

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

(21) **PI 0619641-1 A2**

(22) Data de Depósito: 21/12/2006
(43) Data da Publicação: 11/12/2012
(RPI 2188)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 7/64
C07K 14/47
A61K 38/12
A61K 38/17

(54) Título: PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PEPTÍDEO, PEPTÍDEO CICLIZADO, COMPOSIÇÃO, USO DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, E, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA INFECÇÃO MICROBIANA EM UM INDIVÍDUO

(57) Resumo: PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PEPTÍDEO, PEPTÍDEO CICLIZADO, COMPOSIÇÃO, USO DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, E, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA INFECÇÃO MICROBIANA EM UM INDIVÍDUO. A presente invenção se refere a peptídeos catiônicos e seu uso no tratamento de infecções microbianas.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2005 GB 0526120.1,
24/02/2006 US 60/776505

(73) Titular(es): Novabiotics Limited

(72) Inventor(es): Deborah O' Neil

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT GB2006004890 de
21/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/072037 de
28/06/2007

“PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UM PEPTÍDEO, PEPTÍDEO CICLIZADO, COMPOSIÇÃO, USO DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, E, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA
5 INFECÇÃO MICROBIANA EM UM INDIVÍDUO”

Campo da invenção

A presente invenção refere-se a peptídeos catiônicos cíclicos e seu uso no tratamento de infecções microbianas.

Fundamentos da invenção

10 Peptídeos antimicrobianos (AMP) formam a pedra-de-toque da imunidade eucariótica e proporcionam uma primeira linha de defesa contra penetração da pele e de superfícies de mucosas por microorganismos. Exemplos de AMP naturais incluem as famílias defensina e catelicidina de peptídeos. Estes AMP têm comprimento, seqüência e estrutura heterogêneos,
15 mas o mais comum é o seu pequeno tamanho, carga catiônica pura e estrutura anfifática. Peptídeos antimicrobianos catiônicos pequenos também foram isolados de muitas bactérias, fungos, plantas, invertebrados e vertebrados e também poderiam desempenhar, portanto, um papel nas defesas procarióticas.

20 AMP naturais apresentam atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras, fungos e vírus envelopados. Patógenos microbianos não parecem adquirir resistência a estes peptídeos catiônicos e, como tais, AMP têm sido conservados como moléculas de defesa do hospedeiro imunes inatas vitais ao longo de milhares de anos de evolução. Portanto, não é surpreendente que AMP tenham sido
25 implicados como alvos potenciais para terapêuticos para uma ampla faixa de infecções. No entanto, o fato de que eles são tecnicamente desafiadores e onerosos de serem produzidos em sistemas recombinantes e que apresentam potentes funções biológicas quiomitáticas e inflamatórias e exclui formas de AMP naturais como terapêuticos.

Em nosso pedido copendente nós mostramos que peptídeos lineares ricos em determinados radicais básicos, como lisina ou arginina, apresentam atividade antimicrobiana e, em particular, atividade antifúngica. No entanto permanece uma necessidade de agentes adicionais que podem ser usados no tratamento ou prevenção de infecções microbianas.

Declarações da invenção

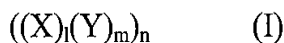
De acordo com um primeiro aspecto da invenção, proporciona-se um peptídeo compreendendo de 2 a cerca de 200 aminoácidos D e/ou L, que podem ser iguais ou diferentes, em que os aminoácidos são selecionados do grupo que consiste de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aminoácidos catiônicos, e em que o peptídeo é cíclico. O peptídeo cíclico pode compreender 3 a cerca de 100 aminoácidos D e/ou L, por exemplo, de 3 a 50 aminoácidos D e/ou aminoácidos L incluindo de 4 a cerca de 50 aminoácidos D e/ou L.

Os peptídeos da invenção são úteis no tratamento ou prevenção de infecções microbianas.

Os peptídeos cíclicos da invenção são desejáveis como um terapêutica porque são altamente efetivos, proteoliticamente estáveis, substancialmente insensíveis ao sal, não hepatotóxicos, não-hemolíticos e fáceis de sintetizar.

Acredita-se que a carga catiônica dos peptídeos da invenção facilita a associação do peptídeo com os grupos principais polares de membranas microbianas. Acredita-se que a estabilização dos grupos carregados em uma conformação mais densa, por meio de ciclização aumenta sua atração, incrementando com isso a potência antimicrobiana dos peptídeos.

Em um aspecto adicional da invenção proporciona-se um peptídeo compreendendo aminoácidos de acordo com a fórmula I:



em que l e m são números inteiros de 0 a 10, de tal forma que ambos, l e m,

não sejam 0; n é um número inteiro de 1 a 10; X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, são um aminoácido selecionado do grupo que consiste de aminoácidos hidrofóbicos e/ou aminoácidos catiônicos e em que o peptídeo é cíclico, para uso como um produto farmacêutico.

5 O peptídeo pode compreender de 2 a 50 aminoácidos, por exemplo, 3, 4, 5, 6, ou 7 até 50 aminoácidos, incluindo 3, 4, 5, 6, ou 7 até 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 aminoácidos.

10 Em um primeiro aspecto da invenção o peptídeo compreende de 2 a 15 aminoácidos, por exemplo, de 3 a 15 aminoácidos. De preferência ainda, o peptídeo compreende de 5 a 13 aminoácidos. Prefere-se adicionalmente peptídeos compreendendo de 3 a 7 aminoácidos, por exemplo, 7 aminoácidos.

15 Como é de conhecimento da pessoa versada, aminoácidos podem ser colocados em diferentes classes, dependendo primariamente das propriedades químicas e físicas da cadeia lateral de aminoácidos. Por exemplo, alguns aminoácidos são considerados geralmente como sendo aminoácidos hidrofílicos ou polares, e outros são considerados como sendo aminoácidos hidrofóbicos ou não-polares. Aminoácidos hidrofóbicos podem ser selecionados do grupo de aminoácidos hidrofóbicos consistindo de glicina,
20 leucina, fenilalanina, prolina, alanina, triptofano, valina, isoleucina, metionina, tirosina e treonina; aminoácidos catiônicos podem ser selecionados do grupo que consiste de ornitina, histidina, arginina e lisina. Como usado aqui, os termos "hidrofóbico" e "catiônico" podem referir-se a aminoácidos apresentando uma hidrofobicidade que é maior que, ou igual a, -1,10 e/ou
25 uma carga pura que é maior ou igual a 0, como descrito por Fauchere e Pliska *Eur. J. Med Chem.* 10:39 (1983). Aminoácido hidrofóbico ou não polar também pode referir-se a um aminoácido apresentando uma cadeia lateral que é não-carregada a pH fisiológico, que não é polar, e que geralmente é repelido por solução aquosa. Os aminoácidos podem ser sintéticos ou naturalmente

ocorrentes.

Em um primeiro aspecto da invenção, X e/ou Y são aminoácidos catiônicos selecionados do grupo que consiste de histidina, ornitina arginina e lisina. Mais preferivelmente, X e/ou Y são arginina ou lisina.

X e/ou Y podem ser isômeros ópticos de um aminoácido hidrofóbico ou catiônico, como definido aqui, por exemplo, aminoácidos D ou L. De preferência, X e/ou Y são aminoácidos D.

Em um primeiro aspecto da invenção, o peptídeo de fórmula (I) consiste de pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95%, como de 97 a 99% ou ainda 100%, de aminoácidos D.

Em um primeiro aspecto da invenção, o peptídeo de fórmula (I) consiste de pelo menos 90%, por exemplo, pelo menos 95%, como de 97 a 99% ou ainda 100%, de aminoácidos L.

A invenção também inclui isômeros conhecidos (estruturais, estéreo-, conformacionais e configuracionais), peptidomiméticos, análogos estruturais dos aminoácidos acima, e aqueles modificados naturalmente (p. ex., modificação pós-tradução) ou quimicamente, incluindo, embora não exclusivamente, fosforilação, glicosilação, sulfonilação e/ou hidroxilação.

De uma forma geral, o peptídeo da invenção não inclui os aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina ou serina, porém determinados peptídeos da invenção podem apresentar atividade ainda que estes aminoácidos estejam presentes.

Em um aspecto preferido adicional, X e Y são iguais. Mais preferivelmente, X e Y são iguais e são lisina ou arginina.

No peptídeo de fórmula (I) l e m podem ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 e n podem ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

No peptídeo de fórmula (I) l pode ser 1, n pode ser 1 e m pode ser entre 4 e 9, por exemplo, m pode ser 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9.



No peptídeo de fórmula (I) l, n e/ou m pode ser entre 1 e 5, por exemplo, 1, 2, 3, 4 ou 5.

No peptídeo de fórmula (I) l e m podem ser um número inteiro entre 0 e 7 e n podem ser um número inteiro entre 1 e 10.

5 No peptídeo de fórmula (I) l e m podem ser 0, 1 ou 2 e n pode ser um número inteiro entre 1 e 10.

No peptídeo de fórmula (I) X e Y podem ser iguais, l pode ser 0, m pode ser 1 e n pode ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10.

10 No peptídeo de fórmula (I) X e Y podem ser iguais, l e m podem ser l e n pode ser 2, 3, 4 ou 5.

No peptídeo de fórmula (I) X e Y podem ser iguais, l pode ser 1, m pode ser 2 e n pode ser 1, 2, 3 ou 4.

No peptídeo de fórmula (I) X e Y podem ser iguais, l e m podem ser 2 e n pode ser 1, 2, 3 ou 4.

15 Em um aspecto adicional da invenção proporciona-se um peptídeo cíclico compreendendo aminoácidos de acordo com a fórmula II:



em que X e n são como descrito aqui. De preferência, X é lisina, arginina ou ornitina. De preferência, n é um número inteiro entre 3 e 15.

Em uma concretização da invenção X é arginina.

