

RESUMO

"MÉTODO PARA DETECTAR MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS E AGENTES ANTIMICROBIANOS, MÉTODO PARA AVALIAR O EFEITO MEDICAMENTOSO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS E AGENTES ANTIMICROBIANOS"

Um novo método para avaliar um efeito de um agente antimicrobiano que compreende a remoção do agente antimicrobiano que permaneceu numa amostra biológica ou semelhante, para deste modo, avaliar com precisão o efeito do agente antimicrobiano sem este ser afectado pelo agente antimicrobiano que permaneceu. Agente terapêutico para onicomicose que pode ser obtido de acordo com o método de avaliação do efeito medicamentoso.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA DETECTAR MICRORGANISMOS PATOGÉNICOS E AGENTES ANTIMICROBIANOS, MÉTODO PARA AVALIAR O EFEITO MEDICAMENTOSO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS E AGENTES ANTIMICROBIANOS"

A presente invenção refere-se a um agente terapêutico para onicomiose.

É necessário um método para avaliar um efeito medicamentoso com um modelo animal, de modo a explorar um novo agente antimicrobiano (também daqui em diante referido como "fármaco"). Além disso, é necessário um método que permita a avaliação do efeito medicamentoso com precisão, devido à grande importância da previsão da sua eficiência terapêutica clínica.

Historicamente, tem sido utilizado um modelo de dermatofitose experimental em que o dorso, planta da pata e interdigital de um cobaio foram infectados com *Trichophyton mentagrophytes*, de modo a avaliar um efeito de um agente antifúngico na dermatofitose. Tais modelos animais já tinham sido empregues para desenvolver alguns agentes antifúngicos. A avaliação do efeito de tais agentes antifúngicos é efectuada por aplicação do agente antifúngico no animal infectado, por excisão da pele após um certo período de tempo, por corte em vários pedaços pequenos, por cultivo dos pedaços de pele no meio e por contagem do número de pedaços em que não é observado crescimento de fungos ou o número de animais ou patas em que não é observado crescimento de fungos em todos os pedaços de pele, como um

indicador (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36: 2523-2525, 1992, 39: 2353-2355, 1995). Daqui em diante, o método convencional para avaliar o efeito medicamentoso é referido como "o método convencional".

Embora o fármaco com uma actividade *in vitro* potente contra o *Trichophyton*, tais como o lanoconazole ou amorolfina, tenha sido comercializado actualmente, raramente se observa uma melhoria na taxa de cura numa utilização clínica. Como uma razão principal, é indicada uma recaída, uma vez que o fungo na pele não foi completamente eliminado após um tratamento, o fungo volta a crescer.

Também em experiências animais, quando foi avaliado um efeito do lanoconazole em modelos de *tinea pedis* em cobaio, utilizando o método convencional, embora tenha sido observado "negativo para fungos" em todas as patas das 20 patas, 2 dias após o último tratamento, foi observada uma recaída em 11 das 20 patas, 30 dias após o último tratamento e não foi observada uma correlação entre o efeito 2 dias após o último tratamento e o efeito 30 dias após o último tratamento (36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Nova Orleães, Louisiana, 1996, Abstr. F80).

Como razões para tal situação, existem as seguintes. Uma vez que o lanoconazole tem uma actividade antitricofiton potente *in vitro*, o lanoconazole persistiu na pele 2 dias após o último tratamento na concentração na qual foi apresentado o efeito esterilizante. Deste modo, quando a pele é excisada e cultivada no meio para detectar fungos, o lanoconazole que permanece na pele é difundido no meio e, deste modo, não foram detectados fungos devido à prevenção do crescimento independentemente da

presença de fungos viáveis na pele excisada. Por outro lado, uma vez que a concentração do fármaco residual na pele é reduzida 30 dias após o último tratamento, os fungos na pele podem crescer de novo e podem ser detectados por estudos em cultura.

De acordo com esta hipótese, verificou-se que o fármaco residual na pele inibe completamente o crescimento de fungos à volta dos blocos de pele, quando os blocos de pele tratados com lanoconazole eram colocados e cultivados no meio que contém dermatofitose.

Deste modo, torna-se evidente que o método convencional tem o problema do efeito medicamentoso não poder ser avaliado com precisão, porque o efeito terapêutico aparente necessita de ser avaliado após remoção do fármaco residual na pele.

