, sino que son claves para regular y mantener una densidad y diversidad óptima de los ecosistemas microbianos comensales esenciales del cuerpo, tales como los de la piel, y dentro de los conductos gastrointestinal y genital (Ganz, T., *Nat Rev Immunol.*, 2003 3 (9): 710-20).

45 El modo de actuación de las beta-defensinas es tal que son, en gran parte, no tóxicas para hostigar células en concentraciones activas. Las beta-defensinas han sido, en consecuencia, implicadas como objetivos potenciales para la terapéutica de una amplia gama de infecciones. Sin embargo, las formas naturales de las defensinas son, técnicamente, eficaces para reproducirse en sistemas recombinantes, resultando en bajas producciones. Además, está creciendo la evidencia que sugiere que, por medio de sus acciones quimiotácticas, las beta-defensinas son potentes compuestos inflamatorios (Yang y otros, *Science*, 1999; 286: 525-528; Van Wetering y otros, *Inflamm. Res.* 2002; 51 (1): 8-15; Niyonsaba y otros, *Curr Drug Targets Inflamm. Allergy* 2003; 2 (3); 224-231). Tomadas en su conjunto, estos factores hacen que las defensinas naturales no sean aptas para aplicaciones terapéuticas.

50 Las beta-defensinas son también altamente sensibles a la sal (Porter y otros, *Infect. Immun.* 1997; 65 (6): 2396-401; Bals y otros, *J. Clin. Invest.* 1998; 102 (5): 874-80; Valore y otros, *J Clin Invest* 1998; 101 (8): 1633-42; Goldmann y otros, *Cell* 1997; 88 (4): 553-609; Singh y otros, *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (25): 14961-6). Por esta razón, las beta-defensinas no pueden proporcionar protección antimicrobiana en enfermedades como la fibrosis quística, en la que, aunque el epitelio respiratorio produce abundantes beta - defensinas en respuesta a las infecciones bacteriales persistentes asociadas con esta enfermedad, son inactivas debido al desequilibrio en transporte de iones a lo largo de las membranas epiteliales respiratorias, lo que resulta en una incrementada reabsorción de cationes (Na^+ , en concreto)
60 y una incrementada secreción de cloruro (Donaldson SH y Boucher RC, *Curr Opin. Pulm. Med.* 2003 Nov; 9 (6):486-91; Davies JC. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 2004; 26: 147-8).

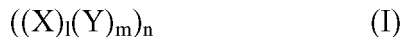
65 Adicionalmente, la Patente Europea EP-A10502718 muestra péptidos efectivos en la inhibición del crecimiento de patógenos fúngicos de plantas y es un ejemplo ulterior de péptidos con actividad antimicrobiana.

Hay una necesidad, en consecuencia, de agentes adicionales que puedan ser usados para tratar las infecciones microbianas.

ES 2 351 879 T3

Los inventores presentes han identificado péptidos que, sorprendentemente, han mejorado la actividad antimicrobiana sobre las defensinas naturales.

5 El uso de un péptido o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la fórmula I:



10 En el que el péptido consiste de entre 3 y 200 aminoácidos y en el que I y m son números enteros desde 0 a 10; n es un número entero de 1 a 10; X e Y son los mismos y son arginina, en la producción de un medicamento para el tratamiento de una infección de dermatofitos.

15 Los péptidos de la invención son útiles, entre otros, en el tratamiento o prevención de infecciones microbianas.

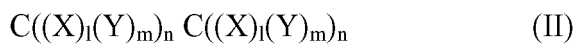
En un aspecto preferente de la invención el péptido comprende de 3 a 100 aminoácidos, por ejemplo, 3, 4, 5, 6 ó 7, hasta 100 aminoácidos, incluyendo 3, 4, 5, 6 ó 7 hasta 20, 25, 30, 35, 40 ó 42 aminoácidos.

20 El péptido de acuerdo con la invención puede comprender de 100 a 200 aminoácidos, 27 a 100 aminoácidos, 28 a 86 aminoácidos, 7 a 27 aminoácidos o 3 a 14 aminoácidos.

Los péptidos comprenden, preferiblemente, de 3 a 15 aminoácidos, por ejemplo, de 3 a 7 aminoácidos.

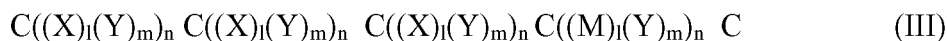
25 En un aspecto preferente ulterior, los péptidos comprenden uno o más restos de cisteína, por ejemplo hasta 6 restos de cisteína, tal como 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 restos de cisteína.

30 Es también útil un péptido que comprenda aminoácidos de acuerdo con la Fórmula II:



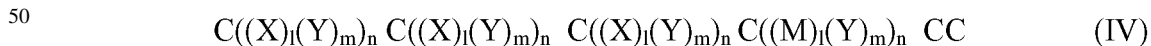
35 En el que C es cisteína, 1, n y m son un número entero del 0 al 10; y X e Y, que pueden ser el mismo o diferente, son un aminoácido seleccionado del grupo consistente de aminoácidos hidrofóbicos y/o aminoácidos catiónicos.

40 El péptidos puede comprender también aminoácidos de acuerdo con la Fórmula III:



45 En el que C, X, Y, I, m y n son como se definen aquí.

Finalmente, el péptido puede comprender aminoácidos de acuerdo con la Fórmula IV:



55 En el que C, X Y, I, m y n son como se definen aquí.

60 En cuanto los péptidos de la invención son de una estructura más simple que las beta-defensinas naturales, son de producción fácil y eficiente. Los péptidos son también sustancialmente insensitivos a la sal y no son hepatotóxicos. Además, su modo de acción, siendo más físico que metabólico (esto es, disrupción directa en la membrana en contraposición a los compuestos focalizados de vías metabólicas vitales) minimiza, si no elimina del todo, la probabilidad de que microbios objetivos puedan desarrollar resistencia a estos agente antimicrobianos.

65 Es sabido por el experto en la materia que los aminoácidos pueden ser ubicados en diferentes clases dependiendo principalmente de las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, algunos aminoácidos son, generalmente, considerados como hidrofílicos o aminoácidos polares y otros son considerados como hidrofóbicos o aminoácidos no polares. Como son usados aquí, los términos "hidrofóbico" y "catiónico" pueden referirse a aminoácidos con una hidrofobicidad que es mayor o igual a -1.10 y/o una carga neta que es mayor que o igual a 0 como se describió en Fauchere y Pliska *Eur. J. Med. Chem.* 10:39 (1983). Un aminoácido hidrofóbico o no polar

ES 2 351 879 T3

puede referirse también a un aminoácido con una cadena lateral que no está cargada en pH fisiológico, que no es polar y que es, generalmente, repelida por solución acuosa.

5 X y/o Y son seleccionadas del grupo de aminoácidos hidrofóbicos consistentes de glicina, leucina, fenilalanina, prolina, alanina, triptófano, valina, isoleucina, metionina, tirosina y treonina, y/o el grupo de aminoácidos catiónicos consistentes de ornitina, histidina, arginina y lisina. X y/o Y pueden ser D ó L-aminoácidos. Además, X y/o Y pueden ser aminoácidos alternantes.

10 La invención también incluye isómeros conocidos (estructurales, esteroides, conformacionales y configuracionales) y análogos estructurales de los aminoácidos *supra*, y los modificados tanto naturalmente (por ejemplo, modificación post-traslacional) como químicamente, incluyendo, aunque no exclusivamente, fosforilación, glicosilación, sulfonilación y/o hidroxilación.

15 Por lo general, los péptidos de la invención no incluyen el ácido aspártico de los aminoácidos, el ácido glutámico, la asparagina, glutamina o la serina, pero ciertos péptidos de la invención pueden tener actividad incluso aunque estén presentes estos aminoácidos.

20 Los péptidos puede incluir uno o más residuos adicionales de aminoácidos adyacentes a uno o ambos residuos terminales de cisteína de fórmula II, III ó IV, por ejemplo, los péptidos pueden comprender hasta 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) residuos adicionales de aminoácidos. Preferentemente, los aminoácidos adicionales son residuos no de cisteína. Más preferiblemente, los aminoácidos adicionales son X y/o Y.

25 Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de un péptido puede ser modificada de tal forma que resulte en una variante de péptido que incluya la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en el péptido por otro residuo de aminoácido, incluyendo sustitutivos que utilicen la forma D con preferencia a la forma L.

30 Uno o más de los residuos del péptido pueden ser intercambiados por otros para alterar, fortalecer o preservar la actividad biológica del péptido. Tal variante puede tener, por ejemplo, al menos alrededor del 10% de la actividad biológica del péptido equivalente de los no variantes. Los aminoácidos conservativos son utilizados a menudo, esto es, sustitutivos de aminoácidos con propiedades químicas y físicas similares a las descritas *supra*.

35 De aquí que, por ejemplo, los sustitutivos de aminoácidos conservativos puedan implicar el intercambio de lisina por arginina, ornitina o histidina; el intercambio de un aminoácido hidrofóbico por otro. Después de la introducción de los sustitutivos, las variantes son seleccionadas por su actividad biológica.

El péptido puede comprender al menos 4 aminoácidos, por ejemplo, entre 4 y 50 aminoácidos, ó 4 y 50 aminoácidos, tales como entre 20 y 45 aminoácidos, tales como 20, 25, 30, 35, 40, 42 ó 45 aminoácidos.

40 X e Y pueden ser el mismo y son leucina o glicina.

En un aspecto ulterior, X es leucina e Y es glicina.

45 En un aspecto ulterior, X e Y son el mismo y son lisina o arginina. Así, la invención proporciona péptidos seleccionados de entre poli-L-lisina, poli-D-lisina, poli-L-arginina y poli-D-arginina.

En un aspecto aún ulterior, X es lisina e Y es arginina.

50 En el péptido de la invención, 1 y m pueden ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 y n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

En el péptido de la invención 1 puede ser 1, n puede ser 1 y m puede estar entre 4 y 9, por ejemplo, m puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

55 En el péptido de la invención 1, n y/o m puede estar entre 1 y 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5.

Preferentemente, el péptido es acíclico. El péptido puede ser de cadena recta, esto, lineal, o ramificada.

60 El término "péptido", tal como se usa aquí significa, en términos generales, una multitud de residuos aminoácidos unidos por vínculos de péptidos. Se usa de forma intercambiable y significa lo mismo que polipéptido y proteína.

En una realización, el péptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo consistente en:

65 CCGGGGGCGGGGCGGGGGGGGGCGGGGGGCC (i)

ES 2 351 879 T3

	CLLLLLLCLLLLCLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLCC	(ii)
	CLGLGLGCGLGLCLGLGLGLGLCGLGLGLCC	(iii)
5	CRKRKRRCRKRKCKRKRKRKRKCRKRKRKCC	(iv)
	KKK	(v)
10	KKKKKKK	(vi)
	RRR	(vii)
15	RRRRRRR	(viii)

En un aspecto adicional, el péptido comprende al menos una de las aminosecuencias (i) a (viii) y residuos adicionales de aminoácidos adyacentes a uno o ambos de los residuos de cisteína terminal. Así, en una realización adicional de la invención, se proporciona un péptido que comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de las secuencias de aminoácido mostradas en la Figura 1.

Los péptidos de la invención son, generalmente, péptidos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos aislados, purificados o variantes de los mismos, que pueden ser sintetizados *in vitro*, por ejemplo, por un método sintético de péptido de fase sólida, por síntesis de péptido catalizado por enzima o con la ayuda de tecnología de ADN recombinante.

Para identificar los péptidos activos que tienen poca o ninguna toxicidad indeseada para células de mamíferos, se pueden hacer péptidos individuales, o colecciones de péptidos y los péptidos individuales o los péptidos de estas colecciones pueden ser seleccionados para actividad y toxicidad antimicrobiana, incluyendo, pero no limitados a actividad y toxicidad antifúngica, antibacteriana, antivírica, antiprotozoica y antiparasítica.

Los péptidos de la invención pueden existir en diferentes formas, tales como ácidos libres, bases libres, esteros y otras pro drogas, sales y tautómeros, por ejemplo, y la invención incluye toda las formas variantes de los compuestos.

Así, la invención abarca la sal o pro-droga de un péptido o una variante de péptido de la invención.

Los péptidos de la invención pueden ser administrados en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser sintetizadas del péptido matriz que contiene una mitad ácida o básica por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden ser preparadas por reacción del las formas de libre ácido o básicas de estos péptidos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como el éter, etilacetato, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, cuya divulgación está aquí incorporada por referencia; ver también, Stahl y otros, Editores, "*Manual de Sales farmacéuticas. Propiedades, Selección y Uso*", Verlag Helvetica Chimica Acta y Wiley-VCH, 2002.

La invención incluye así sales farmacéuticamente aceptables de los péptidos divulgados en los que el compuesto matriz está modificado por la creación de sales de ácido o básicas de las mismas, por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternarias que se forman, por ejemplo, de ácidos o bases inorgánicas u orgánicas. Ejemplos de tales sales de adición ácidas incluyen el acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfito, butirato, citrato, camforato, camforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidrocloreto, hidrobromido, hidroyodido, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales metal alcalinas, tales como sales de sodio y potasio, sales metal terrosas alcalinas tales como sales de calcio y de magnesio, sales con bases orgánicas, tales como sales de dicitclohexilamina, N-metilo-D-glutamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, y así. También, los grupos contenedores de nitrógeno básico pueden ser puestos en cuarentena con tales agentes como alci halidos bajos, como el metilo, etilo, propilo, y cloruro de butilo, bromidos y yodidos; sulfatos de dialcilo como el dimetilo, dietilo, dibutilo; y sulfatos de diamilo, halidos de cadena larga como cloruros de decilo, de laurilo, de miristilo y de estearilo, bromidos y yodidos, halidos de aralcilo como bromuros de benzilo y de fenetilo y otros.