20 Em uma concretização alternativa da invenção X é lisina.

Em outra concretização alternativa da invenção X é ornitina.

Os peptídeos da invenção podem compreender um ou mais radicais cisteína, por exemplo, até 6 radicais cisteína, como 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 radicais cisteína.

25 Adicionalmente, a sequência de aminoácidos do peptídeo pode ser modificada de forma a resultar em uma variante de peptídeo que inclui a substituição de pelo menos um radical de aminoácido no peptídeo por outro radical de aminoácido, incluindo substituições que usam a forma D ao invés

da forma L.

Um ou mais dos radicais do peptídeo pode ser substituído por outro de forma a alterar, incrementar ou conservar a atividade biológica do peptídeo. Uma variante do tipo referido pode apresentar, por exemplo, pelo menos cerca de 10% da atividade biológica do correspondente peptídeo não-variante. Aminoácidos conservativos são freqüentemente usados, i.e. substituições de aminoácidos com propriedades químicas e físicas similares, como descrito acima. Conseqüentemente, por exemplo, substituições de aminoácidos conservativas podem envolver substituição de lisina por arginina, ornitina ou histidina; ou substituição de arginina por lisina ou isoleucina, ornitina por histidina; ou substituição de um aminoácido hidrofóbico por outro. Após a introdução das substituições as variantes são selecionadas quanto à atividade biológica.

O termo "peptídeo" como usado aqui significa, em termos gerais, uma pluralidade de radicais de aminoácidos conjugados entre si por ligações peptídicas. Ele é usado intercambiavelmente e significa o mesmo que polipeptídeo e proteína.

Em uma concretização da invenção, o peptídeo cíclico é selecionado do grupo que consiste de:

K-K-K-K-K-K-K

R-R-R-R-R-R-R

Os peptídeos da invenção são geralmente peptídeos sintéticos. Os peptídeos podem ser peptídeos isolados, purificados ou variantes dos mesmos, que podem ser sintetizados *in vitro*, por exemplo, por meio de um peptídeo de fase sólida, método sintético, por meio de síntese peptídica catalisada com enzima, ou com o auxílio de tecnologia de DNA recombinante.

Em um aspecto adicional da invenção proporciona-se um processo para a preparação de um peptídeo de acordo com a invenção, em que

o processo compreende ciclizar um peptídeo de fórmula (I) ou (II) por meio de reação do peptídeo com um agente de acoplamento.

O agente de acoplamento pode ser qualquer agente capaz de formar uma ligação peptídica entre os dois radicais de aminoácidos terminais (C e N terminais) do peptídeo quando em sua forma linear, por exemplo, entre 5 duas cadeias laterais ou espinhas dorsais de aminoácidos. A escolha do agente de acoplamento pode influenciar a eficiência do acoplamento e, portanto, o rendimento do peptídeo cíclico. Exemplos de agentes de acoplamento úteis no processo da invenção são mostrados na Tabela 1, embora a pessoa versada na 10 arte conheça outros agentes de acoplamento que também são úteis na invenção. De preferência, o agente de acoplamento é HATU - O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio-hexafluorofosfato.

De preferência, a reação entre o peptídeo e o agente de acoplamento ocorre na presença de uma base. A base pode incluir, embora 15 sem limitação, n-metilmorfolina (NMM) ou diisopropil-etilamina (DIEA). De preferência, a reação ocorre em pH alcalino, por exemplo, entre pH 8,5-9, o peptídeo pode ser modificado de forma a incluir um grupo protetor antes de sua reação com o agente de acoplamento. Grupos protetores podem incluir 20 Pbf (2,2,4,6,7-pentametil-diidrobenzofuran-5-sulfonila), tBu (t-butil-éter), Mtr (metoxitrimetilbenzeno sulfonila), Pmc (cloreto de 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonila), Mbh (hidreto de 4,4-dimetiloxibenzila), Tmob (2,4,6-trimetoxibenzila), Aloe (aliloxicarbonila), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonil) e Boc (t-butiloxicarbonila). Após reação com o agente de acoplamento, o grupo protetor pode ser removido por meio de clivagem do grupo protetor em 25 condições ácidas brandas, por exemplo, na presença de uma solução de ácido trifluoracético (TFA).

Durante a ciclização da espinha dorsal do peptídeo, o peptídeo na ponta C do peptídeo linear é exposto a um grupo ativador do agente de acoplamento e, à medida que a reação prossegue, produz-se um intermediário

de ceto-enol no carbono alfa deste aminoácido. O intermediário de enol (ou alquenol) pode levar, portanto, à produção de dois enantiômeros quando o grupo ativador é removido do carbono adjacente, e forma-se uma ligação peptídica. Esta racemização, i.e. a formação dos respectivos enantiômeros do aminoácido individual (por exemplo, forma dextrorrotatória e levorrotatória (i.e., isômeros d e l, respectivamente)) e produção de diaestereômeros do peptídeo como um todo, pode ocorrer no sítio de ciclização após ativação pelo agente de acoplamento usado. Como é desejável que os peptídeos da invenção sejam enantiomericamente puros, a produção de diaestereômeros indesejáveis deveria ser reduzida ou impedida. Para reduzir ou prevenir esta produção de diaestereômeros, e produzir um peptídeo diastereomericamente puro, o peptídeo da invenção pode ser modificado para incluir uma porção aquiral que impede a racemização do peptídeo durante a ciclização.

Assim, em um aspecto preferido adicional da invenção o peptídeo da invenção, ou o peptídeo definido no processo da invenção, é modificado de forma a incluir uma porção que previne a formação de diaestereômeros peptídicos durante a ciclização. Como usado aqui um "peptídeo racêmico" é um que contém quantidades (tipicamente quantidades iguais) dos respectivos isômeros ópticos, por exemplo, formas dextrorrotatória e levorrotatória (i.e. isômeros d e l respectivamente), do aminoácido na ponta C do peptídeo antes da ciclização do peptídeo. A porção introduzida no peptídeo é geralmente um aminoácido aquiral que pode ser um análogo de aminoácido ou aminoácido naturalmente ocorrente. O aminoácido aquiral pode ser selecionado do grupo que consiste de glicina, β -alanina, ácido 3-aminopropanóico, ácido 4-aminobutírico, ácido 5-aminopentanóico e ácido 6- aminoexanóico. Em uma concretização da invenção, o peptídeo é modificado na ponta C de forma a incluir um aminoácido aquiral, por exemplo, glicina.

E também a modificação do peptídeo da invenção de forma a

incluir uma porção, como definido aqui, na ponta C, a relação dos dois enantiômeros formados durante a ciclização do peptídeo é dependente de diversos fatores, como o solvente usado, tempo de incubação e temperatura durante a ciclização (i.e reação com o agente de acoplamento) e o grupo
5 ativador usado para facilitar a ciclização.

A presente invenção refere-se adicionalmente a peptídeos ciclizados obteníveis por meio do processo da invenção.

Em uma concretização da invenção, o peptídeo cíclico compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que
10 consiste de:

K-K-K-K-K-K-K

R-R-R-R-R-R-R

O-O-O-O-O-O-O

DR-DR-DR-DR-DR-DR-DR

15 DO-DO-DO-DO-DO-DO-DO

DK-DK-DK-DK-DK-DK-DK

Para identificar peptídeos ativos que apresentam pouca ou nenhuma toxicidade indesejada para células mamíferas, é possível preparar peptídeos individuais, ou bibliotecas de peptídeos, e os peptídeos individuais
20 ou peptídeos daquelas bibliotecas podem ser selecionados quanto à atividade antimicrobiana e toxicidade, incluindo, embora sem limitação, atividade antifúngica, antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, antiparasítica e toxicidade.

Os peptídeos da invenção podem existir em formas diferentes,
25 como ácidos livres, bases livres, ésteres e outras pró-drogas, sais e tautômeros, por exemplo, e a invenção inclui todas as formas variantes dos compostos.

Assim, a invenção compreende o sal ou pró-droga de um peptídeo ou variante de peptídeo da invenção.

O peptídeo da invenção pode ser administrado em forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Os sais farmaceuticamente aceitáveis da presente invenção podem ser sintetizados a partir do peptídeo parental que contém uma porção básica ou ácida por meio de métodos químicos convencionais. De uma maneira geral, referidos sais podem ser preparados reagindo-se as formas de ácido livre ou de base do peptídeo com uma quantidade estequiométrica da base ou ácido apropriado em água ou em um solvente orgânico, ou em uma mistura dos dois; prefere-se geralmente meios, como éter, acetato de etila, etanol, isopropanol, ou acetonitrila. Listas de sais vantajosos são encontradas em Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., E.U.A., 1985, p. 1418, cuja revelação é incorporada aqui por referência; ver também Stahl *et al*, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta e Wiley-VCH, 2002.

A invenção inclui, assim, sais farmaceuticamente aceitáveis do peptídeo da invenção, em que o composto parental é modificado preparando-se sais de base ou ácido dos mesmos, por exemplo, os sais não-tóxicos convencionais ou os sais de amônio quaternário que são formados, p. ex., de bases ou ácidos inorgânicos ou orgânicos. Exemplos de referidos sais de adição de ácido incluem acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanossulfonato, fumarato, glucoeptanoato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, cloridrato, bromidrato, iodidrato, 2-hidroxietanossulfonato, lactato, maleato, malonato, metanossulfonato, 2-naftalenossulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3- fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartarato, tiocianato, tosilato, e undecanoato. Sais de base incluem sais de amônio, sais de metal alcalino, como sais de sódio e potássio, sais de metal alcalino-terroso, como sais de

cálcio e magnésio, sais com bases orgânicas, como sais de diciclo-hexilamina, N-metil-D-glutamina, e sais com aminoácidos, como arginina, lisina, etc. Da mesma forma, os grupos contendo nitrogênio básico podem ser quaternizados com agentes, como halogenetos de alquila inferior, como cloreto de metila, etila, propila, e butila, brometos e iodetos; sulfatos e dialquila, como dimetila, dietila, dibutila; e sulfatos de diamila, halogenetos de cadeia longa, como cloretos, brometos e iodetos de decila, laurila, miristila, halogenetos de aralquila, como brometos de benzila e fenetila e outros.