Entretanto, um tipo de micose, dermatofitose, é a dermatose superficial que é provocada pelo dermatófito que parasita a queratina, tais como a pele (estrato córneo), a unha e o cabelo. Em particular, a *tinea unguium* formada na unha é conhecida como a doença intratável entre as dermatomicoses baseadas em dermatofitoses e é acompanhada por sintomas tais como a opacidade, tilose, destruição e deformação da placa da unha. Actualmente, a preparação oral (tal como a griseofulvina ou terbinafina) é utilizada para o tratamento da referida *tinea unguium*. No entanto, existem muitos casos em que o doente pára de tomar o fármaco ou toma o fármaco de modo irregular, uma vez que estes doentes têm que tomar o fármaco durante um longo período de tempo, por exemplo, pelo menos, meio ano, de modo a curar completamente a *tinea unguium*. Pensa-se que esta é a causa principal da dificuldade da cura completa da *tinea unguium*. Além disso, ao tomar o fármaco durante um longo período de tempo, a

griseofulvina tem o problema dos efeitos secundários nos órgãos internos (distúrbio gastrointestinal, hepatotoxicidade) e a hepatotoxicidade é referida como o efeito secundário na terbinafina. Deste modo, de modo a melhorar o cumprimento por parte do doente é desejado desenvolver uma preparação tópica que cure a *tinea unguium* num período de tempo curto e que tenha menos efeitos secundários sistémicos que a preparação oral.

No entanto, no caso da simples aplicação na placa da unha com o actual agente antifúngico, para utilização tópica, o efeito antifúngico nos fungos na unha não foi observado, porque o fármaco não consegue penetrar, de modo suficiente, na queratina espessa da placa da unha (Markus Niewerth e Hans C. Korting, Management of Onychomycoses, Drugs, 58: 283-296, 1999).

Além disso, o efeito terapêutico de uma preparação tópica de agente antifúngico no modelo experimental de tricofitose não pode ser avaliado utilizando o método convencional, como mencionado acima. Isto pode ser uma razão porque o efeito medicamentoso no modelo de *tinea unguium* em cobaios tem sido muito raramente observado.

É desejável que um efeito de agente antimicrobiano, tal como, particularmente, o agente antifúngico, seja avaliado após a remoção de um fármaco residual no local infectado após o tratamento de um animal ou uma amostra biológica, tal como pele, com o microrganismo patogénico. É descrito um método para avaliar o efeito do agente antimicrobiano e o agente antimicrobiano obtido de acordo com o método para avaliar o efeito medicamentoso. Em detalhe, é divulgado um método para detectar o microrganismo patogénico viável no local infectado do

animal ou da amostra biológica com o microrganismo patogénico, mencionado acima, após remoção do agente antimicrobiano que foi administrado ao animal ou à amostra biológica e um método para avaliar o efeito do agente antimicrobiano que pode avaliar, com precisão, o efeito do agente antimicrobiano sem a influência do agente antimicrobiano residual no local infectado do animal ou da amostra biológica, com um microrganismo patogénico. Além disso, é descrito o agente antimicrobiano obtido de acordo com o método mencionado acima para avaliar o efeito medicamentoso e o método de detecção do agente antimicrobiano que compreende detectar a existência de agentes antimicrobianos no local infectado do animal ou da amostra biológica com o microrganismo patogénico, ao qual o agente antimicrobiano é administrado.

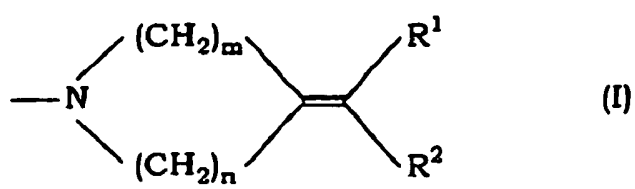
Em maior detalhe, pode ser efectuada a detecção de um microrganismo patogénico e uma avaliação de um efeito de um agente antimicrobiano por infecção de um animal ou uma amostra biológica com o microrganismo patogénico, administração do agente antimicrobiano compreendendo um composto com um efeito antimicrobiano ou uma sua composição antes ou depois da infecção, posterior remoção do agente antimicrobiano e, depois, detecção do microrganismo patogénico viável no local infectado com este microrganismo patogénico.