Pueden ser preparados grupos de sales de carboxilo de un péptido o de una variante de péptido de la invención en la forma usual por contacto del péptido con uno o más equivalentes de una base deseada tal como, por ejemplo, una base de hidróxido metálico, por ejemplo, hidróxido de sodio; un carbonato metálico o bicarbonato, tal como, por ejemplo, carbonato de sodio o bicarbonato; o una base de amina tal como, por ejemplo, trietilamina, trietanolamina y similares.

ES 2 351 879 T3

Pueden ser preparados los derivados de N-alcilo o un grupo amino del péptido o de las variantes del péptido de la invención mediante la utilización de un aminoácido protegido por N-alcilo para la condensación final, por la acilación de un aminoácido protegido o no protegido. Los derivados de O-acilo pueden ser preparados, por ejemplo, por acilación de un péptido de libre hidróxido o una resina de péptido. O bien, la acilación puede ser llevada a cabo utilizando re-agentes acilantes normalizados como los acil halidos, anhídridos, acil imidazolas, y similares.

La invención incluye pro drogas para las especies farmacéuticamente activas de los péptidos descritos, por ejemplo, en las que uno o más grupos funcionales son protegidos o derivados pero pueden ser convertidos *in vivo* en el grupo funcional, como es en el caso de esteros de ácidos carboxílicos convertibles *in vivo* al ácido libre, o, en el caso de aminas protegidas, al grupo amino libre. El término "pro-droga" usado aquí, representa en particular estructuras que se transforman rápidamente *in vivo* en la estructura matriz, por ejemplo, por hidrólisis en sangre. Una completa discusión se proporciona en T. Higuchi y V. Stella, "Pro-drogas en Diseño de Drogas", en *American Pharmaceutical Association and Pergamon Press*, 1987; H. Bundgaard, editor, *Diseño de Pro-drogas*, Elsevier, 1985; y Judkins, y otros, *Comunicaciones Sintéticas*, 26(23), 4351-4367 (1996), cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia.

En consecuencia, las pro-drogas incluyen drogas con un grupo funcional que ha sido transformado en un derivado reversible del mismo. En especiales, tales pro-drogas se transforman en la droga activa por hidrólisis. Como ejemplos se pueden mencionar los siguientes:

Grupo Funcional	Derivado reversible
Acido carboxílico	Esteros, incluyendo, por ejemplo, esteros aciloxialcilos, amidas
Alcohol	Esteros, incluyendo, por ejemplo, sulfatos y fosfatos además de esteros de ácido carboxílico
Amino	Amidos, carbamatos, iminos, enaminos
Acido	Borónico Estero de diolo
Carbonilo (aldehído, ketono)	Iminos, oximos, acetals/ketalos, esteros enoles, oxazolidinas y tiazoxolidinas

Las pro-drogas incluyen también compuestos convertibles a la droga activa por una reacción oxidativa o reductiva. Como ejemplos, se pueden mencionar:

Activación oxidativa

- Dealcilación N- y O-
- Deaminación oxidativa
- N-oxidación
- Epoxidación

Activación reductiva

- Azo Reducción
- Sulfóxido Reducción
- Disulfido Reducción
- Alcilación Bioeductiva
- Nitro Reducción

ES 2 351 879 T3

También se debe mencionar como activaciones metabólicas de pro-drogas la activación nucleótida, la activación de fosforilación y la activación de decarboxilación.

5 El uso de grupos protectores está ampliamente descrito en “*Grupos protectores en Química Orgánica*”, editado por J. W. F. McOmie, Plenum Press (1973), y “*Grupos protectores en síntesis orgánica*”, segunda edición, T.W. Greene & P. G. M. Wutz, Wiley-Interscience (1991).

10 Así, se apreciará por los expertos en la materia que, aunque los derivados protegidos de los péptidos descritos pueden no poseer actividad farmacológica como tales, pueden ser administrados, por ejemplo, de forma parenteral u oral, y, en consecuencia, metabolizados en el cuerpo para formar compuestos que son farmacológicamente activos. Tales derivados son, en consecuencia, ejemplos de “pro-drogas”. Todas las pro-drogas de los compuestos descritos se incluyen en el ámbito de la invención.

15 Un aspecto ulterior de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de al menos uno de los péptidos de la invención, o dos o más diferentes péptidos de la invención.

20 Estos péptidos también incluyen un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. La frase “farmacéuticamente aceptable” se utiliza aquí para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas dosificadas que son, dentro del ámbito del juicio médico bien fundado, aptos para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, como puede ser el caso, un animal sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, equivalente a una razonable relación riesgo/beneficio.

25 Los péptidos de la invención son útiles, entre otros, como péptidos antimicrobianos para la infección dermatofita. El término “péptido antimicrobiano” puede ser usado aquí para definir cualquier péptido que tiene actividad microbiana y/o microbistática y abarca, no exclusivamente, cualquier péptido descrito como dotado de propiedades anti-dermatofitas.

30 Así, la invención proporciona ulteriormente un péptido de acuerdo con la invención para su uso como medicamento. Los péptidos de la invención pueden tener aplicación como agentes antimicrobianos *ex vivo*.

En un aspecto preferente, la invención proporciona el uso de un péptido de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar una infección dermatofita.

35 Un patógeno fúngico puede derivarse de un patógeno fúngico que sea del género *Candida* spp., (por ejemplo, *C. albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp., (por ejemplo, *T. rubrum* y *T. interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp.,
40 *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp., *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium*
45 spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

Así, la invención proporciona el uso de un péptido de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para tratar una infección dermatofita.

50 Las infecciones fúngicas tópicas o dermatofitas, aunque no son de por sí causantes de muerte o enfermedades graves, son frecuentes y económicamente importantes porque requieren un tratamiento caro. Las infecciones fúngicas tópicas o superficiales pueden incluir las de la piel, de la melanina, de la capa córnea, de las uñas y del pelo. Las infecciones cutáneas son infecciones de la piel, de las uñas de los dedos de las manos y de las uñas de los dedos de los
55 pies.

En un aspecto preferido de la invención, la infección fúngica es la onicomiosis. La onicomiosis puede ser causada por un hongo de, pero no limitado, al género *Trichophyton* spp., por ejemplo, el hongo puede ser *Trichophyton interdigitale* o *Trichophyton rubrum*.

60 El término “onicomiosis” incluye, pero no está limitado a los tipos de onicomiosis sub-ungueal lateral distal, blanca superficial, sub-ungueal blanca próxima, distrófica secundaria, distrófica primaria, endónica, candidal (por ejemplo, onicolisis y afección muco-cutánea crónica). La onicomiosis ha mostrado ser un significativo factor de riesgo para complicaciones clínicas más serias, tales como celulitis bacteriana aguda del brazo/pierna y otras infecciones bacterianas secundarias, y, así, la presente invención abarca el tratamiento de estas infecciones.
65

El término “tratamiento” se usa aquí para referirse a los efectos de los péptidos descritos aquí que suponen un beneficio para los pacientes afectados de una enfermedad (infecciosa), incluyendo una mejora en la afección del paciente o un retraso en la progresión de la enfermedad.

ES 2 351 879 T3

Así, en un aspecto ulterior de la invención, se proporciona un sustrato al cual se aplica o se adjunta un péptido de la invención. Preferentemente, el sustrato es apto para su aplicación a heridas o su suministro a zonas con heridas. Preferentemente, el sustrato permite la transferencia de los péptidos de la invención del sustrato al lecho de una herida para conseguir su efecto antibiótico. El sustrato puede ser un revestimiento, por ejemplo un revestimiento de herida.
5 El revestimiento puede comprender un material de tela o puede ser un material similar al colágeno.

Los péptidos de la invención pueden encontrar también aplicación como/en un desinfectante. En este contexto, el péptido o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser aplicadas, o bien solas o bien en combinación con otros agentes desinfectantes, a la superficie que se va a tratar. El término “superficie que se va a tratar” puede ser
10 un sustrato como se define aquí o bien un dispositivo médico.

En un aspecto ulterior, la invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad dermatofita en un sujeto que comprenda la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido de acuerdo con la invención.
15

En el método de la invención, el péptido puede ser aplicado a la piel o uñas de dicho sujeto. Los mamíferos, los pájaros y otros animales pueden ser tratados con los péptidos, composiciones o métodos descritos aquí. Tales mamíferos y pájaros incluyen humanos, perros, gatos y ganado, tales como caballos, vacas, ovejas, cabras, pollos, pavos y similares. Además, las plantas pueden ser también tratadas con los péptidos, compuestos o métodos de la invención.
20

Si el sujeto es un animal, el método de la invención puede ser aplicado a partes similares a uñas, incluyendo, pero no limitadas a pezuñas, garras y cascos.

El método de la invención puede incluir, además del tratamiento con péptidos, tratamientos que pueden fortalecer la permeabilidad del péptido en la uña. Esto podría ser facilitado por medios químicos o físicos. Tratamientos físicos como aguafuerte de la uña o rellenado de la capa dorsal de la uña pueden fortalecer la permeabilidad de los péptidos de la invención. El fortalecimiento químico de la permeabilidad de la uña a los péptidos de la invención puede ser conseguida por la ruptura de los enlaces físicos o químicos en la keratina de la placa de la uña. Agentes suavizadores de la uña, incluyendo, pero no limitados a, urea y ácido salicílico, incrementan la hidratación de la uña para disminuir la densidad de la uña y, en consecuencia, pueden incrementar la permeabilidad a los péptidos de la invención. Los compuestos que contienen grupos sulfidrilos dividirán los vínculos disulfidos en la keratina de la uña, y pueden conducir a la desestabilización y la permeabilidad incrementada de las drogas. Los compuestos que incluyen, pero no exclusivos a derivados de acetilcisteína y mercaptoetanol pueden ser usados en combinación con nuestros péptidos.
25 Otros excipientes/adyuvantes conocidos de permeabilidad de la uña que pueden ser usados en combinación con los péptidos de la invención incluyen metilsulfonilmetano, urea, glicol de polietileno, N-(2-mercaptopropil)glicina, dimetilsulfona y 2-*n*-nonilo-1, 3-dioxolano.
30

Los péptidos de la invención, incluyendo sus sales, se administran de tal forma que se consiga una reducción en al menos un síntoma asociado con una infección, indicación o enfermedad, o una disminución en la cantidad de anticuerpos asociados con la indicación o enfermedad.
35

Para conseguir el/los efecto(s) deseado(s), el péptido, una variante del mismo o una combinación del mismo, puede ser administrado como dosis únicas o divididas, por ejemplo, de al menos alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 500 a 750 mg/kg, de al menos alrededor de 0.01 mg/kg a alrededor de 300 a 500 mg/kg, al menos alrededor de 0.1 mg/kg a alrededor de 100 a 300 mg/kg o al menos alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 50 a 100 mg/kg de peso corporal o al menos alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 20 mg/kg de peso corporal, aunque otras dosis pueden proporcionar resultados beneficiosos. La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores, incluyendo, pero no limitados a, el péptido elegido y sus efectos clínicos, la enfermedad, el peso, la condición física, la salud, la edad del mamífero, si lo que hay que conseguir es prevención o tratamiento, y si el péptido es modificado químicamente. Tales factores pueden ser prontamente determinados por el clínico que examina los datos empíricos que resultan de los ensayos clínicos y que examina los resultados pre-clínicos en resultados en modelos de animales u otros sistemas de testado disponibles en el estado de la técnica.
40

La administración de los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención puede ser en una dosis única, en múltiples dosis, de una forma continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de las condiciones fisiológicas del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos de los prácticos expertos en la materia. La administración de los péptidos de la presente invención puede ser esencialmente continua sobre un periodo de tiempo pre-seleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas. Se prevé tanto la administración local como la sistémica.
45

Para preparar la composición, los péptidos se sintetizan o, de otra forma, se obtienen, purifican según se necesite o deseé, y entonces se liofilizan y estabilizan. El péptido puede ser entonces ajustado a la concentración apropiada y, opcionalmente, combinado con otros agentes. El peso absoluto de un péptido dado incluido en una dosis unitaria puede variar ampliamente. Por ejemplo, de alrededor de 0.01 a alrededor de 2 grs. o de alrededor de 0.01 a alrededor de 500 mgrs., de al menos un péptido de la invención, o puede ser administrada una pluralidad de péptidos específica para un tipo concreto de célula. Alternativamente, la dosis unitaria puede variar desde alrededor de 0.01 grs. a alrededor de 50 grs., de alrededor de 0.01 grs. a alrededor de 35 grs., de alrededor de 0.1 grs. a alrededor de 25 grs., de alrededor de
50

ES 2 351 879 T3

0.5 grs. a alrededor de 12 grs., de alrededor de 0.5 grs. a alrededor de 8 grs., de alrededor de 0.5 grs. a alrededor de 4 grs., o de alrededor de 0.5 grs. a alrededor de 2 grs.

Las dosis diarias de los péptidos de la invención pueden también variar. Tales dosis diarias pueden estar en el intervalo, por ejemplo, de alrededor de 0.001 grs./día a alrededor de 100 ó 50 grs./día, de alrededor de 0.1 grs./día a alrededor de 25 grs./día, de alrededor de 0.1 grs./día a alrededor de 12 grs./día, de alrededor de 0.1 grs./día a alrededor de 5 grs./día, de alrededor de 0.1 grs./día a alrededor de 2.5 grs./día, de alrededor de 0.1 grs./día a alrededor de 2 grs./día, de alrededor de 0.5 grs./día a alrededor de 8 grs./día, de alrededor de 0.5 grs./día a alrededor de 4 grs./día, de alrededor de 0.5 grs./día a alrededor de 2 grs./día, y de alrededor de 0.5 grs./día a alrededor de 1 gr./día.