Sais de grupos carboxila de um peptídeo ou variante de peptídeo da invenção podem ser preparados da maneira usual por meio de contato do peptídeo com um ou mais equivalentes de uma base desejada, como, por exemplo, uma base de hidróxido metálico, p. ex. hidróxido de sódio; um carbonato ou bicarbonato metálico, como, por exemplo, bicarbonato ou carbonato de sódio; ou uma base de amina, como, por exemplo, trietilamina, trietanolamina e análogos.

A invenção inclui pró-drogas para a espécie farmacêutica ativa do peptídeo descrito, por exemplo, em que um ou mais grupos funcionais são protegidos ou derivatizados, mas podem ser convertidos *in vivo* ao grupo funcional, como no caso de ésteres de ácidos carboxílicos que podem ser convertidos *in vivo* ao ácido livre, ou, no caso de aminas protegidas, ao grupo amino livre. O termo "pró-droga", como usado aqui, representa, em particular, estruturas que são facilmente transformadas *in vivo* à estrutura parental, por exemplo, é possível indicar, por exemplo, hidrólise no sangue.

Um aspecto adicional da invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade farmacêuticamente efetiva de um peptídeo da invenção, ou dois ou mais diferentes peptídeos da invenção.

A composição também inclui um diluente, excipiente ou veículo farmacêuticamente aceitável. A expressão "farmacêuticamente

aceitável" é empregada aqui para referir àqueles compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que, no escopo da avaliação clínica abalizada, são vantajosas para uso em contato com os tecidos de seres humanos ou, conforme o caso, de um animal, sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, proporcionalmente a uma razoável relação risco/benefício.

O peptídeo da invenção é útil, *inter alia*, como um peptídeo antimicrobiano, por exemplo, contra bactérias, fungos, levedura, parasitas, protozoários e vírus. O termo, "peptídeo antimicrobiano" pode ser usado para definir qualquer peptídeo que apresenta atividade microbiocida e/ou microbiostática e compreende, não-exclusivamente, qualquer peptídeo descrito como apresentando propriedades antibacterianas, antifúngicas, antimicóticas, anti-parasíticas, anti-protozoárias, antivirais, antiinfeciosas, antiinfectivas e/ou germicidas, algicidas, amebicidas, microbicidas, bacterici(o)das, fúngicidas, parasitcidas, protozoacidadas, protozoicidas.

Em um primeiro aspecto, a invenção proporciona o uso de um peptídeo de acordo com a invenção na fabricação de uma droga para tratar uma infecção microbiana.

Por "infecção microbiana" compreende-se uma infecção causada por uma bactéria, parasita, protozoário, vírus ou fungo, incluindo levedura. Um "patógeno" é definido geralmente como qualquer organismo causador de doença.

Um patógeno bacteriano pode ser derivado de uma espécie bacteriana selecionada do grupo, mas não exclusiva do grupo, que consiste de: *Staphylococcus* spp., p. ex. *Staphylococcus aureus* (p. ex. *Staphylococcus aureus* NCTC 10442), *Staphylococcus epidermidis*; *Chlamydia* spp., p. ex. *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Enterococcus* spp., p. ex., *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes*; *Listeria* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Mycobacterium* spp., p. ex. *Mycobacterium*

tuberculosis; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Streptococcus* spp., p. ex. *Streptococcus* de Grupo A ou B, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter* spp., p. ex., *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., p. ex. *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*;
 5 *Shigella* spp., p. ex., *Shigella flexneri*; *Escherichia coli* (*E.coli* O157:H7 NCTC 12900); *Haemophilus* spp, p. ex., *Haemophilus influenzae*; *Francisella tularensis*; *Bacillus* spp., p. ex., *Bacillus anthracis*; *Clostridia* spp., p. ex., *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp., p. ex., *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.;, p. ex., *Burkholderia cepacia*, *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

10 Em um uso preferido de acordo com a invenção o patógeno bacteriano é *Staphylococcus aureus* ou *E.coli*.

Um patógeno viral pode ser derivado de um vírus selecionado de, mas não limitado a, o grupo que consiste de: Vírus da Imunodeficiência Humana (HTL 1 & 2); Vírus da Leucemia de Células T Humanas (HTLV 1 &
 15 2); vírus Ebola; papiloma vírus humano (p. ex., HPV-2, HPY-5, HPV-8, HPV16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-52, HPV-54 e HPV-56); papovavírus; rinovírus; poliovírus; herpesvírus; adenovírus; vírus de Epstein Barr; influenza vírus, vírus da hepatite B e C, vírus da Varíola, rotavírus ou coronavírus da SARS.

20 Um patógeno parasítico pode ser derivado de um parasita selecionado do grupo, mas sem limitar-se ao mesmo, que consiste de *Trypanosoma* spp. (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*), *Leishmania* spp., *Giardia* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Schistosoma* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidium*
 25 spp., *Isospora* spp., *Balantidium* spp., *Loa Loa*, *Ascaris lumbricoides*, *Diroflaria immitis*, *Toxoplasma* ssp., p. ex., *Toxoplasma gondii*.

Em um uso preferido de acordo com a invenção a infecção microbiana é uma infecção fúngica.

Um patógeno fúngico derivado de um fungo (incluindo

- levedura) selecionado, mas sem limitação, dos gêneros *Candida* spp., (p. ex. *C.albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp., (p. ex., *T.rubrum* e *T.interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp.,
- 5 *Cryptococcus* spp. (p. ex., *Cryptococcus neoformans*), *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp.,
- 10 *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp. (p. ex. *Malassezia Furfur*), *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.,
- 15 *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

Em um uso preferido de acordo com a invenção o patógeno fúngico é dos gêneros *Trichophyton* spp. ou *Cryptococcus* spp. Por exemplo,

20 o patógeno fúngico pode ser *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* ou *Cryptococcus neoformans*.

A infecção fúngica pode ser uma infecção sistêmica, tópica, subcutânea, cutânea ou das mucosas.

Infecções fúngicas tópicas das unhas e pele são causadas

25 geralmente por dermatófitos, embora alguns não-dermatófitos, como levedura, também podem causar infecções da pele. A infecção por dermatófitos pode incluir uma infecção por *Tinea*, por exemplo, *Tinea barbae* (barba), *Tinea capitis* (cabeça), *Tinea corporis* (corpo), *Tinea cruris* (virilha), *Tinea faciei* (face), *Tinea manuum* (mão), *Tinea pedis* (pé), *Tinea unguium*

(unha), *Tinea* (pitíriase) *versicolor*, *Tinea incognito* ou *Tinea nigra*. A infecção pode ser derivada de fungos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* spp. (p. ex. *T. rubrum* e *T. interdigitale*).

A infecção por dermatófitos pode ser uma infecção da pele, lâmina, *stratum corneum*, unhas (unhas das mãos e unhas dos pés) ou cabelos. Menciona-se particularmente infecções dermatofíticas causadas por um dermatófito dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* ou *Microsporum*. Dermatófitos exemplares incluem *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum distortum*, *Microsporum fulvum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *nodulare*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton Soudanese*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton schoenlenii*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton kraidenii*, *Trichophyton yaoundei*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton erinacei* e *Trichophyton verrucosum*.

Em uma concretização particular da invenção, a infecção dermatofítica é onicomicose. O termo "onicomicose" inclui, embora sem limitação, tipos subungular, distal lateral, branca superficial, subungular branca proximal, distrófica secundária, distrófica primária, tipo endonix, por *Cândida* (p. ex. onicólise e doença mucocutânea crônica) de onicomicose e *Tinea unguium*.

Fungos não-dermatofíticos associados com onicomicose incluem *Aspergillus* spp. *Cephalosporum* spp. *Fusarium oxysporum*, *Scopularis brevicaulis*, *Scytalidium* spp.

Os peptídeos da invenção são peptídeos antimicrobianos potentes para uma ampla variedade de organismos patogênicos. No entanto, os peptídeos da invenção também podem ser úteis no tratamento de outras condições incluindo, embora sem limitação, condições associadas com

infecções das mucosas, por exemplo, fibrose cística, infecções gastrintestinais, urogenitais, urinárias (p. ex., infecção do rim ou cistite) ou respiratórias.

Os peptídeos da invenção também podem ser úteis no
5 tratamento ou na prevenção de infecções associadas tipicamente com a pele, incluindo *inter alia* feridas, úlceras e lesões, por exemplo, feridas cutâneas, como cortes ou queimaduras, e condições associadas com as mesmas.

Em um primeiro aspecto da invenção os peptídeos são úteis no tratamento de infecções bacterianas da pele ou "piodermias".

10 O termo "tratamento" refere-se aos efeitos dos peptídeos aqui descritos que proporcionam um benefício a pacientes acometidos de uma doença (infecciosa), incluindo uma melhora da condição do paciente ou o retardo da progressão da doença.

Como usado aqui "tratamento de uma ferida" pode incluir
15 regeneração de feridas e condições associadas e terapia que promover, aumenta, ou acelera a regeneração de tecidos e inclui formação de escaras pós operativas, queimaduras, úlceras, psoríase, aceleração da remodelação de tecidos, por exemplo, cirurgia pós-cosmética e transplante de órgãos.

Assim, em um aspecto adicional da invenção proporciona-se
20 um substrato em que um peptídeo da invenção é aplicado ou ligado. De preferência, o substrato é vantajoso para aplicação em feridas ou fornecimento em sítios de feridas. De preferência, o substrato permite a transferência dos peptídeos da invenção do substrato para um leito de ferida para se obter seu efeito antibiótico. O substrato pode ser um curativo, por
25 exemplo, curativo de ferida. O curativo pode compreender um material de tecido ou pode ser um material de tipo colágeno.