A detecção de um agente antimicrobiano existente pode ser efectuada por infecção de um animal ou uma amostra biológica com um microrganismo patogénico, administração do agente antimicrobiano compreendendo um composto com um efeito antimicrobiano ou uma sua composição antes ou depois da infecção, posterior excisão do local infectado com o microrganismo patogénico, colocação e cultivando-o num meio contendo o microrganismo patogénico e, depois disso, observação

de uma inibição do crescimento do microrganismo patogénico à volta do local infectado com o microrganismo patogénico.

Adicionalmente, é proporcionado um método de avaliação de um fármaco que permita que o efeito de um agente antifúngico seja avaliado com precisão num modelo de *tinea unguium* em cobaio. Um objectivo da presente invenção é proporcionar um agente terapêutico para utilização no tratamento de onicomicose que exhibe o efeito em *tinea unguium* por aplicação tópica e que é capaz de curar a *tinea unguium* num período de tempo mais curto relativamente à preparação oral comercializada, devido à boa permeabilidade, boa capacidade de retenção e conservação de actividade elevada na placa da unha, bem como à sua potente actividade antifúngica, baseada na presente invenção. Outro objectivo da presente invenção é proporcionar o agente terapêutico eficaz para a onicomicose, não exibindo efeitos secundários mesmo se forem administradas, de modo suficiente, quantidades terapeuticamente eficazes deste.

Mais concretamente, a presente invenção proporciona um agente terapêutico para utilização no tratamento da onicomicose, contendo um composto com um grupo representado pela fórmula (1):



em que R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e são átomo de hidrogénio, grupo alquilo C_{1-6} , um grupo arilo não substituído, um grupo arilo substituído com 1 a 3 substituintes seleccionados de um átomo de halogéneo,

grupo trifluorometilo, grupo nitro e grupo alquiloC₁₋₆, grupo alceniloC₂₋₈, grupo alquiniloC₂₋₆ ou grupo aralquiloC₇₋₁₂,

m é 2 ou 3,

n é 1 ou 2,

ou um seu sal como ingrediente activo. O agente terapêutico é para ser administrado topicamente.

Além disso, "presença" inclui o significado de "residual".

A Fig. 1 é uma cópia a cores de uma fotografia para identificar o agente residual na pele, que é previamente avaliado pelo método convencional, no método de detecção do agente antimicrobiano, cinco dias após o último tratamento. A nota (a) mostra o grupo de controlo infectado, (b) o grupo tratado com KP-103, (c) o grupo tratado com lanoconazole.

A Fig. 2 é uma cópia a cores da fotografia para identificar o agente residual na pele, que é previamente avaliado pelo método de detecção do agente antimicrobiano, cinco dias após o último tratamento. A nota (a) mostra o grupo de controlo infectado, (b) o grupo tratado com KP-103, (c) o grupo tratado com lanoconazole.

A Fig. 3 é um gráfico que mostra uma distribuição do número de células de fungo na unha de um modelo de *tinea unguium* em cobaio, em cada grupo tratado, de acordo com o método de avaliação do efeito medicamentoso na presente invenção.

A Fig. 4 é um gráfico que mostra uma distribuição do número de células de fungo na pele de um modelo de *tinea pedis* em cobaio, em cada grupo tratado, de acordo com o método de avaliação do efeito medicamentoso.

Como o animal empregue, estão incluídos mamíferos, tais como murganhos, rato, cobaio ou coelho. Como uma amostra biológica, estão incluídos a pele do dorso ou planta da pata, ou uma unha que foi retirada de tal animal.

Um método para infectar tal animal ou amostra biológica com um microrganismo patogénico inclui uma inoculação percutânea, oral, intravenosa, transbrônquica, transnasal ou intraperitoneal. Especialmente no caso da pele, inclui-se um método para inoculá-lo na pele, um método para inoculá-lo na derme exposta, o método do emplastro fechado ou injeção intercutânea. No caso da unha, inclui-se um método para inocular na unha, um método no qual a pele da pata do animal é infectada pelo método de infecção na pele acima mencionado e, depois disso, a infecção é transferida para a unha ao deixá-la sobre esta durante vários meses.