Así, una o más fórmulas de dosis unitarias adecuadas que comprendan los péptidos terapéuticos de la invención pueden ser administradas por una diversidad de vías, incluyendo la oral, parenteral (incluyendo la subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), rectal, dérmica, trans-dérmica, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratoria). Los péptidos terapéuticos pueden también estar formulados en una formulación lípida o para una liberación sostenida (por ejemplo, usando la micro-encapsulación, ver la PCT 94/07529, y la patente estadounidense n° 4.962.091). Las formulaciones pueden, cuando sea apropiado, ser convenientemente presentadas en formas discretas de dosificación unitaria y pueden ser preparadas por alguno de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica. Tales métodos pueden incluir la fase de la mezcla del agente terapéutico con portadores líquidos, matrices sólidas, portadores semi-sólidos, portadores sólidos divididos con cuidado o combinaciones de los mismos, y, entonces, si es necesario, introducir o dar forma al producto en la forma de dispensación deseada.

Cuando los péptidos terapéuticos de la invención son preparados para su administración oral, son, generalmente, combinados con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable, para formar una formulación farmacéutica, o formar una dosis unitaria. Para la administración oral, los péptidos pueden ser presentados como un polvo, un formulación granular, una solución, una suspensión, una emulsión o en un polímero o resina natural o sintética para la ingestión de los ingredientes activos de una goma de mascar. Los péptidos activos pueden ser presentados además como un bolo, electuario o pasta. Los péptidos terapéuticos de la invención administrados oralmente pueden ser también formulados para su liberación sostenida, por ejemplo, los péptidos pueden ser revestidos, micro-encapsulados o ubicados de otra manera dentro de un elemento de suministro sostenido. Los ingredientes activos totales en tales formulaciones comprenden de 0.1 a 99.9% por peso de la formulación.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen los péptidos terapéuticos de la invención pueden ser preparadas por procedimientos conocidos en el estado de la técnica usando ingredientes conocidos y de fácil disponibilidad. Por ejemplo, el péptido puede estar formulado con portadores, diluyentes o excipientes comunes y con forma de tabletas, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, aerosoles y similares. Ejemplos de excipientes, diluyentes y portadores aptos para tales formulaciones incluyen amortiguadores, además de rellenos y extensores tales como el almidón, celulosa, azúcares, manitol y derivados silícicos. También pueden ser incluidos agentes vinculadores tal como la celulosa de carboximetilo, hidroximetilcelulosa, metilcelulosa de hidroxipropilo y otros derivados de la celulosa, alginatos, gelatina, y polivinilpirrolidona. Pueden ser incluidos agentes humidificadores, como el glicerol, agentes desintegradores, como el carbonato de calcio y el bicarbonato de sodio. Pueden ser también incluidos agentes para el retardo de la disolución, como la parafina. También pueden ser incluidos aceleradores de la reabsorción, como los compuestos de amonio cuaternario. Pueden ser incluidos agentes activos superficiales como el alcohol de cetilo y el mono-estearato de glicerol. Pueden ser añadidos portadores absorbentes como caolina y bentonita. Pueden ser también incluidos lubricantes como el talco, calcio y estearato de magnesio, y glicoles de polietileno sólido. También pueden ser añadidos preservativos. Las composiciones de la invención pueden contener también agentes engrosadores como la celulosa y/o los derivados de la celulosa. Pueden contener también gomas como xantana, guar o goma de carbohidratos o goma arábica, o, alternativamente, bentones y montmorillonitas de glicoles de polietileno, y similares.

Por ejemplo, las tabletas o cápsulas que contienen los péptidos de la invención pueden incluir agentes amortiguadores como el carbonato de calcio, el óxido de magnesio y el carbonato de magnesio. Los agentes amortiguadores adecuados pueden incluir también ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal. Las cápsulas y tabletas pueden incluir también ingredientes inactivos como la celulosa, almidón pre-gelatinizado, dióxido de silicona, celulosa de metilo propilo hidróxilo, estearato de magnesio, celulosa microcristalina, almidón, talco, dióxido de titanio, ácido benzoico, ácido cítrico, almidón de maíz, aceite mineral, glicol de polipropileno, fosfato de sodio, estearato de cinc, y similares. Las cápsulas de gelatina dura o suave que contengan al menos un péptido de la invención pueden contener ingredientes inactivos tales como la gelatina, celulosa microcristalina, lauril de sodio y aceite vegetal. Además, son designadas cápsulas o tabletas revestidas de entérico que contienen uno o más péptidos de la invención de forma que resistan la desintegración en el estómago y se disuelvan en el entorno del duodeno, más neutral a lo alcalino.

Las formulaciones farmacéuticas de los péptidos terapéuticos de la invención pueden tomar también la forma de una solución o dispersión acuosa o anhidrosa, o, alternativamente, la forma de una emulsión o suspensión o bálsamo.

Como se indicó *supra*, pueden ser añadidos preservativos para ayudar a mantener el tiempo de durabilidad de la dosis antes de su venta. Los péptidos activos y otros ingredientes pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización de una solución para su formación con un portador adecuado, por ejemplo, agua destilada libre de pirógeno, antes de su uso.

ES 2 351 879 T3

Estas formulaciones pueden contener portadores, vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables y conocidos en la técnica. Es posible, por ejemplo, preparar soluciones usando uno o más solvente(s) orgánicos que es/son aceptable(s) desde el punto de vista fisiológico, escogidos, además del agua, de entre solventes tales como la acetona, ácido acético, etanol, alcohol de isopropilo, sufóxido de dimetilo, éteres de glicol, tal como los productos vendidos bajo la marca "Dowanol", poliglicoles y glicoles de polietileno, esteros alcilos C₁-C₄ de ácidos de cadena corta, lactato de etilo o isopropilo, triglicéridos de ácidos grasos tal como los productos comercializados bajo el nombre "Mygliol", mitrisato de isopropilo, aceites animales, minerales y vegetales y polixiloxanos.

Preferiblemente, las formulaciones farmacéuticas de los péptidos terapéuticos de la invención pueden tomar también la forma de un solvente o diluyente que comprenda el péptido. Los solventes y diluyentes pueden incluir soluciones ácidas, dimetilsulfona, N-(2-mercaptopropionilo)glicina, 2-n-nonilo-1, 3-dioxolamo y alcohol etílico. Preferiblemente, el solvente/diluyente es un solvente ácido, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido propiónico, ácido fosfórico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido málico, ácido masónico, ácido oxálico, ácido succínico o ácido tartárico.

Más preferiblemente, el solvente es una solución de ácido acético. El solvente, por ejemplo solución de ácido acético, puede estar presente en la composición a una concentración de menos del 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05% ó 0.01% de ácido, por ejemplo, ácido acético.

El término "agente activo" usado aquí, abarca un único péptido de acuerdo con la invención, o una combinación de péptidos como los descritos aquí. El término "agente activo" puede abarcar también una cantidad farmacéuticamente efectiva de un ácido como el descrito aquí. Los agentes activos pueden ser administrados de forma simultánea, secuencial o separadamente. Generalmente, se prefiere que tal administración sea tópica.

Los agentes activos pueden ser administrados en cantidades sinérgicamente efectivas. La invención, en consecuencia, incluye: el uso de cantidades sinérgicamente efectivas de los agentes activos, por ejemplo, un péptido de acuerdo con la invención y una cantidad farmacéuticamente activa de un ácido descrito aquí, para la fabricación de un producto, por ejemplo, un medicamento, para la administración simultánea, separada o secuencial de dichos agentes en el tratamiento de una infección microbiana.

Es posible añadir, si es necesario, un adyuvante escogido de entre antioxidantes, surfactantes, otros preservativos, agentes formadores de película, keratolíticos o comedolíticos, perfumes, aromatizantes y colorantes. Pueden ser añadidos antioxidantes como la t-butilhidroquinina, hidroxianisola butilada, hdroxitolueno butilado y α -tocoferol y sus derivados.

También se contemplan combinaciones de productos que incluyen uno o más péptidos de la presente invención y uno o más agentes antimicrobianos o antifúngicos, por ejemplo, polienos tales como anfotericina B, complejo lípido de anfotericina B (CLAB), anfotericina B liposomal (ANBL), y nistanina liposomal, azolos y triazolos tales como la voriconazola, fluronazola, ketoconazola, itraconazola, pozaconazola y similares; inhibidores de síntesis glucana tales como la caspofungina, micafungina (FK463), y V-equinocandina (LY303366); griseofulvina; alilaminas tales como terbinafina; flucitosina u otros agentes antifúngicos, incluidos los descritos aquí. Adicionalmente, se contempla que los péptidos podrían ser combinados con agentes antifúngicos tópicos tales como olamina de ciclopirox, haloprogina, tolnaftato, undecilenato, nisatina tópica, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, y otros agentes tópicos.

Adicionalmente, los péptidos están bien adaptados para su formulación como dosis de liberación sostenida y similares. Pueden ser fabricados revestimientos, envoltorios y matrices protectoras, por ejemplo, de sustancias poliméricas, tales como glicolatos poliláctidos, liposomas, microemulsiones, micropartículas, nanopartículas, o ceras. Estos revestimientos, envoltorios, y matrices protectoras son útiles para revestir elementos de alojamiento, por ejemplo, cánulas, catéteres, entubamiento de diálisis peritoneal, dispositivos de drenaje y similares.

Para su administración tópica, los agentes activos pueden ser formulados como se conoce en el estado de la técnica para su aplicación directa a una zona objeto. Las fórmulas condicionadas principalmente para su aplicación tópica pueden tomar la forma de, por ejemplo, cremas, leches, geles, polvos, dispersiones o microemulsiones, lociones engrosadas en una extensión mayor o menor, tampones, pomadas o palitos impregnados, formulaciones de aerosol (por ejemplo, pulverizadores o espumas), jabones, detergentes, lociones o pastillas de jabón. Otras formas convencionales para este propósito incluyen vendajes de heridas, vendas revestidas u otros cubrimientos de polímero, ungüentos, cremas, lociones, pastas, jaleas, pulverizadores y aerosoles. Así, los péptidos terapéuticos de la invención pueden ser suministrados por medio de parches o vendajes para su administración dérmica. Alternativamente, el péptido puede ser formulado para ser parte de un polímero adhesivo, tal como poliacrilato o copolímero de acetato de vinilo/acrilato. Para aplicaciones a largo plazo, sería deseable usar laminados de apoyo microporosos y/o respirables, de tal forma que la hidratación o maceración de la piel pueda ser minimizada. La capa de apoyo puede ser de cualquier grosor apropiado que proporcionará las funciones protectoras y de apoyo deseadas. Un grosor adecuado estará generalmente entre alrededor de 10 a alrededor de 200 micrones.

La administración tópica puede ser en la forma de una laca o revestimiento de uña. Por ejemplo, los péptidos antifúngicos pueden ser formulados en una solución para una administración tópica que contenga acetato etílico (NF), alcohol isopropilo (USP), y monoestero butilo de poli[metilvinilo de ácido etero/maleico] en alcohol isopropilo.

ES 2 351 879 T3

Las formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden comprender, por ejemplo, un solución salina amortiguada fisiológicamente aceptable que contenga entre alrededor de 0.001 mg/ml y alrededor de 100 mg/ml, por ejemplo entre 0.1 mg/ml y 10 mg/ml, de uno o más de los péptidos de la presente invención específicos para la indicación o enfermedad que va ser tratada.

5

Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, ser formulados con una base acuosa u oleaginosa con el añadido de agentes adecuados para el engrosamiento y/o la gelificación. Pueden formularse lociones con una base acuosa u oleaginosa y, por lo general, contendrán también uno o más agentes emulsificadores, estabilizadores, dispersadores, suspensores, engrosadores, o colorantes. Los péptidos activos pueden ser administrados también por vía de iontoforesis, por ejemplo, como se divulga en las patentes estadounidenses números 4.140.122; 4.383.529; ó 4.051.842. El porcentaje por peso de un agente terapéutico de la invención presente en una formulación tópica dependerá de diversos factores, pero, generalmente, estará entre 0.01% a 95% del peso total de la formulación, y, más específicamente, entre 0.1-85% por peso.

10

15

Pueden formularse gotas, tales como gotas para los ojos o para la nariz, con uno o más de los péptidos terapéuticos en una base acuosa o no-acuosa que comprenda también uno o más agentes dispersantes, solubilizadores o suspensores. Los pulverizadores líquidos pueden ser bombeados o se convenientemente suministrados en paquetes presurizados. Las gotas pueden ser administradas por medio de una simple botella con tapón-gotero para administración ocular, por medio de una botella de plástico adaptada para suministrar contenidos líquidos gota a gota, o por medio de un cierre con forma especial.

20

25

El péptido terapéutico puede ser formulado, ulteriormente, para su administración tópica en la boca o garganta. Por ejemplo, los ingredientes activos pueden ser formulados en forma de rombo comprendiendo además una base aromática, usualmente sucrosa, y acacia o tragacanto; pastillas que comprendan la composición en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y colutorios bucales que comprendan la composición de la presente invención en un portador líquido adecuado.

30

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir, como ingredientes opcionales, portadores, diluyentes, agentes solubilizadores o emulsionantes, y sales de las disponibles en el estado de la técnica. Ejemplos de tales sustancias incluyen soluciones salinas normales tales como soluciones salinas fisiológicamente amortiguadas y agua. Ejemplos específicos, no limitativos, de los portadores y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen el agua y soluciones salinas amortiguadas fisiológicamente aceptables tales como soluciones salinas amortiguadas de fosfato pH 7.0-8.0.