Os peptídeos da invenção também podem ser usados como/em um desinfetante. Neste contexto, o peptídeo ou composições farmacêuticas da invenção podem ser aplicadas, quer sozinhos ou em combinação com outros

agentes desinfetantes, na superfície a ser tratada. Como usado aqui uma "superfície a ser tratada" pode ser um substrato como definido aqui ou um dispositivo médico.

5 Em um aspecto adicional, a invenção proporciona um método de tratar ou prevenir uma infecção microbiana em um sujeito compreendendo administrar a referido sujeito uma quantidade terapeuticamente efetiva de um peptídeo de acordo com a invenção.

10 Em um método preferido da invenção, a infecção microbiana é uma infecção fúngica. No método da invenção o peptídeo é aplicado topicamente na pele ou nas unhas de referido sujeito.

Mamíferos, aves e outros animais podem ser tratados com os peptídeos, composições ou métodos aqui descritos. Referidos mamíferos e aves incluem humanos, cães, gatos e rebanhos, como cavalos, gado, ovelhas, cabras, frangos e perus e análogos. Além disso, plantas também podem ser
15 tratadas com os peptídeos, composições ou métodos-Da invenção.

Quando o sujeito é um animal, o método da invenção pode ser aplicado como sobre unhas, incluindo, mas não exclusive, cascos, garras e pés de animais.

20 O método da invenção pode incluir, adicionalmente ao tratamento com peptídeo, tratamentos que podem acentuar a permeação do peptídeo na unha. Isto poderia ser facilitado por meios químicos ou físicos. Tratamentos físicos, como desgaste da unha ou limadura da camada dorsal da unha, podem incrementar a permeabilidade dos peptídeos da invenção. Tratamento químico da permeabilidade das unhas relativamente aos peptídeos
25 da invenção pode ser realizado mediante quebra de ligações físicas ou químicas na queratina da placa da unha. Agentes amolecedores de unhas, incluindo, embora não exclusivamente, uréia e ácido salicílico, aumentam a hidratação da unha para incrementar a permeabilidade aos peptídeos da invenção. Compostos contendo grupos sulfidril clivarão as ligações



dissulfeto na queratina da unha, e podem levar à desestabilização e maior permeabilidade de drogas.

Em um aspecto adicional, a invenção proporciona um método de tratar uma ferida em um sujeito compreendendo aplicar na ferida uma
5 quantidade terapeuticamente efetiva de um peptídeo, ou um substrato, de acordo com a invenção.

Para se obter o(s) efeito(s) desejado(s), o peptídeo, uma variante do mesmo ou uma combinação dos mesmos, pode ser administrada como dosagens simples ou divididas, por exemplo, de pelo menos cerca de
10 0,01 mg/kg a cerca de 500 a 750 mg/kg, de pelo menos cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 300 a 500 mg/kg, de pelo menos cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 100 a 300 mg/kg ou de pelo menos cerca de 1 mg/kg a cerca de 50 a 100 mg/kg de peso corporal ou de pelo menos cerca de 1 mg/kg a cerca de 20 mg/kg de peso corporal, embora outras dosagens possam proporcionar resultados benéficos.
15 A quantidade administrada variará dependendo de vários fatores, incluindo, embora sem limitação, o peptídeo selecionado e seus efeitos clínicos, a doença, o peso, a condição física, a saúde, a idade do mamífero, se é prevenção ou tratamento o que se deseja, e se o peptídeo é modificado quimicamente.

20 A administração dos agentes terapêuticos de acordo com a presente invenção pode ser em uma dose simples, em doses múltiplas, de uma maneira contínua ou intermitente, dependendo, por exemplo, da condição fisiológica do recipiente, se o objetivo da administração é terapêutico ou profilático, e de outros fatores conhecidos por praticantes habilitados. A
25 administração dos peptídeos da invenção pode ser substancialmente contínua ao longo de um período previamente selecionado ou pode ser numa série de doses espaçadas. Considera-se tanto a administração local como também a administração sistêmica.

Para preparar a composição, peptídeos são sintetizados ou

obtidos de outra forma, purificados se necessário ou desejado, e, depois, liofilizados e estabilizados. O peptídeo pode então ser ajustado à concentração apropriada e combinado opcionalmente com outros agentes. O peso absoluto de um dado peptídeo incluído em uma dose unitária pode variar em amplas margens. Por exemplo, é possível administrar de cerca de 0,01 a cerca de 2 g ou de cerca de 0,01 a cerca de 500 mg, de pelo menos um peptídeo da invenção, ou uma pluralidade de peptídeos específicos para um tipo particular de célula. Alternativamente, a dosagem unitária pode variar de cerca de 0,01 g a cerca de 50 g, de cerca de 0,01 g a cerca de 35 g, de cerca de 0,1 g a cerca de 25 g, de cerca de 0,5 g a cerca de 12 g, de cerca de 0,5 g a cerca de 8 g, de cerca de 0,5 g a cerca de 4 g, ou de cerca de 0,5 g a cerca de 2 g.

Assim, uma ou mais formas de dosagem unitária vantajosas compreendendo os peptídeos terapêuticos da invenção podem ser administrados por meio de uma variedade de vias, incluindo a via oral, parenteral (incluindo subcutânea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), retal, dérmica, transdérmica, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratória). Os peptídeos terapêuticos também podem ser formulados em uma formulação lipídica ou para liberação sustentada (por exemplo, usando-se microencapsulação, ver WO 94/07529, e Patente dos Estados Unidos nº 4.962.091). Onde apropriado, as formulações podem ser apresentadas vantajosamente em formas de dosagem unitária distintas e podem ser preparadas por meio de qualquer um dos métodos bem conhecidos nas artes farmacêuticas. Referidos métodos podem incluir a etapa de misturar o agente terapêutico com veículos líquidos, matrizes sólidas, veículos semi-sólidos, veículos sólidos finamente divididos ou combinações dos mesmos, e, então, se necessário, introduzir ou modelar o produto no sistema de fornecimento desejado.

Quando os peptídeos terapêuticos da invenção são preparados para administração oral, eles são combinados geralmente com um veículo,



diluyente ou excipiente farmacêuticamente aceitável para formar uma
formulação farmacêutica, ou forma de dosagem unitária. Para administração
oral, os peptídeos podem estar presentes como um pó, uma formação
granular, uma solução, uma suspensão, uma emulsão ou em um polímeros
5 natural ou sintético ou resina para ingestão dos ingredientes ativos a partir de
uma goma de mascar. Os peptídeos ativos também podem ser apresentados
como um bolo, electuário ou pasta. Peptídeos terapêuticos administrados
oralmente da invenção também podem ser formulados para liberação
sustentada, p. ex., os peptídeos podem ser revestidos, micro-encapsulados, ou,
10 de outra forma, colocados em um dispositivo de fornecimento sustentado. Os
ingredientes ativos totais nessas formulações compreendem de 0,1 a 99,9%
em peso da formulação.

Formulações farmacêuticas contendo os peptídeos terapêuticos
da invenção podem ser preparadas por meio de procedimentos conhecidos na
15 arte empregando-se ingredientes bem conhecidos e facilmente obteníveis. Por
exemplo, o peptídeo pode ser formulado com excipientes, diluentes, ou
veículos comuns, e formados em tabletes, cápsulas, soluções, suspensões, pós,
aerossóis e análogos. Exemplos de excipientes, diluentes, e veículos que são
vantajosos para formulações do tipo referido incluem tamponantes, e também
20 cargas e extensores, como amido, celulose, açúcares, manitol, e derivados
silícicos. Também é possível incluir agentes de ligação, como carboximetil
celulose, hidroximetilcelulose, hidroxipropil metilcelulose e outros derivados
de celulose, alginatos, gelatina, e polivinilpirrolidona. É possível incluir
agentes umectantes, como glicerol, agentes desintegrantes, como carbonato de
25 cálcio e bicarbonato de sódio. Agentes para retardar a dissolução também
podem ser incluídos, como parafina. Aceleradores de ressorção, como
compostos de amônio quaternários, também podem ser incluídos. Agentes
tensoativos, como álcool de cetila e monoestearato de glicerol também podem
ser incluídos. Também é possível adicionar veículos adsorvivos, como caulim,

e bentonita. Também é possível incluir lubrificantes, como talco, cálcio e estearato de magnésio, e polietil glicóis sólidos. Também é possível adicionar conservantes. As composições da invenção também podem conter agentes espessantes, como celulose e/ou derivados de celulose. Elas também podem

5 conter gomas, como xantano, guar ou goma carbo ou goma arábica, ou, alternativamente, polietileno glicóis, bentonas e montmorillonitas, e análogos.

Por exemplo, tabletes ou cápsulas pequenas contendo os peptídeos da invenção podem incluir agentes tamponadores, como carbonato de cálcio, óxido de magnésio e carbonato de magnésio. Agentes

10 tamponadores vantajosos também podem incluir ácido acético em um sal, ácido cítrico em um sal, ácido bórico em um sal e ácido fosfórico em um sal. Drágeas e tabletes podem incluir ingredientes inativos, como celulose, amido pré-gelatinizado, dióxido de silício, hidroxipropil metil celulose, estearato de magnésio, celulose microcristalina, amido, talco, dióxido de titânio, ácido

15 benzóico, ácido cítrico, amido de milho, óleo mineral, polipropileno glicol, fosfato de sódio, estearato de zinco, e análogos. Cápsulas de gelatina duras ou moles contendo pelo menos um peptídeo da invenção podem conter ingredientes inativos, como gelatina, celulose microcristalina, lauril sulfato de sódio, amido, talco, e dióxido de titânio, e análogos, e também veículos

20 líquidos, como polietileno glicóis (PEGs) e óleo vegetal. Além disso, tabletes ou drágeas revestidas entericamente contendo um ou mais peptídeos da invenção são projetados para resistir à desintegração no estômago e dissolvem-se no ambiente mais neutro até alcalino do duodeno.