O termo "pele" significa um tecido incluindo as três camadas, sendo elas a epiderme, derme e tecido subcutâneo, juntamente com os pêlos (cabelo), unha, glândula sebácea, glândula sudorífera e glândula mamária como apêndices. A epiderme é separada em cinco camadas, sendo elas o estrato córneo, estrato lúcido, epiderme granulosa, estrato espinhoso e estrato basal, nesta ordem a partir da superfície. O estrato córneo, o estrato lúcido e o estrato granuloso da epiderme são referidos, num sentido amplo, como um estrato córneo. Aqui, a

substância queratinosa significa uma parte do estrato córneo mencionado acima.

O termo “unha” inclui a placa da unha, base da unha, a matriz da unha e ainda parede lateral da unha, parede posterior da unha, eponíquio e hiponíquio que constitui um tecido à sua volta.

O termo “microrganismo patogénico” significa um microrganismo que provoca doença humana e animal de uma forma ou de outra. Um exemplo do microrganismo patogénico (daqui em diante referido por “microrganismo”) são as bactérias incluindo bacilos e cocos Gram negativos aeróbicos, tais como as espécies *Pseudomonas* e *Neisseriaceae*; os bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, tais como as espécies *Eschrichia*, *Salmonella* e *Enterobacter*; cocos Gram-positivos, tais como as espécies *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Os outros exemplos de microrganismos são os fungos, incluindo Hipomicetes, tais como as espécies *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*; Blastomicetes, tais como *Candida* e *Malassezia*; Ascomicetes, tais como a espécie *Aspergillus*; Zigomicetes, tal como espécies de *Mucor*; e suas variantes. Exemplos de tais variantes são as estirpes resistentes que adquirem resistência a fármacos naturalmente; estirpe de mutação auxotrófica que se torna dependente nutricionalmente; estirpe de mutação artificial que é mutado artificialmente por tratamento com agente mutagénico.

Micose significa uma doença que é provocada por invasão e proliferação no tecido humano ou animal. Normalmente, a micose é amplamente dividida em micose superficial e micose profunda. Uma grande variedade da doença assenta na pele ou mucosa visível no caso da primeira, em órgãos viscerais, sistema nervoso central,

tecido subcutâneo, músculo, osso ou articulação no caso da segunda. O exemplo principal da micose superficial é a dermatofitose que é provocada por infecção com dermatófitos, tais como as espécies *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, incluindo as três doenças, *tinea*, *tinea favosa* e *tinea imbricata*. A *tinea* pode ser empregue convencionalmente como um sinónimo da dermatofitose. Além disso, um dermatófito que pertence à espécie *Trichophyton* é normalmente referido como tricofitose.

Um agente antimicrobiano significa um composto com um efeito antimicrobiano ou uma composição contendo o composto. A composição inclui uma forma de preparação sendo uma composição artificial e uma composição natural, tal como um produto natural.

Um método para administração do agente antimicrobiano nos métodos de avaliação e métodos de detecção descritos depende do seu tipo e inclui aplicação tópica, administração subcutânea, administração oral e administração intravenosa.

Quando o método para detectar o microrganismo patogénico, o método para avaliar o efeito medicamentoso e o método para detectar o agente antimicrobiano são efectuados, pode ser efectuada inicialmente uma infecção com microrganismo ou uma administração do agente antimicrobiano. Especialmente, no método para avaliar o efeito medicamentoso (daqui em diante referido como "o presente método de avaliação"), pode ser avaliado um efeito terapêutico do agente antimicrobiano, no caso em que o agente antimicrobiano é administrado após a infecção com o microrganismo, entretanto, pode ser avaliado um efeito do agente antimicrobiano protegendo da infecção e a sua capacidade de

retenção, no caso em que a infecção com o microrganismo é efectuada após a administração do agente antimicrobiano. De modo a avaliar a capacidade de retenção do agente antimicrobiano, a avaliação pode ser efectuada variando o período de tempo até à infecção com o microrganismo, a partir da administração do agente antimicrobiano.

Do ponto de vista da utilidade, é preferível utilizar a diálise ou ultrafiltração para remover o agente antimicrobiano, mas não limitado a estes, desde que um microrganismo a ser um alvo a detectar ou um microrganismo utilizado no presente método de avaliação, não seja afectado por estes.

Na diálise, é preferível uma membrana de diálise comercializada, feita de celulose. Pode ser utilizada, sem qualquer problema, uma membrana feita de outro material, desde que o microrganismo a ser o alvo de detecção ou o microrganismo utilizado no presente método de avaliação não consiga passar e o agente antimicrobiano consiga passar através dela. Uma vez que os tamanhos da maioria dos fungos e bactérias é de, pelo menos, 0,2 μm , é preferido utilizar uma membrana com menos de 0,2 μm de tamanho de poro, particularmente, é adequado utilizar uma membrana de diálise com peso molecular fraccionado de 1000 até 50000.