35

Los péptidos terapéuticos de la presente invención pueden ser también administrados en una solución acuosa cuando son administrados en un aerosol o en forma inhalada. Así, otras formulaciones farmacéuticas en aerosol pueden comprender, por ejemplo, una solución salina amortiguada fisiológicamente aceptable que contenga entre alrededor de 0.001 mg/ml y alrededor de 100 mg/ml de uno o más de los péptidos de la presente invención específicos para la indicación o enfermedad que se va a tratar. También son útiles, en la práctica de la presente invención, los aerosoles secos en forma de péptidos sólidos delicadamente divididos o partículas de ácido nucleico que no están disueltas o suspendidas en un líquido. Los péptidos de la presente invención pueden estar formulados como polvos y comprender partículas delicadamente divididas que tengan un tamaño medio de partícula de entre alrededor de 1 y 5 μm , alternativamente entre 2 y 3 μm . Las partículas delicadamente divididas pueden ser preparadas por pulverización y filtración por tamiz usando técnicas conocidas en el estado de la técnica. Las partículas pueden ser administradas por inhalación de una cantidad predeterminada del material delicadamente dividido, que puede estar en la forma de un polvo. Se apreciará que el contenido por unidad del ingrediente o ingredientes activos contenidos en una dosis individual de aerosol de cada forma farmacéutica no necesita, por sí mismo, constituir una cantidad efectiva para el tratamiento de la infección, indicación o enfermedad en concreto en cuanto la cantidad efectiva necesaria puede ser alcanzada por la administración de una pluralidad de dosis unitarias. Además, la cantidad efectiva necesaria puede ser alcanzada usando menos que la dosis de la forma farmacéutica, ya sea individualmente, o en unas administraciones sucesivas.

50

55

Para la administración al tracto respiratorio inferior o superior (nasal) por inhalación, los péptidos terapéuticos de la invención son emitidos convenientemente por un nebulizador o un paquete presurizado u otros medios convenientes para la emisión de un spray aerosol. Los paquetes presurizados pueden comprender un propelente adecuado, tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis puede estar determinada por el suministro de una válvula para suministrar una cantidad medida. Los nebulizadores incluyen, pero no están limitados a, los descritos en las patentes estadounidenses números 4.624.251; 3.703.173; 3.561.444; y 4.635.627. Los sistemas de emisión de aerosol del tipo divulgado aquí están disponibles de numerosas casas comerciales incluyendo Fisons Corporation (Bedford Mass.), Schering Corp. (Kenilworth, NJ) y American Pharmoseal Co. (Valencia, CA). Para la administración intra-nasal, el agente terapéutico puede ser también administrado vía gotas nasales, un spray líquido, tal como por medio de un atomizador en botella plástica, o un inhalador de dosis medidas. Atomizadores típicos son el Mistometer (Wintrop) y el Medihaler (Riker).

60

65

Además, los ingredientes activos pueden ser también usados en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, aliviadores del dolor, agentes antiinflamatorios, antihistaminas, brocodilatadores y similares, ya sea para las afecciones descritas o para alguna otra afección.

ES 2 351 879 T3

La invención será ahora descrita por medio de ejemplos sólo con referencia a las siguientes figuras:

- La Figura 1 muestra las secuencias de amino ácido de cuatro péptidos de acuerdo con la invención;

5 - La Figura 2 es un histograma demostrado el crecimiento del hongo, *T. interdigitale* después de (a) 4 días y (b) 7 días de tratamiento con los péptidos de la Figura 1;

- La Figura 3 es un histograma que demuestra el crecimiento del hongo, *T. rubrum* después de (a) 4 días y (b) 7 días de tratamiento con los péptidos de la figura 1;

10 - La Figura 4 es un histograma demostrativo del crecimiento del hongo, *Candida albicans*, después de (a) 24 horas y (b) 48 horas de tratamiento con los péptidos de la figura 1

15 - La figura 5 es un histograma que muestra los resultados de un experimento de respuesta a la dosis para el péptido 1 (mostrado en la Figura 1) sobre el crecimiento de *Candida albicans*, después de un tratamiento de 24 horas;

- La Figura 6 es un gráfico que muestra la supervivencia de *Candida* a las 24 horas en la presencia de un intervalo de dosis de péptido (4) tal como se muestra en la Figura 1;

20 - La Figura 7 es un gráfico que muestra la supervivencia de 3 diferentes variedades de bacterias a las 24 horas en la presencia de un intervalo de dosis de péptido (4) tal y como se muestra en la Figura 1;

- La Figura 8 es un histograma que demuestra el impacto sinérgico de 0.01% de ácido acético en la actividad antifúngica (contra *T. rubrum*) del péptido (4) (1 mg/ml) al día tercero del crecimiento;

25 - La Figura 9 es una histograma que demuestra la inhibición de *T. interdigitale* y *T. rubrum* por el péptido (4);

- La Figura 10 es un histograma que muestra los efectos de los péptidos (3 y 4) sobre *T. interdigitale*;

30 - La Figura 11 es un histograma que muestra el efecto del ácido acético sobre el crecimiento de *T. interdigitale*;

- La Figura 12 es un histograma que muestra el efecto de la polilisina sobre el crecimiento de *T. interdigitale*;

35 - La Figura 13 es un histograma que muestra el efecto de la polilisina y poliarginina sobre el crecimiento de *T. rubrum*;

- La Figura 14 es un histograma que muestra la inhibición de *T. interdigitale* y *T. rubrum* por la poli-L-arginina.

40 - La Figura 15 es un histograma que muestra el efecto de una concentración reducida de poliarginina sobre *T. interdigitale* y *T. rubrum*.

- La Figura 16 es un histograma que muestra el efecto de los cortantes sobre el crecimiento de *T. rubrum*;

45 - La Figura 17 es un histograma que muestra el efecto del péptido 4 y de NaCl sobre el crecimiento de *T. interdigitale*;

- La Figura 18 es un gráfico que muestra el efecto del péptido 4 sobre *Candida Albicans* en concentraciones incrementadas de sal;

50 - La Figura 19 es un histograma que muestra el efecto de la polilisina y poliarginina sobre la supervivencia de *Candida Albicans*;

La tabla 1 es una lista de patógenos víricos bacterianos, fúngicos, parásitos y envueltos, tratables mediante los péptidos de la invención;

55 La tabla 2 detalla los péptidos que se corresponden con los códigos de polímero aminoácido mostrados en los resultados y figuras.

La invención será ahora descrita por vía de referencia sólo a los siguientes ejemplos.

60 Ejemplos

Materiales y Métodos Reagentes

65 Todos los péptidos fueron producidos o bien por síntesis de fase sólida bajo contrato por Invitrogen-Evoquest, Carlsbad, CA, Estados Unidos, o fueron obtenidas de un proveedor de péptidos NeoMPS SA (Estrasburgo, Francia) o Sigma-Aldrich Chemical Company Ltd. (Poole, Reino Unido). Para tests con hongos, fue preparado un péptido liofilizado como una solución almacenada de 1.000 µg/ml en un amortiguador de ensayo. Donde se cita explícitamente

ES 2 351 879 T3

en los experimentos a partir de los cuales se generaron las Figuras 2-8 y 11, se añadió ácido acético como un solvente a una concentración final de 0.5%.

Patógenos

5 Fueron obtenidas cepas de *Trichophyton interdigitale* (NCPF 117) y de *Trichophyton rubrum* (NCPF 335) de la Colección Nacional de Hongos Patogénicos, de Bristol, y fueron mantenidas en cultivo por transferencia a intervalos aproximadamente mensuales sobre laderas de agar de Sabouraud y Agar de dextrosa de patata a 30°C. La cepa de *Candida Albicans* 3179 (obtenida de la Colección Nacional de Cultivos de Tipos [CNCT], Colindale) se mantuvo en un caldo Mueller-Hinton, de la casa Oxoid, a 37°C. La cepa *Streptococcus pyogenes* 8198, la cepa *Staphylococcus aureus* 10642 (resistente a la meticilina) y la cepa 12900 de *E. coli* 0157 fueron obtenidas de la CNCT, Colindale y mantenidas en caldo Mueller-Hinton, de la casa Oxoid, a 37°C.

Ensayos de sensibilidad en el crecimiento fúngico

15 Para determinar la sensibilidad de las cepas fúngicas para cada uno de los péptidos del test, su impacto sobre el crecimiento fúngico fue testado según lo siguiente: fueron preparadas suspensiones de fragmentos de conidios e hifas de *T. interdigitale* y *T. rubrum* mediante la adición de 10 ml de Caldo de Glucosa Nutriente (CGN) (caldo nutriente de la casa Oxoid, que contiene un 2% de glucosa w/v) a un cultivo de ladera y mediante su agitación con una espátula. La suspensión de fragmento conidial/hifal fue filtrada a través de dos capas de gasa quirúrgica estéril para eliminar grandes esteras de hifas y trozos de agar. Fueron inoculados 20 μ l de esta suspensión (absorbencia a 540 nm alrededor de 0.1, correspondientes a aproximadamente 10⁶ propágulos/ml) en cada tubo de ensayo estéril, en gradetas de 96 orificios para tubos de ensayo a las cuales se había añadido previamente un volumen total de 80 μ l de medio nutriente (CGN) y la cantidad apropiada de solución péptida. Los tubos de ensayo de control fueron aquellos en los que el volumen de ensayo final de 100 μ l fue realizado con un medio exclusivo de CGN, más solvente (si es aplicable y en la misma concentración que las muestras de péptido, en su caso). El crecimiento fúngico en las gradetas fue monitorizado por absorción a 540 nm en un lector de gradetas Microtek después de incubaciones a 30°C a 24 horas, 4 días y 7 días.

Ensayos de supervivencia de *Candida Albicans*

30 Para determinar la sensibilidad de cepas fúngicas a cada uno de los péptidos del test, su impacto sobre la supervivencia de *Candida* fue analizada como sigue: los cultivos de *C. albicans* fueron hechos crecer durante 18-24 horas y, entonces, almacenados a 4°C con carácter previo a su uso. Los cultivos frescos crecidos durante la noche fueron centrifugados a 2000 x g. durante 10 minutos y lavados con Caldo Hinton Mueller fresco, ajustando el número de células viables a entre 5 x 10⁶ y 1 x 10⁷/ml. Un tampón de ensayo fue preparado por la adición de 100 μ l de un medio CGN a 6.9 ml de 10 mM de tampón de fosfato de sodio, pH 7.7. Se añadieron 35 μ l de tampón de ensayo con o sin un intervalo de concentraciones de péptidos a un frasquito estéril de polipropileno con tapón de rosca y 15 μ l de la inoculación de *Candida albicans* descrita *supra*. Los frasquitos fueron incubados a 37°C en un baño de agua durante 2 horas, y el número de *Candida* spp. superviviente fue determinado por dilución en serie de salino amortiguado con fosfato estéril (SAF) y planchado sobre discos Petri de 9 cm que contienen Agar Sabouraud, de la casa Oxoid (20 ml). Las cuentas fueron hechas después de la incubación de estas planchas a 37°C durante 18-24 horas.

Ensayos de supervivencia de *Candida Albicans*

45 Fueron cultivadas una cepa 8198 de *Streptococcus pyogenes*, una cepa 10642 (resistente a la meticilina) de *Staphylococcus aureus*, y una cepa 12900 de *E. coli* 0157 (todas obtenidas a partir de la CNCT, Colindale) durante 18 a 24 horas, y, entonces, fueron almacenadas a 4°C con carácter previo a su uso. Fueron centrifugados a 2000 x g durante 10 minutos cultivos frescos cultivados durante la noche y, posteriormente, lavados con caldo Hinton Mueller fresco. La sensibilidad para cada uno de los cuatro péptidos fue analizada como se hizo con el *C. albicans*, descrito *supra*. Para *E. coli* y *S. aureus*, el número inicial de células para el análisis de la sensibilidad del péptido fue de 10⁸/ml y el medio usado para la enumeración fue Agar Nutriente (Oxoid). El *Str. Pyogenes* creció peor que las otras cepas de agar Mueller Hinton y, así, el número inicial de células para estos ensayos fue inferior al de las otras cepas, a 10⁶/ml. La supervivencia del *Str. Pyogenes* fue determinada usando Agar de Soja Triptosa, de la casa Oxoid, en lugar del Agar Nutriente.

Resultados

Inhibición del crecimiento del *Trichophyton* spp. por los Péptidos 1-4

60 Dos patógenos fúngicos dérmicos clínicamente relevantes, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton interdigitale*, fueron cultivados, como se describió *supra* en la parte de materiales y métodos, en un medio solitario de cultivo (cultivos de control) o en un medio de cultivo que contiene 50 μ g/ml de los péptidos 1, 2, 3 ó 4 (mostrados en la Figura 1). El cultivo de *T. interdigitale* y *T. rubrum* fue analizado mediante la medición de la densidad óptica (absorbencia a 540 nm) después de 4 y de 7 días en cultivo. En comparación con el control, en las muestras no tratadas, cada péptido testado inhibió significativamente el crecimiento del *T. interdigitale* (Figura 2) y del *T. rubrum* (Figura 3) en el día 4 y en el día 7.