Os peptídeos terapêuticos da invenção também podem ser

25 formulados como elixires ou soluções para administração oral vantajosa ou como soluções apropriadas para administração parenteral, por exemplo, pela via intramuscular, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa. As formulações farmacêuticas dos peptídeos terapêuticos da invenção também podem ter a forma de uma dispersão ou solução aquosa ou anidra, ou, alternativamente, a

forma de uma emulsão ou suspensão ou pomada.

Assim, os peptídeos terapêuticos podem ser formulados para administração parenteral (p. ex., por meio de injeção, por exemplo, injeção de bolo ou infusão contínua) e podem ser apresentados em forma de dose unitária em ampolas, seringas pré-enchidas, recipientes de infusão de pequeno volume ou em recipientes de doses múltiplas. Os peptídeos ativos e outros ingredientes podem formar suspensões, soluções, ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação, como agentes de suspensão, estabiliza; grupos e/ou dispersão. Alternativamente, os peptídeos ativos e outros ingredientes podem encontrar-se em forma de pó, obtidos por meio de isolamento asséptico de sólido estéril ou por meio de liofilização de solução para constituição com um veículo vantajoso, p. ex., água estéril, isenta de pirógenos, antes do uso.

Estas formulações podem conter veículos, adjuvantes e suportes farmacologicamente aceitáveis que são bem conhecidos na arte. É possível, por exemplo, preparar soluções usando um ou mais solvente(s) orgânico(s) que é/são aceitáveis do ponto de vista fisiológico, selecionados dentre, além da água: acetona, ácido acético, etanol, álcool de isopropila, sulfóxido de dimetila, éteres de glicol, como os produtos comercializados sob o nome "Dowanol", poliglicóis e polietileno glicóis, ésteres de alquila com C₁-C₄ de ácidos de cadeia curta, lactato de etila ou isopropila, triglicerídeos de ácido graxo, como os produtos comercializados sob o nome "Miglyol", miristato de isopropila, óleos animais, minerais e vegetais e polissiloxanos.

Solventes ou diluentes compreendendo os peptídeos da invenção podem incluir soluções ácidas, dimetilsulfona, N-(2-mercaptopropionil) glicina, 2-n-nonil-1,3-dioxolano e álcool de etila. De preferência, o solvente/diluente é um solvente ácido, por exemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido láctico, ácido propiônico, ácido fosfórico, ácido benzóico, ácido butírico, ácido málico, ácido malônico, ácido

oxálico, ácido succínico ou ácido tartárico.

Considera-se também produtos de combinação que incluem um ou mais peptídeos da presente invenção e um ou mais outros agentes antimicrobianos ou antifúngicos, por exemplo, polienos, como anfotericina B, complexo anfotericina B lipídeo (ABCD), anfotericina B lipossômica (L-AMB), e nistatina lipossômica, azóis e triazóis, como voriconazol, fluconazol, cetoconazol, itraconazol, pozaconazol e análogos; inibidores de sintase de glucano, como caspofungina, micafungina (FK463), e V- eqüinocandina (LY303366); griseofulvina; alilaminas, como terbinafina; flucitosina ou outros agentes antifúngicos, incluindo aqueles aqui descritos. Adicionalmente, considera-se que os peptídeos poderiam ser combinados com agentes antifúngicos tópicos, como ciclopirox olamina, haloproquina, tolnaftato, undecilenato, nistatina tópica, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, e outros agentes tópicos.

Adicionalmente, os peptídeos podem ser formulados como formas de dosagem de liberação sustentada e análogos. As formulações podem ser constituídas de tal forma que venham a liberar o peptídeo ativo, por exemplo, em uma parte particular do trato intestinal ou respiratório, possivelmente ao longo de um determinado período. Revestimentos, envelopes, e matrizes protetoras podem ser preparados, por exemplo, a partir de substâncias poliméricas, como polilactídeo-glicolatos, lipossomas, microemulsões, micropartículas, nanopartículas, ou ceras. Estes revestimentos, envelopes, e matrizes protetoras são úteis para revestir dispositivos residentes, p. ex., stents, cateteres, tubos de diálise peritoneal, dispositivos de drenagem e análogos.

Para administração tópica, os agentes ativos podem ser formulados como é de conhecimento na arte para aplicação direta numa área-alvo. Formas condicionadas predominantemente para aplicação tópica apresentam a forma, por exemplo, de cremes, leites, géis, pós, dispersão ou

microemulsões, loções espessadas em maior ou menor grau, chumaços impregnados, ungüentos ou varetas, formulações em aerossol (p. ex. pulverizações ou espumas), sabões, detergentes, loções ou tortas de sabão. Outras formas convencionais para este fim incluem curativos de feridas, 5 bandagens revestidas ou outros recobrimentos poliméricos, ungüentos, cremes, loções, pastas, geléias, pulverizações, e aerossóis. Assim, os peptídeos terapêuticos da invenção podem ser fornecidos via adesivos ou bandagens para administração dérmica. Alternativamente, o peptídeo pode ser formulado para ser parte de um polímero adesivo, como poliacrilato ou 10 copolímero de acrilato/acetato de vinila. Para aplicações de longo prazo poderia ser desejável usar laminados de forro microporosos e/ou que permitem respirar, de modo que é possível minimizar a hidratação ou maceração da pele. A camada de forro pode ter qualquer espessura apropriada que possa proporcionar as funções protetoras e de suporte desejadas. Uma 15 espessura vantajosa será geralmente de cerca de 10 a cerca de 200 microns.

A administração tópica pode ser em forma de um esmalte ou revestimento para unhas. Por exemplo, os peptídeos antifúngicos podem ser formulados em uma solução para administração tópica que contém acetato de etila (NF), álcool de isopropila (USP), e monoéster de butila de poli[éter de 20 metilvinila/ácido maleico] em álcool de isopropila.

Formulações farmacêuticas para administração tópica podem compreender, por exemplo, uma solução salina tamponada fisiologicamente aceitável contendo entre cerca de 0,001 mg/ml e cerca de 100 mg/ml, por exemplo, entre 0,1 mg/ml e 10 mg/ml, de um ou mais dos peptídeos da 25 presente invenção específicos para a indicação ou doença a ser tratada. Ungüentos e cremes podem ser formulados, por exemplo, com uma base aquosa ou oleosa com a adição de agentes espessantes e/ou geleificantes vantajosos. Loções podem ser formuladas com uma base aquosa ou oleosa e, em geral, conterão um ou mais agentes emulsificantes, agentes

estabilizadores, agentes dispersantes, agentes de suspensão, agentes espessantes, ou agentes colorantes. Os peptídeos ativos também podem ser fornecidos via iontoforese, p. ex., como divulgado nas Patentes dos Estados Unidos num. 4.140.122; 4.383.529; ou 4.051.842. O percentual em peso de um agente terapêutico da invenção presente em uma formulação tópica dependerá de vários fatores, mas será geralmente de 0,01% a 95% do peso total da formulação, e, tipicamente, de 0,1 a 85% em peso.

Gotas, como gotas oftálmicas ou gotas nasais, podem ser formuladas com um ou mais dos peptídeos terapêuticos em uma base aquosa ou não aquosa também compreendendo um ou mais agentes dispersantes, agentes solubilizadores ou agentes de suspensão. Pulverizações líquidos podem ser bombeados, ou são fornecidos vantajosamente a partir de recipientes pressurizados. Gotas podem ser fornecidas através de um frasco simples com tampa conta-gotas, via um frasco plástico adaptado para fornecer conteúdos líquidos por gotejamento, ou via um fecho com forma especial.

O peptídeo terapêutico pode ser formulados adicionalmente para administração tópica na boca ou na garganta. Por exemplo, os ingredientes ativos podem ser formulados como um losango compreendendo adicionalmente uma base aromatizada, usualmente sacarose e acácia ou tragacanto; pastilhas compreendendo a composição em uma base inerte, como gelatina e glicerina ou sacarose e acácia; e líquidos para limpeza bucal compreendendo a composição da presente invenção em um veículo líquido vantajoso.

Exemplos não-limitantes específicos dos veículos e/ou diluentes que são úteis nas formulações farmacêuticas da presente invenção incluem água e soluções salinas tamponadas fisiologicamente, como soluções salinas tamponadas com fosfato pH 7,0-8,0.

Os peptídeos da invenção também podem ser administrados no trato respiratório. Para administração por inalação ou insuflação, a

composição pode apresentar a forma de um pó seco, por exemplo, uma mistura de pó do agente terapêutico e uma base de pó vantajosa, como lactose ou amido. Peptídeos terapêuticos da presente invenção também podem ser administrados em uma solução aquosa quando administrados em uma forma de aerossol ou inalada. Assim, outras formulações farmacêuticas de aerossol podem compreender, por exemplo, uma solução salina tamponada fisiologicamente aceitável contendo entre cerca de 0,001 mg/ml e cerca de 100 mg/ml, por exemplo, entre 0,1 e 100 mg/ml, como 0,5-50 mg/ml, 0,5-20 mg/ml, 0,5-10 mg/ml, 0,5-5 mg/ml ou 1-5 mg/ml de um ou mais dos peptídeos da presente invenção específicos para a indicação ou doença a ser tratada.

Nesta descrição e nas reivindicações desta descrição, as palavras "compreendem" e "contêm", e variações destas expressões, por exemplo, "compreendendo" e "compreende", significam "incluindo, mas sem limitação" e não se destinam a excluir (e efetivamente não excluem) outras porções, aditivos, componentes, unidades inteiras ou etapas.