Como soluções externas utilizadas em diálise, estão incluídas solução salina fisiológica, água destilada, solução salina fisiológica tamponada com fosfatos e o outro tampão.

Na remoção do agente antimicrobiano, embora o local infectado com o microrganismo seja a unha, órgão bem como a pele, o agente antimicrobiano pode ser eficientemente removido.

Normalmente, uma vez que existe o caso onde ocorre uma diálise com tempo mais prolongado para remover o agente antimicrobiano da unha superior ao da da pele, antes da sua remoção pode ser efectuado o seguinte tratamento com enzima digestiva, de modo a potenciar o efeito da remoção.

As condições da diálise dependem da variedade, concentração da dose, interrupção da dose e descanso da dose (da interrupção até à avaliação, desde o último dia do tratamento) de um agente antimicrobiano. Deste modo, é preferido investigar previamente as condições da diálise que permitem a remoção do agente antimicrobiano da pele tratada relativamente a casos individuais, utilizando o seguinte método de detecção do agente antimicrobiano existente no local infectado com um microrganismo (daqui em diante referido como “o presente método para detectar um agente”), para ajustar as condições de um modo apropriado.

Utilizando o seguinte método, pode ser facilmente determinado se um agente antimicrobiano foi removido ou não.

O presente método para detectar um agente é efectuado ao colocar e cultivar o local infectado com um microrganismo que foi submetido ao método de remoção do agente antimicrobiano (e. g., um pedaço de pele) ou uma suspensão obtida de acordo com o seguinte processo de extracção do microrganismo a partir do pedaço de pele anterior num meio de agar contendo o microrganismo e observando uma inibição do crescimento do microrganismo encontrado à volta da pele. Quando existe o agente antimicrobiano residual, observa-se a inibição do crescimento do microrganismo.

O presente método de avaliação pode ser efectuado ao colocar e cultivar, num meio, o pedaço de pele no qual foi determinada a remoção de um agente antimicrobiano, utilizando o presente método mencionado acima, para detectar o agente após efectuar a remoção apropriada do agente antimicrobiano e observar se existe ou não crescimento do microrganismo, ou esfregar e cultivar uma suspensão obtida de acordo com o processo de extracção do microrganismo do pedaço de pele num meio de agar e observando se existe ou não crescimento do microrganismo ou contar as colónias emergentes nesse meio.

Pode ser efectuado um tratamento com tripsina de modo a extrair, de um modo eficiente, um microrganismo de uma amostra biológica, tal como pele ou unha. Podem também ser utilizadas outras enzimas digestivas para além da tripsina, tais como pronase ou queratinase, ou um resolvente de queratina, tal como ureia, sem limitação à tripsina, desde que apresentem um efeito de extracção. É necessário ajustar as concentrações da enzima digestiva, tais como tripsina e resolvente de queratina, numa solução de tratamento e o tempo de reacção numa gama que não afecte o microrganismo. O tratamento com a enzima digestiva, tal como a tripsina, pode ser efectuado quer antes ou após a diálise. Quando o tratamento com a tripsina é efectuado antes da diálise, é necessário remover, de um modo suficiente, a enzima digestiva, de modo a que o microrganismo não seja afectado durante a diálise.

Como um meio utilizado para o cultivo de um microrganismo, pode ser utilizado qualquer meio desde que possa ser utilizado convencionalmente para o cultivo e separação do microrganismo. No caso dos fungos, exemplos do meio são o meio Sabouraud, meio Sabouraud modificado, meio de agar Czapek e meio de agar com

dextrose de batata. Por outro lado, no caso das bactérias, exemplos do meio são, meio Mueller Hinton, meio Mueller Hinton modificado, meio de agar e Infusão de Coração, meio de agar Infusão de Coração e Cérebro e meio de agar normal.

Uma temperatura reaccional é de 10 a 40 °C, de um modo preferido, 20 a 40 °C. Um microrganismo pode ser cultivado com repouso durante um tempo suficiente onde um microrganismo pode ser crescido, por exemplo, 1 a 20 dias no caso de fungos, 1 a 5 dias no caso de bactérias.