ES 2 351 879 T3

Inhibición del crecimiento y supervivencia de Candida spp. por los Péptidos 1-4

La levadura *Candida albicans* fue cultivada, como se describió *supra* en la parte de materiales y métodos, en un medio solitario de cultivo (cultivos de control) o en un medio de cultivo que contiene 50 µg/ml ó 100 µg/ml y 300 µg/ml ó 500 µg/ml de los péptidos 1, 2, 3 ó 4. El crecimiento de *C. albicans* fue analizado mediante la medición de la densidad óptica (absorbencia a 540 nm) después de 24 horas (Figura 4a) y de 48 horas (Figura 4b) en cultivo. En comparación con el control, en las muestras no tratadas, cada péptido testado inhibió significativamente el crecimiento de *C. albicans* tanto en una forma dependiente del tiempo y dependiente de la dosis. La dependencia de la dosis de la inhibición del crecimiento fue confirmada posteriormente en experimentos en los cuales el crecimiento de *C. albicans* fue analizado ópticamente después de 24 horas en cultivo bajo condiciones de control (medio solitario de crecimiento) o en la presencia de un intervalo de concentraciones del péptido 1, desde 50 µg/ml a 500 µg/ml (Figura 5). En un experimento independiente, la supervivencia de *C. albicans* fue analizada después de 18-24 horas en cultivos crecidos en medio solitario (controles) o en aquellos que comprenden un intervalo de concentraciones de péptido 4 que abarcan de 1 µg/ml a 1000 µg/ml (Figura 6). La supervivencia de los organismos de *C. albicans*, analizada por mediciones de viabilidad después de 24 horas en el cultivo, decrecieron en una forma dependiente de la dosis (Figura 6).

Inhibición de la supervivencia bacteriana por el péptido 4

Tres patógenos bacterianos clínicamente relevantes, *E. coli* 0157, *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente a la meticilina, y *Streptococcus pyogenes* fueron expuestos, como se describió *supra* en la parte de materiales y métodos, a un intervalo de concentraciones del péptido 4. Después de un período de 3 horas, fueron transferidas muestras cada cultivo bacteriano a gradetas apropiadas de medios de cultivo de fase sólida y los números de colonias viables bajo control (solamente en medio de control) y las muestras tratadas (medio de crecimiento que contiene el péptido 4) fueron analizadas después de 18-24 horas. Después de 3 horas de exposición, el péptido 4 inhibió significativamente la supervivencia de cada cepa bacteriana (Figura 7) en comparación al control, cultivos no tratados, en una forma dependiente de la dosis.

El ácido acético realza la actividad antifúngica del péptido 4

Al contener tanto el control (no péptido) como los medios de análisis (conteniendo péptidos 1, 2, 3 ó 4) en los experimentos mostrados en las figuras 2 y 3, un 0.5% de ácido acético como un solvente péptido (detallado en la parte de materiales y métodos), se programó un experimento independiente para cerciorarse de si el ácido acético en sí mismo podría jugar un papel en la actividad péptida y/o la supervivencia fúngica. Con este objeto, los experimentos de cultivo del *T. rubrum* fueron realizados según se explica en la parte de “métodos y materiales”, con un medio de cultivo solitario, con medio de cultivo conteniendo solamente 0.01% de ácido acético, medio de cultivo conteniendo 1 mg/ml de péptido 4 y medio de cultivo conteniendo 1 mg/ml de péptido 4 más 0.01% de ácido acético. El crecimiento del hongo fue determinado por OD como se describió *supra* después de 3 días de cultivo. Como se esperaba, el péptido 4 inhibió el crecimiento del *T. rubrum*. El 0.01% de ácido acético, por sí solo, no tuvo efectos significativos en el crecimiento del *T. rubrum* (Figura 8), pero cuando fue incluido en el medio con péptido 4, la presencia de 0.01% de ácido acético inhibió significativamente el crecimiento del *T. rubrum* más que 1 mg/ml de péptido 4 por sí solo.

Inhibición del crecimiento de T. interdigitale y de T. rubrum por el Péptido 4

Los efectos inhibitorios del Péptido 4 en el crecimiento de *Trychophyton spp.* fueron determinados por análisis del crecimiento fúngico como se indica en la parte de “métodos y materiales”. *T. interdigitale* y *T. rubrum* fueron cultivados en un medio solitario o en un medio que contiene 3 concentraciones diferentes del Péptido 4. Ningún ácido acético estuvo presente en ninguna de las muestras. Los controles del medio solitario fueron usados para ilustrar los antecedentes de absorción del medio. El cultivo del hongo fue determinado por el OD tal como se describió *supra* después de 96 horas de incubación a 30°C. Como se muestra en la Figura 9, estos ensayos confirmaron el efecto inhibitorio del Péptido 4 en el crecimiento de ambas especies de hongos, siendo *T. interdigitale* notoriamente más susceptible a los efectos inhibitorios del tratamiento con el Péptido 4 que el *T. rubrum*. El crecimiento de *T. interdigitale* fue inhibido en concentraciones de Péptido de 0.55 mg/ml.

Efectos de los Péptidos 3 y 4 sobre el crecimiento de T. interdigitale

Fue analizado el potencial antifúngico del Péptido 3 y del Péptido 4 sobre *T. interdigitale*. Los análisis de inhibición del crecimiento fueron ejecutados como se indica en “métodos y materiales” en la ausencia de ácido acético. Como los Péptidos 1-3 son altamente hidrofóbicos y, en consecuencia, insolubles, sólo habían sido previamente testados contra el *Trychophyton spp.* en ácido acético como solvente. Cuando los cultivos de *T. interdigitale* fueron cultivados durante 7 días en la presencia del Péptido 3, el Péptido 4 ó el medio solitario sin solvente de ácido acético y crecimiento medido por OD, se observó cómo el Péptido 4 inhibía de forma significativa el crecimiento fúngico (Figura 10), mientras que el Péptido 3 no mostró actividad inhibitoria (Figura 10). Esta actividad incrementada del Péptido catiónico 4 sobre el Péptido hidrofóbico 3 en la ausencia de 0.5% de ácido acético sugirió una contribución significativa del ácido acético a la actividad vista *supra* para los péptidos hidrofóbicos.

Efectos del ácido acético sobre el crecimiento de T. interdigitale

Fue analizada la inhibición del crecimiento de *T. interdigitale* por el ácido acético mediante la realización de experimentos de crecimiento fúngico según la parte de “métodos y materiales”. Los cultivos de *T. interdigitale* fueron cultivados sin tratar o tratados con tres concentraciones diferentes de ácido acético a 30°C durante 96 horas (Figura 11). Esto ilustra que hay un efecto significativo de un 0.5% de ácido acético, la misma concentración que fue usada previamente con Péptidos 1-4 como solventes. Este experimento, conjuntamente con la falta de actividad del Péptido 3 en la ausencia de ácido acético sugiere que el Péptido 4 es el compuesto más activo contra el *Trychophyton* spp.

Efectos de Poli-L-Lisina sobre el crecimiento de T. interdigitale

Como el Péptido 4 es un péptido altamente catiónico que comprende residuos de Lisina y de Arginina, la actividad antifúngica de las formas Poli-L de estos amino ácidos fue testada contra el *T. interdigitale* usando análisis de inhibición del crecimiento como se detallo en “materiales y métodos” en ausencia de ácido acético. Fuero empleados el Control, cultivos de *T. interdigitale* no tratados y los que contenían entre 1 mg/ml y 50 µg/ml de moléculas poli-L-Lisinas en el intervalo de 27-100 residuos y 100-200 residuos de longitud. El crecimiento del *T. interdigitale* en cada cultivo fue analizado después de 96 horas a 30°C. Ambas medidas de moléculas de poli-L-lisina inhibieron el crecimiento del *T. interdigitale* (Figura 12) pero en cuanto la molécula mayor inhibió el crecimiento en todas las concentraciones testadas, la actividad inhibitoria fue vista con la molécula de 27-100 amino ácidos de longitud solamente en las concentraciones más elevadas (Figura 12). Esto sugiere que los efectos de inhibición del crecimiento de la Lisina sobre el *Trychophyton* spp. es dependiente tanto del tamaño como de la dosis.

Efectos de Poli-L-Arginina y Poli-L-Lisina sobre el crecimiento de T. rubrum

La actividad antifúngica de poli-L-Arginina en contraposición a la de poli-L-Lisina fue testada entonces contra *T. rubrum*. La inhibición del crecimiento fue determinada en la ausencia de ácido acético conforme se indica en la parte de “materiales y métodos”. El *T. rubrum* fue cultivado en un medio solitario, en un medio que contenía poli-L-Arginina (28-86 amino ácidos de longitud) y poli-L-Lisina (100-200 amino ácidos). También se hizo uso de un control de medio solitario no inoculado. Los cultivos fueron conservados y el crecimiento vigilado durante 96 horas a 30°C. Tanto la poli-L-Arginina como la poli-L-lisina inhibieron el crecimiento de *T. rubrum* (Figura 13). La poli-L-Arginina fue más activa en su impacto inhibitorio contra *T. rubrum* que la poli-L-Lisina cuando fueron testadas en dosis equivalentes, inhibiendo totalmente el crecimiento a 1 mg/ml (Figura 13).

Inhibición de T. interdigitale y de T. rubrum por poli-L-Arginina

La inhibición del crecimiento de *Trychophyton* spp. por poli-L-Arginina fue testada por la realización de experimentos de crecimiento fúngico como se indica en la parte de “métodos y materiales”. Los cultivos de *T. rubrum* y *T. interdigitale* fueron cultivados o bien en un medio solitario o bien en un medio que contenía 3 concentraciones diferentes de poli-L-Arginina. No hubo presencia de ácido acético en ninguna de las muestras. Los controles del medio fueron utilizados para ilustrar los antecedentes del medio en cuanto a la absorción. El crecimiento del hongo fue determinado por el OD tal y como se describió *supra* después de 96 horas de incubación a 30°C (Figura 14). Se ha visto que la poliarginina es activa contra ambas especies de hongos desde un mínimo de 0.55 mg/ml (Figura 14).

Efecto de una concentración reducida (100 µg/ml) de poliarginina sobre T. rubrum y T. interdigitale

La inhibición del crecimiento de *Trychophyton* spp. por poliarginina fue testada por la realización de experimentos de crecimiento fúngico como se indica en la parte de “métodos y materiales”. Los cultivos de *T. rubrum* y *T. interdigitale* o bien no fueron tratados o lo fueron con una concentración individual de poliarginina (100 µg/ml) sin que hubiera presencia de ácido acético en ninguna de las muestras. Los controles del medio fueron utilizados para ilustrar los antecedentes del medio en cuanto a la absorción. El crecimiento del hongo fue determinado por el OD tal y como se describió *supra* después de 96 horas de incubación a 30°C (Figura 15). La concentración reducida lleva a una pérdida de actividad, esto ilustra el efecto de la dosis de la poliarginina sobre el *Trychophyton* spp.

El efecto de los trímeros de péptido (3 amino ácidos) sobre el crecimiento de T. rubrum

Se testó la actividad de los trímeros de poli-L-lisina, poli-L-Arginina, poli-L-histidina y poli-L-triptófano sobre el crecimiento de *T. rubrum*. La inhibición del crecimiento fue fijada según los “métodos y materiales” y el *T. rubrum* o bien fue dejado sin tratar o expuesto a 2 mg/ml de cada uno de los trímeros. Los cultivos fueron conservados durante 96 horas a 30°C. El crecimiento fúngico fue medido por OD y los resultados mostrados como un porcentaje del crecimiento en el cultivo sin tratar (Figura 16). La poli-L-Arginina fue el péptido más activo contra *T. rubrum* requiriéndose sólo un polipéptido de 3 amino ácidos para obtener una reducción significativa en el crecimiento de *T. rubrum*.

Efecto del péptido 4 (1.2 mg/ml) y NaCl sobre el crecimiento de T. interdigitale

Fue investigado el impacto de las variadas concentraciones de sal sobre la actividad antifúngica del Péptido 4 hacia *T. interdigitale*. Los análisis de la inhibición del crecimiento de *T. interdigitale* fueron establecidos, en ausencia de ácido acético, según los “métodos y materiales”. Los cultivos fueron dejados sin tratar o expuestos al Péptido 4 más un

ES 2 351 879 T3

intervalo de concentraciones de NaCl desde 100 mM a 500 mM. Los cultivos de *T. interdigitale* fueron conservados durante 96 horas a 30°C y el crecimiento fue determinado por OD como se describió *supra* (Figura 17). Se reportó la inhibición de las actividades antimicrobianas de las β -defensinas endógenas por concentraciones salinas incluso bajas.

5 *Efecto del péptido 4 contra Candida albicans a altas concentraciones salinas*

Fue determinada la supervivencia de *C. albicans* tal y como se detalló en “métodos y materiales” siguiendo una incubación de 2 horas a 37°C con un intervalo de concentraciones de Péptido 4. Se introdujeron dos concentraciones de NaCl en el medio de cultivo para averiguar el impacto de condiciones fisiológicas y de muy alta salinidad (conocidas por inhibir la actividad de péptido de β -defensina endógeno). Se observó una significativa actividad destructiva del Péptido 4 incluso en concentraciones muy elevadas de sal (Figura 18). A medida que se incrementa la concentración del Péptido 4, se puede ver que el impacto de la concentración mayor de sal se reduce (Figura 18). En consecuencia, la actividad fungicida del Péptido 4 no es inhibida por las sales.

15 *Actividad de Poli-L-Lisina, Poli-D-Lisina y Poli-D-Arginina contra Candida albicans*

La actividad antifúngica de poli-L-Arginina en contraposición a la de Lisina, y poli-L en contraposición a la de poli-D-Lisina fue testada con objeto de determinar si alguna de estas variantes de péptidos demostraban actividad incrementada contra *Candida albicans*. *Candida* spp. fue incubada tal y como se describe en la parte de “materiales y métodos” durante 2 horas a 37°C en presencia de 100 μ g/ml, 1 mg/ml y 10 mg/ml de poli-D-Lisina, Poli-L-Lisina, y poli-L-Arginina. La supervivencia fue testada como se detalló previamente y demostró una actividad antifúngica incrementada de poli-L-Arginina sobre la Poli-L-Lisina (Figura 19). También demuestra que la poli-D-Lisina tiene una actividad antifúngica muy similar a la de la Poli-L-Lisina.