Nesta descrição e nas reivindicações desta descrição, o singular compreende o plural, exceto se o contexto o exigir de outra forma. Em particular, onde se usa o artigo indefinido, a especificação deve ser compreendida como contemplando pluralidade e também singularidade, exceto se o contexto o exigir de outra forma.

Particularidades, unidades inteiras, características, compostos, porções químicas ou grupos descritos em conjunto com um aspecto, concretização ou exemplo particular da invenção devem ser compreendidos como sendo aplicáveis a qualquer outro aspecto, concretização ou exemplo aqui descrito, exceto se incompatível com isto.

Exemplos

Materiais e métodos

Exemplo 1

A ciclização de um peptídeo de 7 aminoácidos polilisina foi realizada por meio de dissolução de 1 eq. de peptídeo protegido com 1 eq (eq. = volume equivalente) de HATU em DMF (dimetilformamida) a 100 mg/ml. Para incrementar o pH adiciona-se 2,5 eq. de DIEA (diisopropiletilamina) e o
5 progresso da reação foi seguido por meio de HPLC. Quando completa, o peptídeo foi precipitado em água e lavado em mais água. O peptídeo foi então secado e desprotegido com ácido fluorídrico para reduzir o peptídeo cíclico final. Usa-se então cromatografia de troca de íon para substituir o solvente de ácido fluorídrico com ácido acético antes da liofilização.

10 Exemplo 2

A ciclização de um peptídeo de 7 aminoácidos poliarginina foi realizada combinando-se 1 eq. de peptídeo protegido com 5 eq. de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) e 2 eq. de PyBOP dissolvidos em DMF a 28,5 mg/ml. A reação foi acompanhada por meio de TLC e, quando completa, o peptídeo
15 foi precipitado em água e lavado em mais água. O peptídeo foi então secado e desprotegido com ácido fluorídrico para produzir o peptídeo cíclico final. Usa-se então cromatografia de troca de íon para substituir o solvente de ácido fluorídrico com ácido acético antes da liofilização.

20 Exemplo 3

A ciclização de um peptídeo de 7 aminoácidos poliarginina:

Solução 1: 57 mg de HBTU (Peso molecular = 379,3, 0,15 mmol) ou 57 mg de HATU (M = 380,3, 0,15 mmol) e 60 μl de 0,92 mg/ml de NMM (n-metilmorfolina, peso molecular = 101,2, 0,55 mmol) foram dissolvidos em 2,86 ml de DMF.

25 Solução 2: 288 mg de $\text{H-[Arg(Pbf)]}_7\text{-OH}$ (peso molecular = 2877,6, 0,1 mmol) (peptídeo de aminoácido poliarginina 7) foram dissolvidos em 0,71 ml de DMF.

Solução 2 foi adicionada por gotejamento à solução 1 ao longo de 30 min. O pH foi verificado com papel de pH molhado e precisa ser de 8,5-

9. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro. A mistura foi concentrada sob vácuo. Adicionou-se uma solução de NaHCO_3 (5%). O precipitado de ciclopeptídeo protegido foi filtrado e lavado com água. Obteve-se 150-200 mg. A clivagem de grupos Pbf foi realizada em
5 TFA/água (95/5, vol/vol) (10 ml para 1 g de ciclopeptídeo protegido). A mistura foi concentrada e adicionou-se IPE para precipitar o produto bruto. Obteve-se 100-110 mg de cicloArg bruto.

(* O acoplamento usando HATU foi completo após 5 horas. A quantidade de NMM depende do excesso de TFA em $\text{H}-[\text{Arg}(\text{Pbf})]_7\text{-OH}$.)

10 Os peptídeos cíclicos são sintetizados para serem pelo menos 95% enantiomericamente puros, e tendem a variar entre 97 e 99%. Eles são pelo menos 95% enantiomericamente puros, como sintetizados por meio deste método.

Teste de suscetibilidade antifúngica da diluição de caldo

15 A sensibilidade de cepas fúngicas relevantes aos peptídeos ciclizados foi determinada empregando-se padrões aprovados pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; anteriormente NCCLS). A suscetibilidade fúngica foi testada usando-se o "Reference Method for Broth
20 Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard M38-F", e testou-se a suscetibilidade de levedura usando o "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - segunda edição M27-A".

Teste de suscetibilidade antibacteriana de diluição de caldo

25 A sensibilidade de cepas bacterianas relevantes aos peptídeos ciclizados foi determinada usando-se padrões aprovados pelo Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI; anteriormente NCCLS). A suscetibilidade bacteriana foi testada usando "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Anaerobically; Approved Standard - sétima edição M7-A7"



Ensaio de hemólise

O peptídeo em estudo foi repartido na concentração desejada em triplicata em placas de 96 poços Nunc, e preparou-se diluições seriais a 1:1 (100 µl). 100 µl de células sanguíneas vermelhas (RBC) humanas combinadas e lavadas (3 lavagens de 50 ml de HBSS) (1×10^8 RBC/ml) foram adicionados nos poços de teste e incubados a 37°C durante 3 horas. Após a incubação adicionou-se mais 100 µl de HBSS em todos os poços e a placa foi incubada a 4°C de um dia para o outro. 100 µl do sobrenadante foram removidos e colocados em uma placa de microtitulação fresca que foi lida em uma leitora de placas Sunrise (Tascam) a 450/620 nm. Inclui-se também poços de controle (quadruplicata) de tamponador sozinho, tamponador e RBCs, e H₂O e RBC. Os dados foram plotados e analisados estatisticamente usando o Graph Pad (programa Prism).

Resultados

15 Seqüência de peptídeos ciclizados

A seqüência dos peptídeos analisados é como a seguir:

Peptídeo 1: Cíclico-K-K-K-K-K-K-K

Peptídeo 2: Cíclico-R-R-R-R-R-R-R

Peptídeo 3: Cíclico-K-K-K-K-K-K-K-G

Peptídeo 4: Cíclico-R-R-R-R-R-R-R-G

Peptídeo 5: Cíclico-O-O-O-O-O-O-O-G

Peptídeo 6: Cíclico:DR-DR-DR-Dr-Dr-Dr-Dr-G

Peptídeo 7: Cíclico-DO-DO-DO-DO-DO-DO-DO-G

Peptídeo 8: Cíclico-DK-DK-DK-DK-DK-DK-DK-G

25 O prefixo 'D-' indica um isômero D do aminoácido usado na síntese do peptídeo. 'O' representa o aminoácido não-natural ornitina.

Sintetizou-se peptídeos cíclicos que consistem de 3, 5, 9, 11, 13 ou 15 aminoácidos arginina ou lisina, e determinou-se a atividade (dados não mostrados).

Atividade antibacteriana de peptídeos ciclizados

Culturas de *E. coli* e *Staphylococcus aureus* foram expostas a Peptídeo 1, e a concentração inibidora mínima (MIC, *minimum inhibitory concentration*) após o crescimento ao longo das 16 horas seguintes a 37°C foi de 1 nM para ambos os organismos (Tabela 2). Peptídeo 1 inibe totalmente o crescimento, tanto de *E. coli* e *Staphylococcus aureus* a esta concentração.

Este experimento foi repetido com Peptídeo 2. A MIC para Peptídeo 2 versus *E. coli* foi de 0,1 mM; A MIC para Peptídeo 2 versus *S. aureus* foi de 1,0 mM. Isto indica um impacto significativo dos peptídeos ciclizados sobre a atividade bacteriana.

Peptídeos lineares correspondentes, em tamanho, aos peptídeos 1 e 2 demonstraram atividade significativamente menor do que peptídeos 1 e 2 respectivamente.

Atividade antifúngica de peptídeos ciclizados versus *Trichophyton rubrum*

Testou-se a suscetibilidade de *T. rubrum* aos peptídeos 1-8. Peptídeo 1 demonstrou uma MIC de 0,1 mM versus culturas de *T. rubrum* (Tabela 2). Peptídeo 2 demonstrou uma MIC de 0,25 mM versus culturas de *T. rubrum*.

Peptídeos lineares correspondentes, em tamanho, aos peptídeos 1 e 2 demonstraram atividade significativamente menor do que peptídeos 1 e 2 respectivamente.

Peptídeos 3 - 8 apresentaram uma radical glicina único introduzido no anel peptídico cíclico. Assim, Peptídeos 3 — 8 têm comprimento de 8 aminoácidos, em comparação com 7 aminoácidos para Peptídeos 1 e 2. Peptídeos 3 - 6 demonstraram, todos, atividade antifúngica contra *T. rubrum* (MIC (mM) 4,0, 2,0, 4,0, 1,0, respectivamente). Peptídeos 7 - 8 não demonstram atividade antifúngica contra *T. rubrum* na máxima concentração testada (4 mM).

Peptídeos 3 - 6 demonstram atividade antifúngica, porém a

introdução do aminoácido não-catiônico glicina reduz significativamente a atividade antifúngica. Por exemplo, isto pode ser observado na atividade do Peptídeo 2 (nenhuma glicina; MIC = 0,2 mM) em comparação com o Peptídeo 4 (adição de glicina; MIC = 2,0 mM) (Tabela 2). Estes dados mostram que a atividade antifúngica está presente em peptídeos cíclicos de ambos com comprimentos de 7 e 8 aminoácidos, mas que peptídeos com cationicidade reduzida são menos antifúngicos contra *T. rubrum*.

Inibição de *Trichophyton interdigitale* por peptídeos ciclizados

Testou-se a suscetibilidade a *T. interdigitale* a peptídeos 2 - 8. A atividade antifúngica de Peptídeos 2 - 8 contra *T. interdigitale* é mostrada na tabela 2. Peptídeos 2, 4 e 6 ativos contra *T. interdigitale*.