O presente método de avaliação pode ser utilizado como um método de avaliação de um efeito de fármaco *ex vivo*, que compreende infectar uma pele, uma unha excisada de um animal com um microrganismo, administrar depois um agente antimicrobiano como um composto de teste, remover depois o agente antimicrobiano e detectar e determinar a quantidade do microrganismo na amostra.

O presente método de avaliação pode também ser aplicado a uma avaliação de um agente antimicrobiano, tal como um agente terapêutico para micose profunda ou de um agente antibacteriano, bem como uma avaliação de um efeito de um agente terapêutico para micose superficial. Isto é o mesmo que dizer, que é possível avaliar um efeito de um agente terapêutico para micose profunda ou um agente antibacteriano através da administração de um agente antimicrobiano a um animal infectado com um microrganismo, tal como um fungo ou uma bactéria, por inoculação percutânea, oral, intravenosa, transbrônquica, transnasal, intraperitoneal, obtendo depois uma amostra biológica, tal como pele, rim, pulmão ou cérebro e detectar o microrganismo viável

na amostra biológica da qual foi removido o agente que permaneceu.

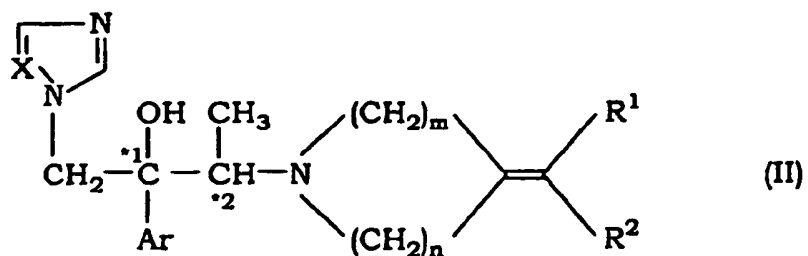
Além disso, o presente método de avaliação permite uma comparação quantitativa dos efeitos antimicrobianos através da determinação do número de microrganismos viáveis na amostra biológica tratada.

Isto é o mesmo que dizer que é efectuado um teste de referência significativa relativamente ao número de microrganismos no local infectado com o microrganismo para o grupo tratado com o fármaco e para o grupo de referência infectado, utilizando um método estatístico, tal como o Teste de Kruskal-Wallis e, deste modo, pode ser efectuada uma comparação quantitativa entre os grupos utilizando um teste múltiplo, tal como o método de Tukey.

O método descrito é útil como um método para avaliar um efeito de fármaco ou como um método para detectar os antimicóticos na substância queratinosa ou unha, após administração do agente antifúngico ao doente infectado com fungos. Por exemplo, um efeito de um agente antifúngico pode ser avaliado por administração deste ao doente cuja pele ou unha está infectada com fungos, obtenção da substância queratinosa ou unha, remoção posterior do agente antifúngico mencionado acima e, depois disso, detecção dos fungos viáveis na substância queratinosa ou unha. Adicionalmente, pode ser efectuada uma detecção de um agente antifúngico por administração deste ao doente cuja pele ou unha está infectada com fungos, obtenção posterior da substância queratinosa ou unha, cultivo em meio de agar contendo fungos e, depois disso, detecção do agente antifúngico existente na substância queratinosa ou unha através

da inibição do crescimento dos fungos observados à volta da substância queratinosa ou unha. Tal avaliação de uma agente antifúngico administrado a um doente com fungos e detecção do agente antifúngico da substância queratinosa ou unha pode ser efectuada do mesmo modo que no método de avaliação mencionado acima, de um efeito de fármaco e método de detecção do agente antimicrobiano administrado a um animal ou a uma amostra biológica.

Além disso, o presente método de avaliação proporciona vários agentes antimicrobianos úteis. Como o agente antimicrobiano obtido pelo presente método de avaliação, existe um agente antimicrobiano compreendendo um composto com um efeito de erradicação para microrganismos *in vivo* ou uma composição contendo o composto para terapia de micose superficial, micose profunda ou infecção bacteriana; um agente antimicrobiano com o verdadeiro efeito seleccionado por meio de demonstração de um efeito estatisticamente significativo; além disso, um agente antimicrobiano com um efeito de erradicação excelente para microrganismos *in vivo*, que é seleccionado por meio de aparecimento da sua actividade antimicrobiana pura; ou um agente antimicrobiano do tipo cura completa sem recaída. Um exemplo concreto é um agente terapêutico para utilização no tratamento da onicomiose de acordo com a presente invenção, que compreende um composto com um grupo representado pela fórmula (I) mencionada acima, em que o agente terapêutico é para ser administrado topicamente. Entre eles, um exemplo concreto mais preferido é um agente terapêutico para utilização no tratamento de onicomiose, compreendendo o composto representado pela fórmula (II):



em que Ar é um grupo fenilo não substituído ou um grupo fenilo substituído com 1 a 3 substituintes, seleccionados de um átomo de halogéneo e grupo trifluorometilo,