25

30

35

40

45

50

55

60

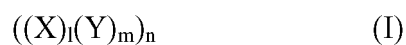
65

ES 2 351 879 T3

REIVINDICACIONES

1. El uso de un péptido o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la fórmula I:

5



10

en la que el péptido consiste de entre 3 y 200 aminoácidos y en el que I y m son números enteros desde 0 a 10; n es un número entero de 1 a 10; X e Y son los mismos y son arginina, en la producción de un medicamento para el tratamiento de una infección de dermatofitos.

15

2. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación anterior en la que el péptido comprende de 3 a 100 amino ácidos.

3. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 2 en la que el péptido comprende de 3 a 100 amino ácidos.

4. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 3 en la que el péptido comprende de 4 a 50 amino ácidos.

20

5. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente en el que la infección es causada por un patógeno fúngico del género *Trichophyton* spp.

6. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 5 en el que el patógeno fúngico es *Trichophyton interdigitale*.

25

7. Un uso como el reivindicado en la reivindicación 5 en el que el patógeno fúngico es *Trichophyton rubrum*.

8. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente en el que la infección fúngica es una infección cutánea.

30

9. Un uso como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente en el que la infección es onicomicosis.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 351 879 T3

Peptido 1 +9.24 Hidrofobicidad 0 Carga Mixta
GGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGGGGGGGCGGGGGGCCGG

Peptido 2 +67.04 Hidrofobicidad 0 Carga Mixta
LLLLLLCLLLLLCLLLLLCLLLLLLLLLLLLLCLLLLLLCLL

Peptido 3 +38.14 Hidrofobicidad 0 Carga Mixta
GLGLGLGCLGLGLGCGLGLCLGLGLGLGLGCGLGLGLCCLG

Peptido 4 -27.64 Hidrofobicidad +36 Carga Mixta
KRKRKRKCRKRKRRCRKRKCKRKRKRKRKCRKRKRKCCRRK

Figura 1

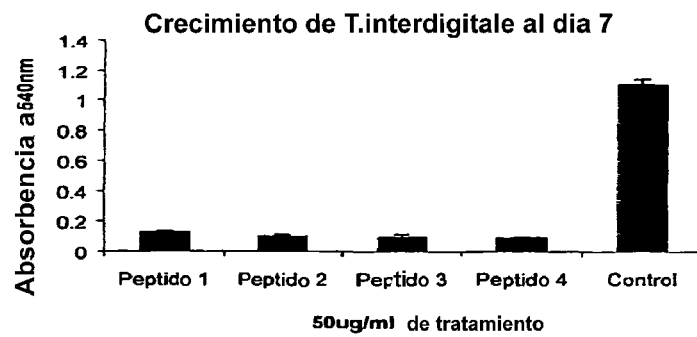
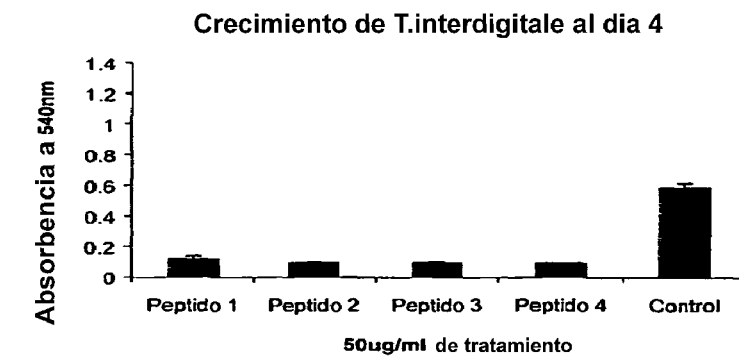


Figura 2

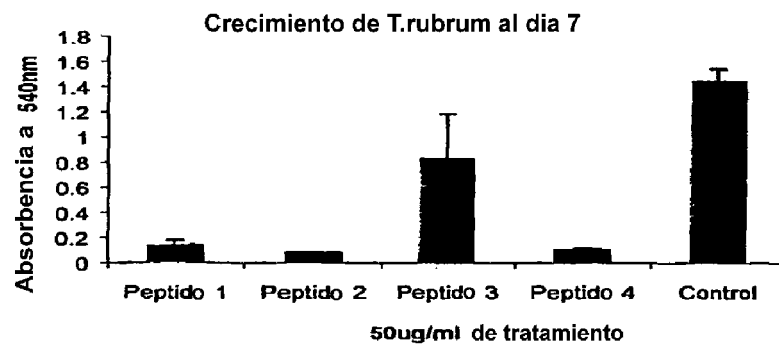
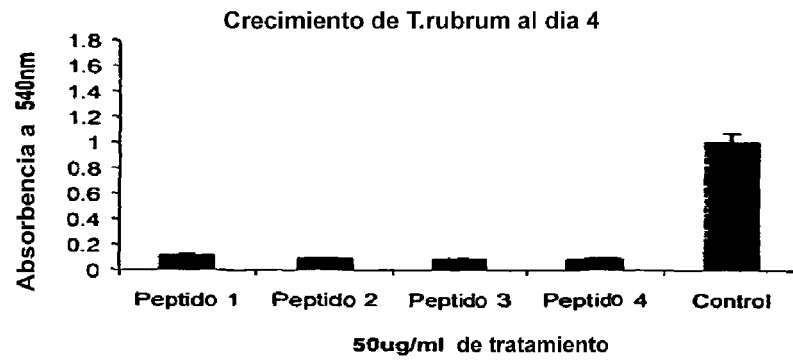


Figura 3

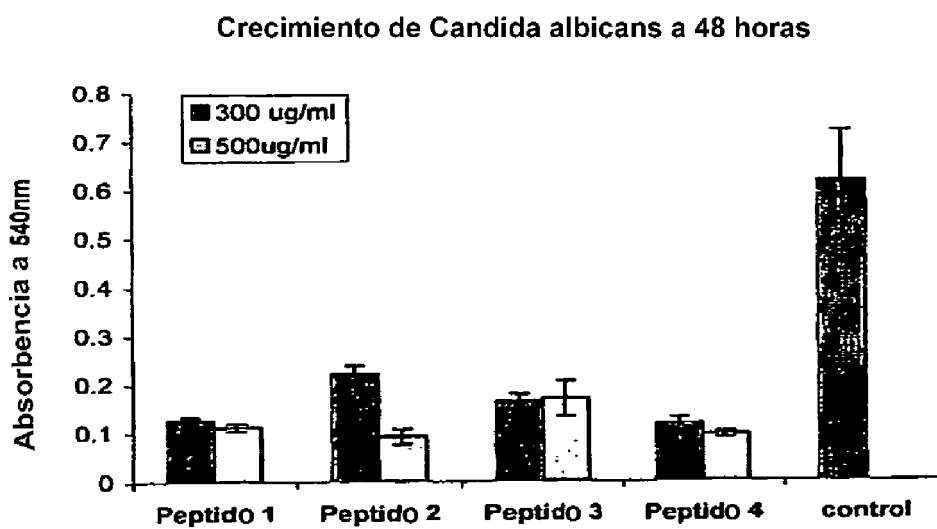
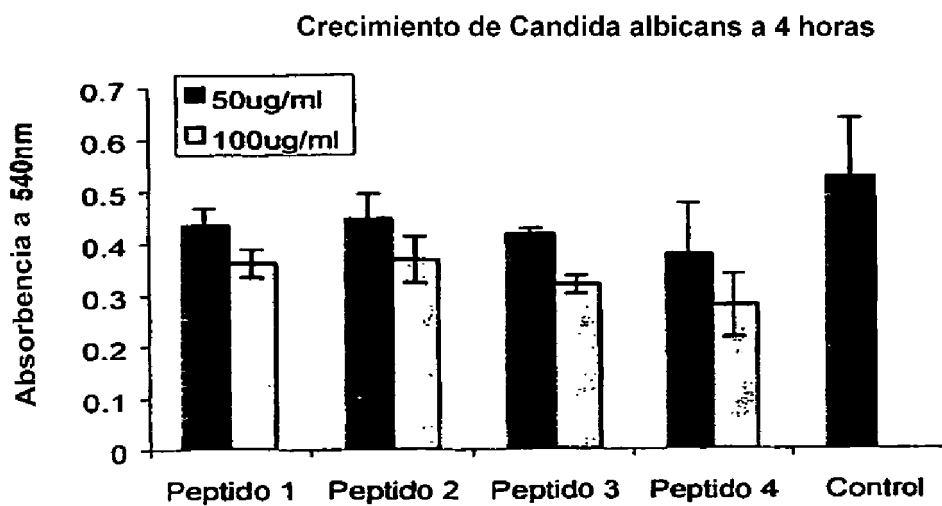


Figura 4

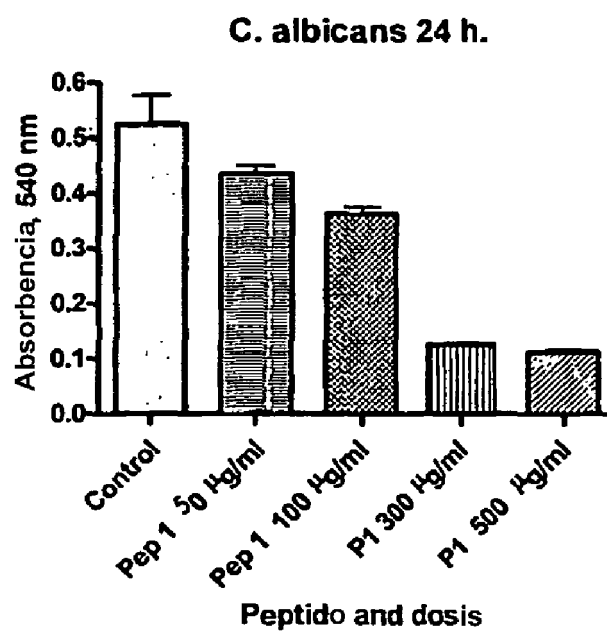


Figura 5

Figura 6

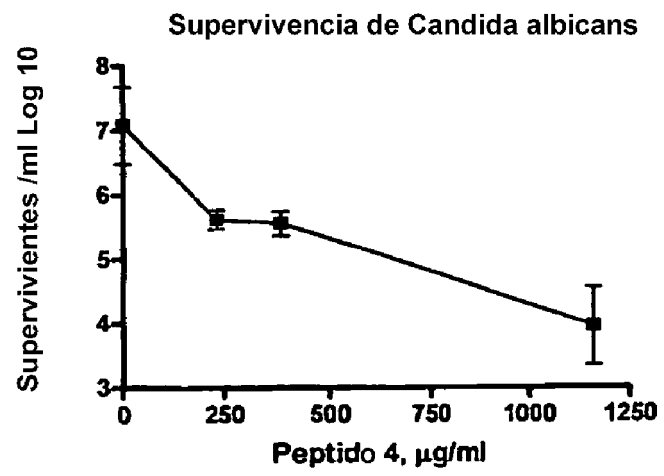
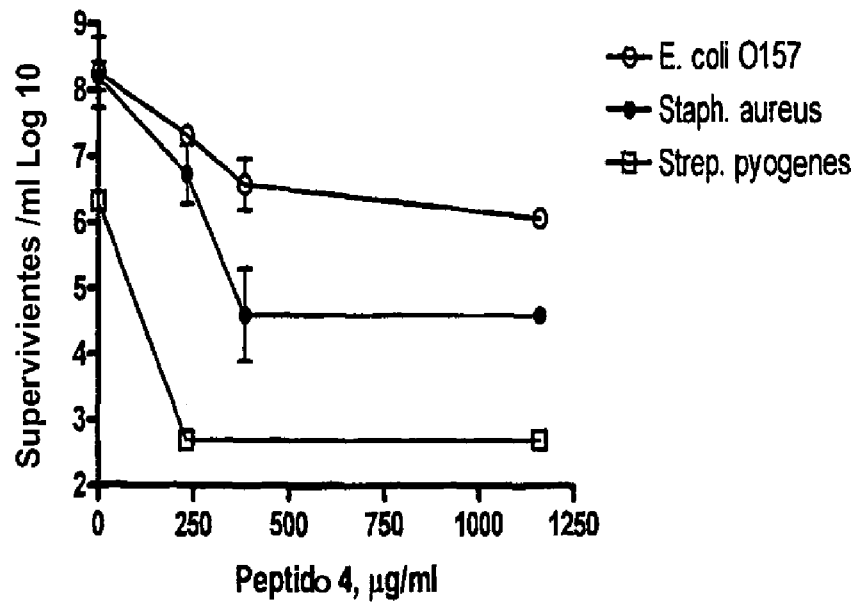