Inibição de *Cryptococcus neoformans* por peptídeos ciclizados

A suscetibilidade de *C. neoformans* aos peptídeos 4 e 6 - 8 foi testada usando o "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - segunda edição M27-A".

Tabela 2 demonstra que peptídeos cíclicos catiônicos 4 e 6 - 8 são antifúngicos versus a levedura patogênica *C. neoformans* (MICs = 1,0 mM, 0,5 mM, 2,0 mM e 0,5 mM, respectivamente).

Atividade antimicrobiana do Peptídeo 2 versus Patógenos Microbianos Seleccionados

A atividade antimicrobiana do Peptídeo 2 contra 60 patógenos microbianos seleccionados é demonstrada na Tabela 3. Como se pode observar, a maior atividade antimicrobiana (i.e. menores MICs) é observada consistentemente contra fungos, particularmente dermatófitos, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Malassezia furfur*, *Candida* spp não-albicans e a bactéria *E. coli*.

Efeito do uso de aminoácidos enantioméricos nos peptídeos ciclizados

Comparação do efeito inibidor de peptídeos catiônicos cíclicos todos-L e todos-D é demonstrada na Tabela 2. Peptídeos 4 e 6 são peptídeos

catiônicos cíclicos equivalentes todos-L e todos-D contendo os aminoácidos arginina (7 aa) e glicina (1 aa). Atividade antifúngica contra *T. rubrum* é maior para a versão todos-D do que a versão todos-L (MIC = 1,0 e 2,0 mM, respectivamente). A atividade antifúngica contra *T. interdigitale* é maior para a versão todos-D do que para versão todos-L (MIC = 0,25 e 0,5 mM, respectivamente). A atividade antifúngica contra a levedura *C. neoformans* é maior para a versão todos-D do que a versão todos-L (MIC = 0,5 e 1,0 mM, respectivamente). Isto indica que a versão todos-D deste peptídeo é mais ativa do que a versão todos-L.

Peptídeos 3 e 8 são peptídeos catiônicos cíclicos equivalentes todos-L e todos-D contendo os aminoácidos lisina (7 aa) e glicina (1 aa). A atividade antifúngica contra *T. rubrum* é maior para a versão todos-L do que a versão todos-D (MIC = 4,0 e >4,0 mM, respectivamente). Nenhum destes peptídeos demonstra atividade antifúngica contra *T. interdigitale* (MIC >4,0 mM para ambos os peptídeos).

Atividade hemolítica de peptídeos ciclizados

As atividades hemolíticas de peptídeos catiônicos cíclicos (Tabela 4) são desprezíveis a concentrações acima daquelas que demonstram atividade antifúngica.

Hepatotoxicidade de peptídeos ciclizados

Peptídeos 2, 9 e 10 não apresentam hepatotoxicidade a concentrações similares àquelas que demonstram atividade antifúngica.

DCC **DIPECI** **EDC**

BOP-Cl **DPEA** **TFEH** **OP** **FOF** **PyBrP**

(Forma O) **Forma (N)** **(Forma O)** **Forma (N)**

Sais de urânio amírio **Sais de manganês** **Sais de níquel** **Sais de cobalto**

HBTU: $R^1 = R^2 = CH_3$; $X = CH$ (estrutura de forma N)
HBTU: $R^1, R^2 = (CH_2)_3$; $X = CH$ (desconhecido)
HATU: $R^1 = R^2 = CH_3$; $X = N$ (estrutura de forma N)
HATU: $R^1, R^2 = (CH_2)_3$; $X = N$ (estrutura de forma N)

BODP: $R^1 = R^2 = CH_3$; $R_3 = R_4$; $X = CH$ (estrutura de forma N)
BODP: $R^1, R^2 = (CH_2)_3$; $R^3 = CH_3$; $X = CH$ (estrutura de forma N)
DPEP: $R^1 = R^2 = (CH_2)_3$; $R^3 = H$; $X = CH$ (desconhecido)
AQMP: $R^1, R^2 = (CH_3)_3$; $R^3 = CH_3$; $X = N$ (desconhecido)

SOE: $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = R^6 = R^7 = R^8 = R^9 = R^{10} = R^{11} = R^{12} = R^{13} = R^{14} = R^{15} = R^{16} = R^{17} = R^{18} = R^{19} = R^{20} = R^{21} = R^{22} = R^{23} = R^{24} = R^{25} = R^{26} = R^{27} = R^{28} = R^{29} = R^{30} = R^{31} = R^{32} = R^{33} = R^{34} = R^{35} = R^{36} = R^{37} = R^{38} = R^{39} = R^{40} = R^{41} = R^{42} = R^{43} = R^{44} = R^{45} = R^{46} = R^{47} = R^{48} = R^{49} = R^{50} = R^{51} = R^{52} = R^{53} = R^{54} = R^{55} = R^{56} = R^{57} = R^{58} = R^{59} = R^{60} = R^{61} = R^{62} = R^{63} = R^{64} = R^{65} = R^{66} = R^{67} = R^{68} = R^{69} = R^{70} = R^{71} = R^{72} = R^{73} = R^{74} = R^{75} = R^{76} = R^{77} = R^{78} = R^{79} = R^{80} = R^{81} = R^{82} = R^{83} = R^{84} = R^{85} = R^{86} = R^{87} = R^{88} = R^{89} = R^{90} = R^{91} = R^{92} = R^{93} = R^{94} = R^{95} = R^{96} = R^{97} = R^{98} = R^{99} = R^{100} = R^{101} = R^{102} = R^{103} = R^{104} = R^{105} = R^{106} = R^{107} = R^{108} = R^{109} = R^{110} = R^{111} = R^{112} = R^{113} = R^{114} = R^{115} = R^{116} = R^{117} = R^{118} = R^{119} = R^{120} = R^{121} = R^{122} = R^{123} = R^{124} = R^{125} = R^{126} = R^{127} = R^{128} = R^{129} = R^{130} = R^{131} = R^{132} = R^{133} = R^{134} = R^{135} = R^{136} = R^{137} = R^{138} = R^{139} = R^{140} = R^{141} = R^{142} = R^{143} = R^{144} = R^{145} = R^{146} = R^{147} = R^{148} = R^{149} = R^{150} = R^{151} = R^{152} = R^{153} = R^{154} = R^{155} = R^{156} = R^{157} = R^{158} = R^{159} = R^{160} = R^{161} = R^{162} = R^{163} = R^{164} = R^{165} = R^{166} = R^{167} = R^{168} = R^{169} = R^{170} = R^{171} = R^{172} = R^{173} = R^{174} = R^{175} = R^{176} = R^{177} = R^{178} = R^{179} = R^{180} = R^{181} = R^{182} = R^{183} = R^{184} = R^{185} = R^{186} = R^{187} = R^{188} = R^{189} = R^{190} = R^{191} = R^{192} = R^{193} = R^{194} = R^{195} = R^{196} = R^{197} = R^{198} = R^{199} = R^{200} = R^{201} = R^{202} = R^{203} = R^{204} = R^{205} = R^{206} = R^{207} = R^{208} = R^{209} = R^{210} = R^{211} = R^{212} = R^{213} = R^{214} = R^{215} = R^{216} = R^{217} = R^{218} = R^{219} = R^{220} = R^{221} = R^{222} = R^{223} = R^{224} = R^{225} = R^{226} = R^{227} = R^{228} = R^{229} = R^{230} = R^{231} = R^{232} = R^{233} = R^{234} = R^{235} = R^{236} = R^{237} = R^{238} = R^{239} = R^{240} = R^{241} = R^{242} = R^{243} = R^{244} = R^{245} = R^{246} = R^{247} = R^{248} = R^{249} = R^{250} = R^{251} = R^{252} = R^{253} = R^{254} = R^{255} = R^{256} = R^{257} = R^{258} = R^{259} = R^{260} = R^{261} = R^{262} = R^{263} = R^{264} = R^{265} = R^{266} = R^{267} = R^{268} = R^{269} = R^{270} = R^{271} = R^{272} = R^{273} = R^{274} = R^{275} = R^{276} = R^{277} = R^{278} = R^{279} = R^{280} = R^{281} = R^{282} = R^{283} = R^{284} = R^{285} = R^{286} = R^{287} = R^{288} = R^{289} = R^{290} = R^{291} = R^{292} = R^{293} = R^{294} = R^{295} = R^{296} = R^{297} = R^{298} = R^{299} = R^{300} = R^{301} = R^{302} = R^{303} = R^{304} = R^{305} = R^{306} = R^{307} = R^{308} = R^{309} = R^{310} = R^{311} = R^{312} = R^{313} = R^{314} = R^{315} = R^{316} = R^{317} = R^{318} = R^{319} = R^{320} = R^{321} = R^{322} = R^{323} = R^{324} = R^{325} = R^{326} = R^{327} = R^{328} = R^{329} = R^{330} = R^{331} = R^{332} = R^{333} = R^{334} = R^{335} = R^{336} = R^{337} = R^{338} = R^{339} = R^{340} = R^{341} = R^{342} = R^{343} = R^{344} = R^{345} = R^{346} = R^{347} = R^{348} = R^{349} = R^{350} = R^{351} = R^{352} = R^{353} = R^{354} = R^{355} = R^{356} = R^{357} = R^{358} = R^{359} = R^{360} = R^{361} = R^{362} = R^{363} = R^{364} = R^{365} = R^{366} = R^{367} = R^{368} = R^{369} = R^{370} = R^{371} = R^{372} = R^{373} = R^{374} = R^{375} = R^{376} = R^{377} = R^{378} = R^{379} = R^{380} = R^{381} = R^{382} = R^{383} = R^{384} = R^{385} = R^{386} = R^{387} = R^{388} = R^{389} = R^{390} = R^{391} = R^{392} = R^{393} = R^{394} = R^{395} = R^{396} = R^{397} = R^{398} = R^{399} = R^{400} = R^{401} = R^{402} = R^{403} = R^{404} = R^{405} = R^{406} = R^{407} = R^{408} = R^{409} = R^{410} = R^{411} = R^{412} = R^{413} = R^{414} = R^{415} = R^{416} = R^{417} = R^{418} = R^{419} = R^{420} = R^{421} = R^{422} = R^{423} = R^{424} = R^{425} = R^{426} = R^{427} = R^{428} = R^{429} = R^{430} = R^{431} = R^{432} = R^{433} = R^{434} = R^{435} = R^{436} = R^{437} = R^{438} = R^{439} = R^{440} = R^{441} = R^{442} = R^{443} = R^{444} = R^{445} = R^{446} = R^{447} = R^{448} = R^{449} = R^{450} = R^{451} = R^{452} = R^{453} = R^{454} = R^{455} = R^{456} = R^{457} = R^{458} = R^{459} = R^{460} = R^{461} = R^{462} = R^{463} = R^{464} = R^{465} = R^{466} = R^{467} = R^{468} = R^{469} = R^{470} = R^{471} = R^{472} = R^{473} = R^{474} = R^{475} = R^{476} = R^{477} = R^{478} = R^{479$