R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e são o átomo de hidrogénio, grupo alquilo C_{1-6} , um grupo arilo não substituído, um grupo arilo substituído com 1 a 3 substituintes, seleccionados de um átomo de halogéneo, grupo trifluorometilo, grupo nitro e grupo alquilo C_{1-6} , grupo alcenilo C_{2-8} , grupo alquinilo C_{2-6} ou grupo aralquilo C_{7-12} ,

m é 2 ou 3,

n é 1 ou 2,

X é um átomo de azoto ou CH, e

*1 e *2 significa um átomo de carbono assimétrico,

Na fórmula (I) ou (II) mencionadas acima, o grupo fenilo substituído é um grupo fenilo com 1 a 3 substituintes seleccionados de um átomo de halogéneo e trifluorometilo e inclui, por exemplo, 2,4-difluorofenilo, 2,4-diclorofenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo, 2-clorofenilo,

4-trifluorometilfenilo, 2-cloro-4-fluorofenilo e 4-bromofenilo. O grupo alquiloC₁₋₆ inclui, por exemplo, um grupo alquilo de cadeia linear, cadeia ramificada ou cíclico com 1 a 6 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, terc-pentilo e ciclo-hexilo. O grupo arilo não substituído inclui, por exemplo, fenilo, naftilo e bifenilo. O grupo arilo substituído inclui, por exemplo, 2,4-difluorofenilo, 2,4-diclorofenilo, 4-fluorofenilo, 4-clorofenilo, 2-clorofenilo, 4-trifluorometilfenilo, 2-cloro-4-fluorofenilo, 4-bromofenilo, 4-terc-butilfenilo, 4-nitrofenilo ou semelhantes. O grupo alceniloC₂₋₈ inclui, por exemplo, vinilo, 1-propenilo e estirilo. O grupo alquiniloC₂₋₆ inclui, por exemplo, etinilo. O grupo aralquiloC₇₋₁₂ inclui, por exemplo, benzilo, naftilmetilo e 4-nitrobenzilo.

Além disso, o composto mais preferido entre os agentes antimicrobianos mencionados acima incluem o composto que mostra a eficiência terapêutica como o seguinte KP-103.

O KP-103 mencionado acima significa um antifúngico indicado por (2R,3R)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(4-metilenopiperidina-1-il)-1-(1H-1,2,4-triazole-1-il)butano-2-ol. O composto pode ser preparado deixando que o (2R,3S)-2-(2,4-difluorofenil)-3-metil-2-[(1H-1,2,4-triazole-1-il)metil]6xirano reaja com a 4-metilenopiperidina baseada no Exemplo 1 do documento WO 94/26734.

A eficácia do KP-103 utilizado como um agente antifúngico no presente agente terapêutico para utilização no tratamento da onicomiose, não foi confirmada, mas a sua actividade antifúngica já é conhecida (documento W094/26734).

O agente antimicrobiano obtido deste modo pode ser utilizado como uma composição de fármaco, a composição de fármaco, de modo a esterilizar um microrganismo. Por outras palavras, torna-se uma composição farmacológica que cura completamente uma doença, tal como a micose e previne uma recaída.

Onicomucose significa um tipo da micose superficial mencionada acima, por outras palavras, uma doença que é provocada por invasão e proliferação na unha de um humano ou animal. O *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* provocam principalmente onicomucose em humanos. Em casos raros, pode ser provocada por *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Candida*, *Aspergillus* ou *Fusarium*.

Como uma doença que é susceptível a tratamento com um agente terapêutico para utilização no tratamento de onicomucose da presente invenção, está incluída a *tinea unguium* provocada por espécies de *Trichophyton*, Onicocandidíase provocada por espécies de *Candida* ou onicomucose (*sensu stricto*) provocada pelos outros fungos.