Figura 7



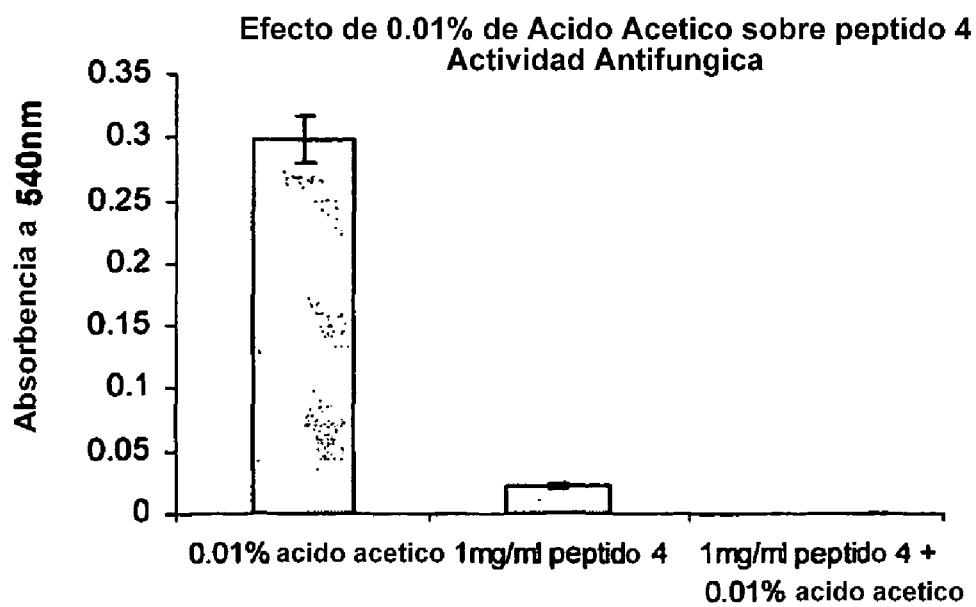


Figura 8

Inhibición de *T. interdigitale* y *T. rubrum* por Pep 4

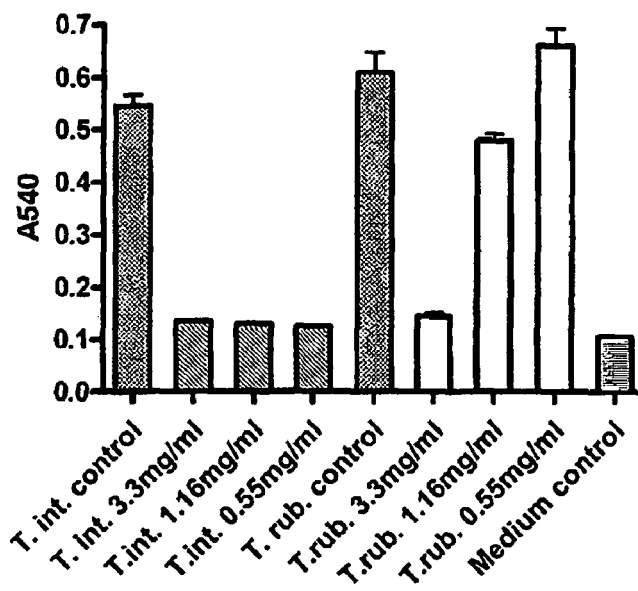


Figura 9

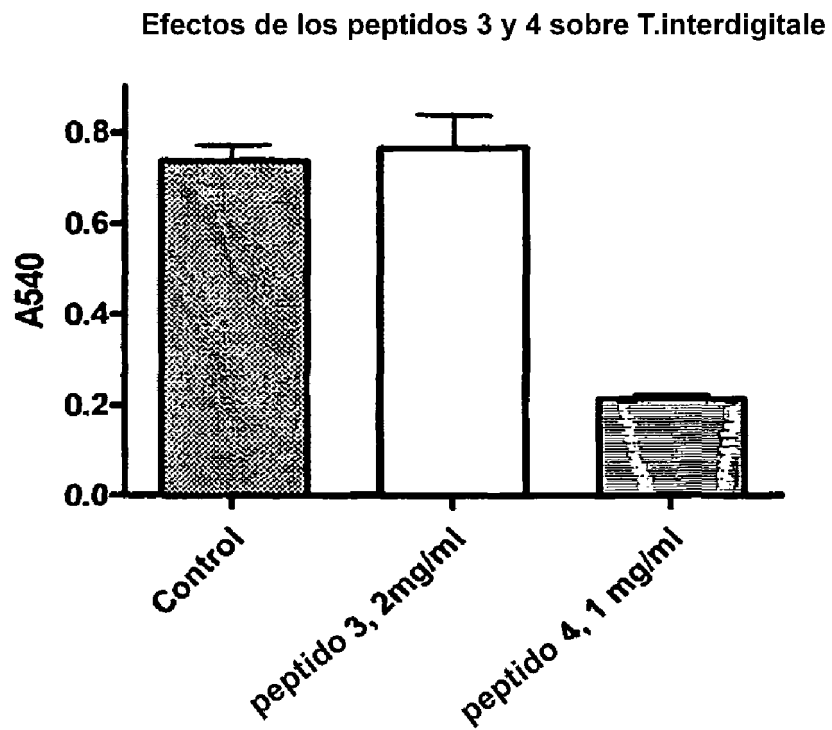


Figura 10

Efecto de acido acetico sobre el crecimiento de *T. interdigitale*

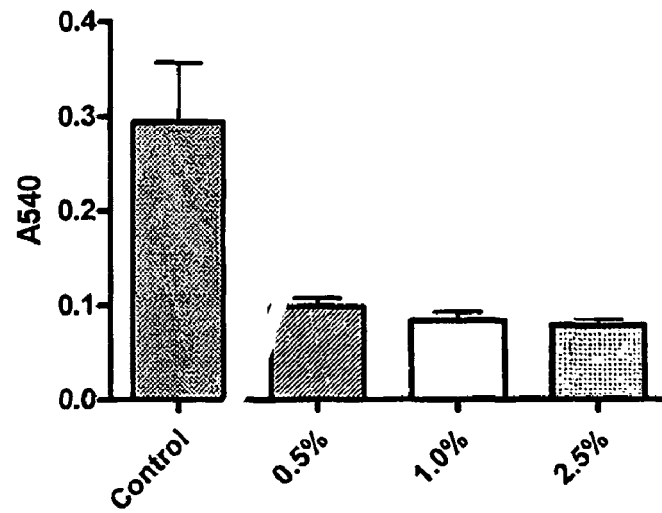


Figura 11

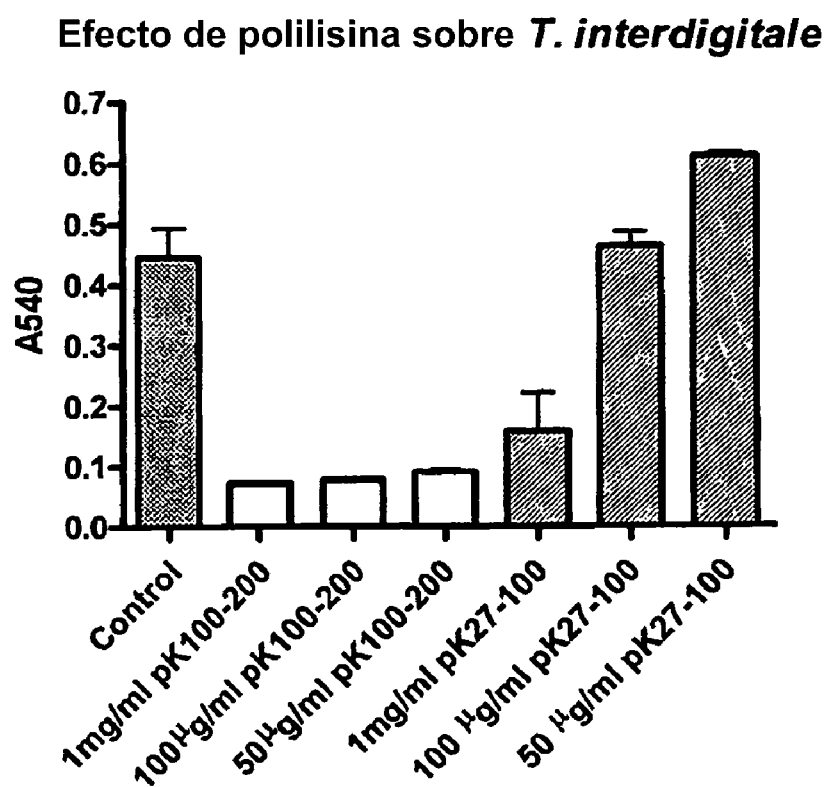


Figura 12

Efectos de poliarginina y polilisina sobre el crecimiento de *T. rubrum*

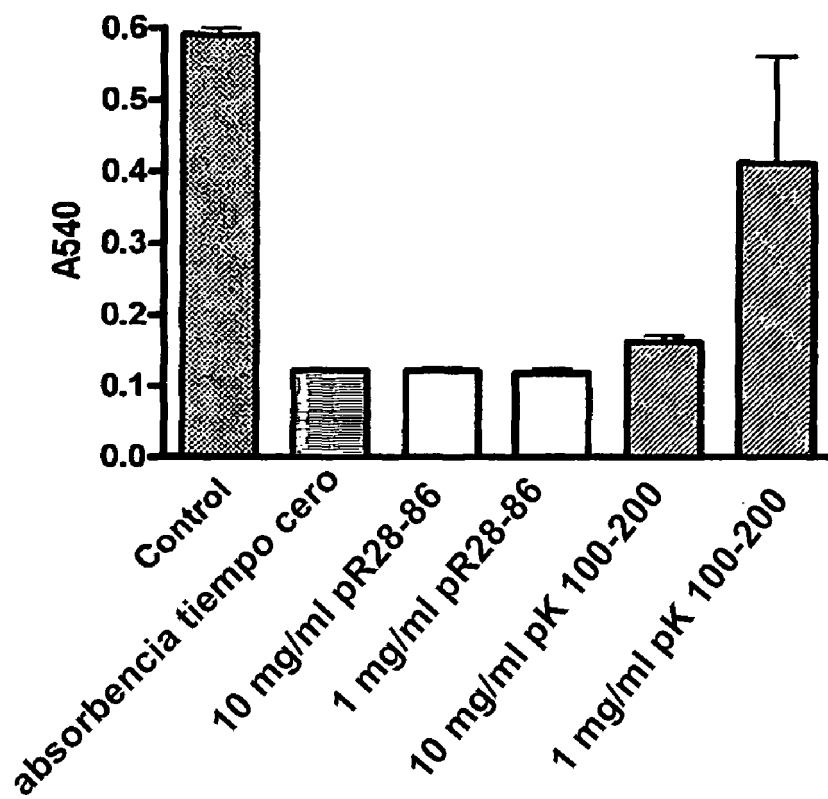


Figura 13

Inhibición de *T. interdigitale* y *T. rubrum* por poli arginina (pK28-86)

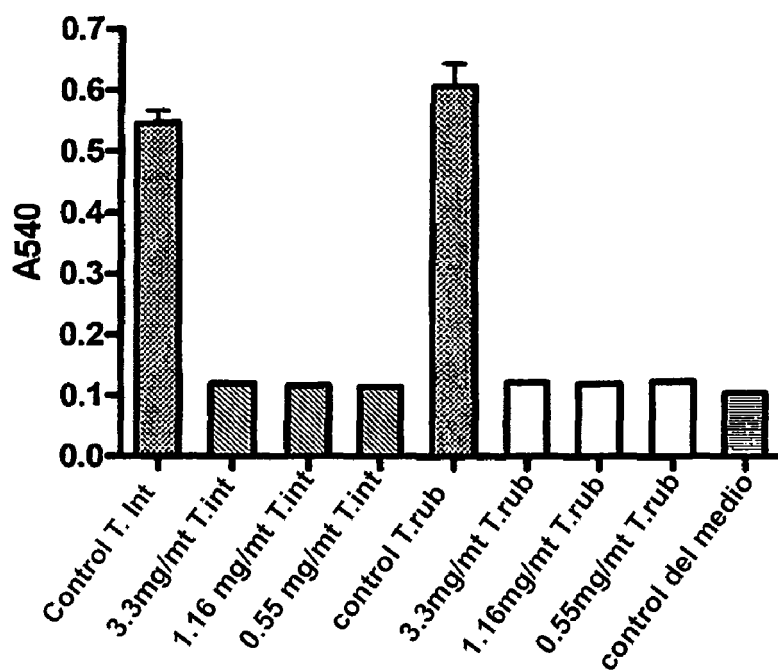


Figura 14

Efecto de la concentración reducida (100µg/ml) de poli arginina sobre *T.rubrum* y *T.interdigitale*