Peptideo	Peso molecular (Da)	<i>T. rubrum</i>	<i>T. interdigitale</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. neoformans</i>
1	879.2	0.1	ND	1.0	1.0	ND
2	1093.3	0.25	<0.125	0.1	0.25	ND
3	954.3	4.0	>4.0	ND	ND	ND
4	1150.4	2.0	0.5	ND	ND	1.0
5	856.1	4.0	>4.0	ND	ND	ND
6	1150.4	1.0	0.25	ND	ND	0.5
7	856.1	>4.0	>4.0	ND	ND	2.0
8	954.3	>4.0	>4.0	ND	ND	0.5



Tabela 3: Atividade antimicrobiana (MIC; mM) do Peptídeo 2 versus Patógenos Microbianos Selecionados

Fungo	Número	MIC (mM)	Bactéria	Número	MIC (mM)
<i>T. rubrum</i>	NCPF118	0.25	<i>S. aureus</i> ¹	NCTC10442	0.25
<i>T. rubrum</i>	7 Isolados clínicos ²	0.5-1.0	<i>S. aureus</i> ³	NCTC6571	>1.9
<i>T. interdigitale</i>	NCPF335	<0.125	<i>S. aureus</i> ²	NCTC10788	>1.9
<i>T. mentagrophytes</i>	DM2006 978	0.5	<i>S. aureus</i> ²	ATCC12598	0.95
<i>T. mentagrophytes</i>	DM2006 1023	0.5	<i>S. aureus</i> ²	NCTC8325	>1.9
<i>M. furfur</i>	DSM6170	0.031	<i>S. aureus</i> ¹	Col	0.95
<i>S. brevicaulis</i>	NCPF2177	0.5	<i>S. aureus</i> ¹	N315	0.95
<i>S. brevicaulis</i>	DM2006 1025	0.5	<i>S. aureus</i> ¹	ANS46	0.95
<i>A. niger</i>	NCPF2022	0.5	<i>S. aureus</i> ¹	MW2	0.95
<i>A. terreus</i>	NCPF2729	>2	<i>S. aureus</i>	16 Isolados clínicos ⁴	>3.8
<i>Fusarium oxysporum</i>	NCPF2722	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC27853	>1.9
<i>Fusarium</i> spp	DM2006 294	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	DSM50071	>2
<i>Fusarium</i> spp	DM2006 495	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC27853	>2
<i>Fusarium</i> spp	DM2006 1026	>2	<i>B. cepacia</i>	ATCC25609	>1.9
<i>C. albicans</i>	NCTC3179	>2	<i>E. coli</i>	NCTC12900	0.1
<i>C. albicans</i>	ATCC24433	>2			
<i>C. albicans</i>	ATCC90028	>2			
<i>C. albicans</i>	AM2003-020	>2			

¹ MRSA (*S. aureus* resistente à metilina)

² números de referência: DM2006 517; DM2006 902; DM2006 932; DM2006

5 1008; DM2006 1093; DM2006 1377

³ MSSA (*S. aureus* sensível à metilina)

⁴ números de referência: 97.2935.K; 98.1695.K; 97.2637.D; 98.2028.X; 05.5240.R; 00.9523.R; 03.8996.T; 98.1515.F; 00.5472.R; 00.1039.P; 02.6225.E; 03.3200.J; 01.7995.S; 03.8951.G; 00.9521.M; 97.1636.D

<i>C. albicans</i>	IHEM3742	>2			
<i>C. albicans</i>	s20122.073	>2			
<i>C. krusei</i>	NCPT3953	0.128- 0.256			
<i>C. krusei</i>	ATCC6258	0.125			
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	0.25			
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC90018	1.0			

Tabela 4: Atividade hemolítica de peptídeos selecionados versus células sangüíneas vermelhas

Peptídeo	Concentração Máxima Testada (mM)	Hemólise
1		Nenhuma
2	73.7	Nenhuma
3	10.0	Nenhuma
4	10.0	Nenhuma
5	10.0	Nenhuma
6	5.0	Nenhuma
7	10.0	Nenhuma
8	10.0	Nenhuma

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo cíclico ou variante do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende aminoácidos de acordo com a fórmula I:



5 em que l e m são números inteiros de 0 a 10 de tal forma que ambos, l e m, não são 0, n é um número inteiro de 1 a 10,

X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, são um aminoácido selecionado do grupo que consiste de aminoácidos catiônicos, para uso como um medicamento.

10 2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende de 2 a 50 aminoácidos.

3. Peptídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende de 3 a 15 aminoácidos.

15 4. Peptídeo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o peptídeo compreende de 5 a 13 aminoácidos.

5. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que X e/ou Y são arginina, lisina ou ornitina.

20 6. Peptídeo de acordo com qualquer reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que X e Y são iguais e são arginina ou lisina.

7. Peptídeo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que X e Y são iguais e são arginina.

8. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que X e/ou Y são D-aminoácidos.

25 9. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que X e/ou Y são L-aminoácidos.

10. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que l e m são um número inteiro entre 0 e 7 e n é um número inteiro entre 1 e 10.

11. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o peptídeo é R-R-R-R-R-R-R.

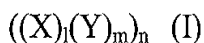
12. Processo para a preparação de um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de
5 que o processo compreende ciclizar um peptídeo de fórmula (I) por meio de reação do peptídeo com um agente de acoplamento capaz de formar uma ligação peptídica entre os dois radicais de aminoácidos terminais do peptídeo.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o agente de acoplamento é HATU - O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio-hexafluorofosfato.
10

14. Peptídeo ciclizado, caracterizado pelo fato de que pode ser obtido por meio do processo como definido na reivindicação 12 ou 13.

15. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e um veículo, excipiente ou diluente farmacologicamente aceitável.

16. Uso de um peptídeo cíclico ou variante do mesmo, compreendendo aminoácidos de acordo com a fórmula I:



20 em que l e m são números inteiros de 0 a 10, de tal forma que ambos, l e m, não são 0, n é um número inteiro de 1 a 10, X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, são um aminoácido selecionado do grupo que consiste de aminoácidos catiônicos, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma infecção
25 microbiana.

17. Uso de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a infecção é uma infecção fúngica.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a infecção fúngica é causada por um patógeno fúngico derivado

- de um fungo do gênero *Candida* spp., *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp., *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp.,
- 5 *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp., *Mucor* spp.,
- 10 *Neotestudina* 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* spp.,
- 15 *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a infecção fúngica é uma infecção por dermatófito.

20. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a infecção por dermatófito é uma infecção por *Tinea*.

20 21. Uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a infecção por dermatófito é causada por um dermatófito do gênero *Trichophyton*, *Epidermophyton* ou *Microsporum*.

22. Uso de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o dermatófito é *Trichophyton* spp.

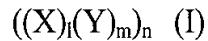
25 23. Uso de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dermatófito é *Trichophyton interdigitalis*.

24. Uso de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o dermatófito é *Trichophyton rubrum*.

25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações de 17

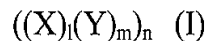
a 24, caracterizado pelo fato de que a infecção fúngica é onicomicose.

26. Uso de um peptídeo cíclico ou variante do mesmo, compreendendo aminoácidos de acordo com a fórmula I:



5 em que l e m são números inteiros de 0 a 10 de tal forma que ambos, l e m, não são 0, n é um número inteiro de 1 a 10, X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, são um aminoácido selecionado do grupo que consiste de aminoácidos catiônicos, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma ferida.

10 27. Método para tratar ou prevenir uma infecção microbiana em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar a referido indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo cíclico ou variante do mesmo, compreendendo aminoácidos de acordo com a fórmula I:



15 em que l e m são números inteiros de 0 a 10, de tal forma que ambos, l e m, não são 0, n é um número inteiro de 1 a 10, X e Y, que podem ser iguais ou diferentes, são um aminoácido selecionado do grupo que consiste de aminoácidos catiônicos.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que a infecção microbiana é uma infecção fúngica.

20 29. Método de acordo com a reivindicação 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo ou variante de peptídeo é administrada topicamente.

25 30. Método de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo ou variante de peptídeo é administrada topicamente na pele ou unhas do indivíduo.



RESUMO

“PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO MESMO, PROCESSO PARA
A PREPARAÇÃO DE UM PEPTÍDEO, PEPTÍDEO CICLIZADO,
COMPOSIÇÃO, USO DE UM PEPTÍDEO CÍCLICO OU VARIANTE DO
5 MESMO, E, MÉTODO PARA TRATAR OU PREVENIR UMA
INFECÇÃO MICROBIANA EM UM INDIVÍDUO”

A presente invenção se refere a peptídeos catiônicos cíclicos e
seu uso no tratamento de infecções microbianas.