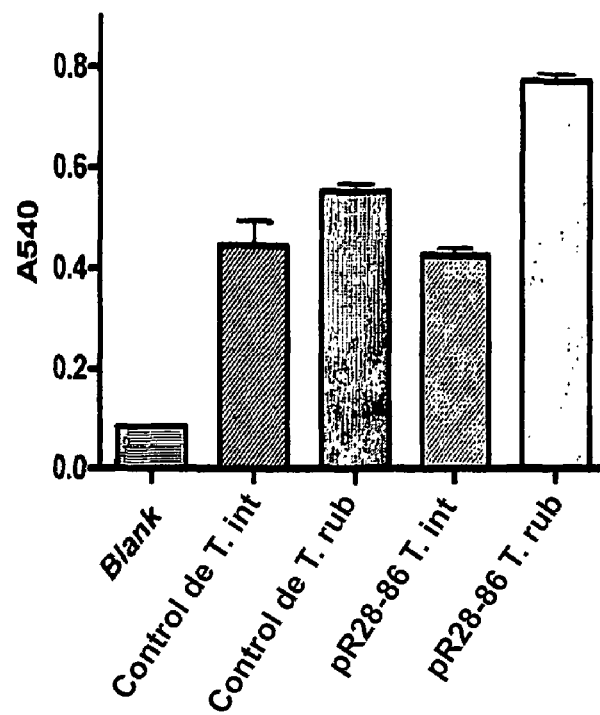


Figura 15

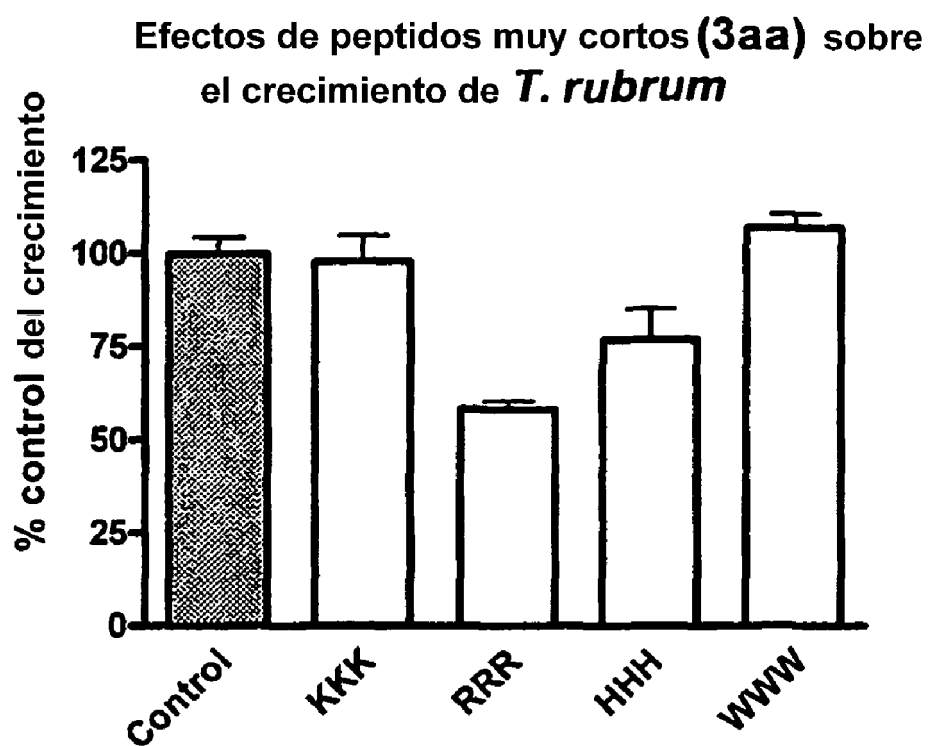


Figura 16

Efecto de peptido 4 (1.2mg/ml) y NaCl sobre el crecimiento de *T. interdigitale*

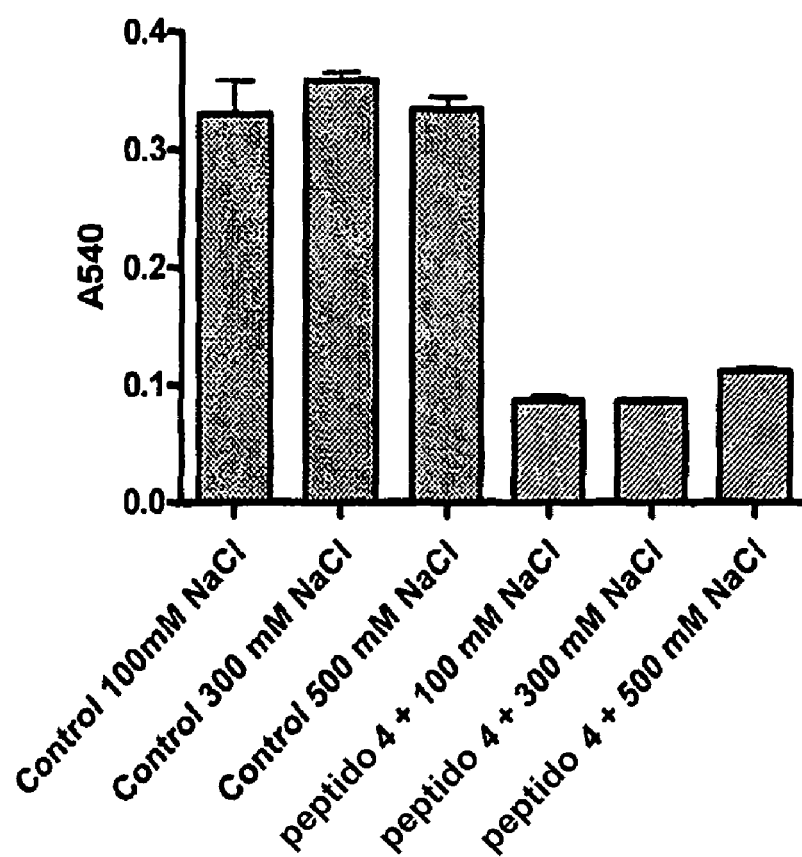


Figura17

Actividad del peptide 4 hacia *Candida albicans*
a concentraciones incrementadas de sal

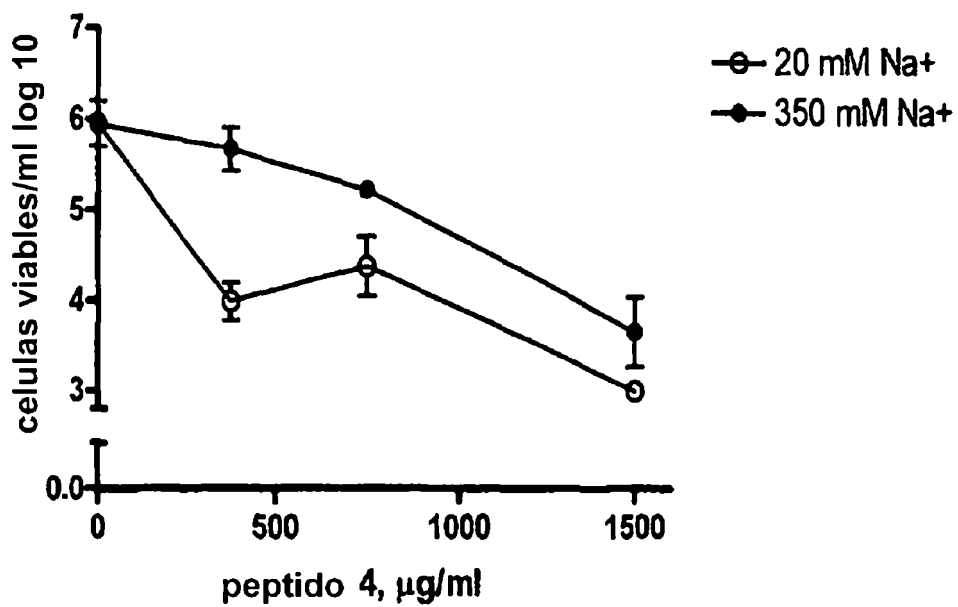


Figura 18

Efectos de polilisina y poliarginina en la supervivencia de *Candida albicans*

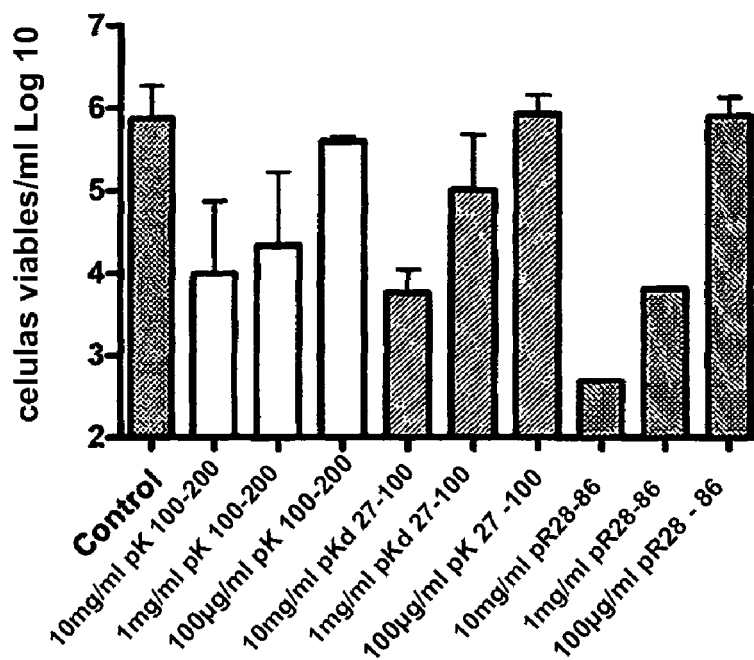


Figura 19

Tabla I

Lista no exhaustiva de Patógenos Fúngicos Humanos

Género	Especie	Comentarios
Absidia	corymbifera	
Acremonium	Falcoformo	
	kubensis	
	recifei	
Apophrysomycetes	elegans	
Aphelionyces	Dermatitidis	
	Capsulatus	
Alternaria	alternata	
Anthroderna	vanbreuseghemii	
Anthrographis	katrae	
	Orisea	
	cebolidea	
Aspergillus	Fumigatus	
	Ochraceus	
	Vericolor	
	Flavus	
	terreus	
	glaucus	
	Nidulans	
	niger	
	Oryzae	
	flavipes	
	ustus	
Basidiobolus	Ranarum	
	Meristosporus	
	heptosporus	
Beauveria	bassiana	
Bipolaris	specifera	
	Australensis	
	hawaiensis	
Blastomyces	Dermatitidis	
	brasiliensis	
Blastoschizomyces	capitatum	

ES 2 351 879 T3

Candida	Albicans	
	Tropicalis	
	Glabrata	
	parapsilosis	
	krusei	
	zeylanoides	
	guilliermondii	
	pelliculosa	
	Kefyr	
	dublinsiensis	
Chrysosporium	Keratinophilum	
	Tropicum	
	Merdarium	
	Inops	
	Pannicola	
	Queenslandicum	
	Zonatum	
	parvum	
Cladophialophora	Bantiana	
	carionii	
Cladosporium	Bantianum	
	Caldosporiodes	
Coccoides	Immitis	
Conidiobolus	coronatus	
Coniothyrium	fuckelii	
Cryptococcus	neoformans	Variantes neoformans & gattii & grubii
	Albidus	
	laurentii	
Cunninghamella	bertholletiae	
Curvularia	Brachyspora	
	Clavata	
	Geniculata	
	Lunata	
	Pallescens	
	Senegalensis	
	verruculosis	
Emmonsia	Parva	Variantes parva & crescens
Epidermophyton	Floccosum	
	rubrum	
	stockdaleae	
	gallinae	

ES 2 351 879 T3

Exophiala	jeanselmiae dermatitidis	
Exserohilum	Rostratum Halodes meginnisii longirostratum	
Filobasidiella	neoformans	Variantes neoformans & gattii
Fonsecaea	Compacta Pedrosoi	
Fusarium	oxyporum solani	
Geotrichium	candidum	
Histoplasma	Capsulatum	Variantes capsulatum, dubiosii & farcinimosum
Lacazia	loboi	
Lasiodiplodia	theobromae	
Lcptosphaeria	senegalensis	
Loboa	loboi	
Madurella	Grisea mycetomatis	
Malassezia	furfur	
Microsporum	gypseum Audoinii canis Nanum Fulvum ferrugineum distortum	
Mucor	Ramosissimus Indicus circinneloides hiernalis	
Neotestudina	Rosatii	
Nocardiosis	dassonvillei	
Ochroconis	gallopava	
Onchyocola	canadiensis	

ES 2 351 879 T3

Paecilomyces	crustaceus variotii	
Paracoccidiomyces	brasiliensis	
Paracoccidioides	Brasiliensis	
Penicillium	Marneffeii verrucosum	
Phaeoannellomyces	werneckii	
Phialophora	verrucosa Repens parasitica	
Phoma	Cruris-hominis	
Piedaria (Piedra)	Hortae (iahortae)	
Pneumocystis	carinii Jiroveci(i)	
Pseudallescheria	Boydii	
Pyrenochaeta	romeroi	
Rhinosporidium	seeberi	
Rhizomucor	pusillus	
Rhizopus	arrhizus	
Rhodotorula	Rubra Minuta Glutinis mucilaginoso	
Saccharomyces	cerevisiae Boulardii	
Scedosporium	Apiospermum Proliferans Inflatum	
Scopulariopsis	brevicaulis	
Schizophyllum	commune	
Scytalidium	Dimidiatum hyalinum	

ES 2 351 879 T3

Sporobolomyces	salmonicolor	
Sporothrix	Schenckii	
Stachybotrys	Chartarum	
	Atra	
	alternans	
Syncephalastrum	racemosum	
Trichoderma	longibrachiatum	
Trichophyton	Rubrum	Incluyendo variantes nigricans & granular
	Interdigitale	
	Mentagrophytes	Incluyendo variantes interdigitale & goetzii
	Violaceum	
	Tonsurans	
	schoenleinii	
	Megninii	
	concentricum	
	Sourdanense	
	gourvillii	
	verrucosum	
	terrestre	
Trichosporon	beigleii	
Ulocladium	botyris	
	chartarum	
Ustilago	maydis	
Verticillium	affinae	
	Albo-atrum	
	fusisporum	
	luteoalbum	
Wangiella	dermatitidis	
Xylohypha	Bantiana	

Tabla 2

Códigos de polímeros de aminoácidos

KKK - Trimero de L-Lisina

RRR - Trimero de L-Arginina

HHH - Trimero de L-Histidina

WWW - Trimero de L-Triptópano

pK3-14 - Poli -L-lisina-HBr 500-2,000Da (3-14aa)

pK7-27 - Poli -L-lisina-HBr 1,000-4,000Da (7-27aa)

pK100-200 - Poli -L-lisina-HCl 15,000-30,000Da (100-200aa)

pKd27-100 - Poli -D-lisina-HBr 4,000-15,000Da (27-100aa)

pR28-86 - Poli -L-arginina-HCl 5,000-15,000 (28-86aa)