Um agente terapêutico para utilização no tratamento da onicomucose é apresentado como uma preparação tópica. Exemplos são uma preparação líquida, creme, unguento ou preparação de manicure como uma forma de dosagem. Neste caso, pode ser preparado utilizando um veículo oleoso, veículo de emulsão ou semelhantes. A quantidade preferida de ingrediente activo é de 0,1 a 10% em peso. Pode ser estabelecida uma quantidade de dose, de um modo apropriado, dependendo da extensão da área afectada e condições da doença.

Na presente invenção, embora a quantidade de dosagem de um agente terapêutico para onicomicose dependa da idade, peso e condições individuais de um doente, é de cerca de 10 mg a cerca de 10 g por dia, de um modo preferido, cerca de 50 mg a cerca de 5 g como quantidade do ingrediente activo. O agente pode ser administrado na dose diária mencionada acima de uma só vez ou em várias porções divididas.

A presente invenção é ainda explicada em detalhe, baseada nos Exemplos que se seguem, mas não está limitada a eles.

EXEMPLOS

Pré-tratamento do Exemplo Comparativo 1 e Exemplos 1 a 3
(Exemplos de Referência)

[1] Preparação da solução fúngica e produção de um modelo de *tinea pedis* do tipo interdigital em cobaio.

Foi colocado um filtro Millipore (fabricado pela Millipore Corporation, HA, diâmetro de 47 mm, 0,45 µm) em meio de agar Infusão Cérebro-Coração (disponível da Nissui Pharmaceutical Co., LTD.) e nele foram aplicadas 10^6 células de microcondium da estirpe KD-04 de *Trichophyton mentagrophytes*. O cultivo foi efectuado a 30 °C sob CO₂ a 17% durante 7 dias. Após o cultivo, foi vertida apenas a quantidade de solução salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 80 no filtro e a artroconidia foi recolhida utilizando uma ansa de platina. Após ter sido removida uma massa hifal por uma filtração com uma gaze estéril, foi calculado o número de artroconidia no filtrado com um

hemocitômetro, para ajustar a uma concentração de 1×10^8 artroconidia/mL para obter um inóculo de fungos.

Foi preparado um modelo de *tinea pedis* do tipo interdigital em cobaio de acordo com o método de Arika et al. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 36: 2523-2525, 1992). Concretamente, a pele interdigital das duas patas posteriores de cobaias machos da estirpe Hartley com 7 semanas de idade, foi ligeiramente raspada com lixa. Foi aplicado um disco de papel (Disco AA disponível de Whatmen International Ltd cortado para 8×4 mm), humedecido com a solução mencionada acima do organismo inoculado, na região interdigital entre os dedos da pata posterior e fixado utilizando uma almofada de Espuma Auto-aderente (Restone 1560M; disponível de 3M) e penso elástico adesivo (ELASTPORE; disponível da Nichiban Co., Ltd). O disco de papel e o penso foram removidos sete dias após a infecção.

[2] Preparação da solução de fármaco e tratamento tópico para o modelo de *tinea pedis* do tipo interdigital em cobaio.

Uma solução comercial de lanoconazole a 1% (nome comercial: solução Astat (marca registada)) e uma solução na qual foi dissolvido o KP-103 a uma concentração de 1% numa mistura de polietilenoglicol N°400:etanol (75:25 v/v), foi utilizada como uma substância de teste. Cada solução, numa quantidade de 0,1 mL foi aplicada na pele da planta da pata uma vez por dia, 10 dias após a infecção, durante 10 dias.

EXEMPLO COMPARATIVO 1

Método convencional para avaliação do efeito medicamentoso

O método convencional foi descrito como se segue. Para o grupo de controlo infectado sem uma aplicação do fármaco, o grupo tratado com KP-103 e o grupo tratado com lanconazole, foram utilizados 10 cobaios (daqui em diante referidos como "animais"), respectivamente. Os animais de cada grupo foram sacrificados dois dias após e 30 dias após o último tratamento. As suas duas patas posteriores foram excisadas e limpas com algodão contendo álcool numa quantidade suficiente. A pele da planta da pata toda foi excisada e cortada em 15 pedaços de pele no total, incluindo 12 pedaços de pele da parte da planta da pata e 3 pedaços de pele de uma parte interdigital. Todos os pedaços de pele foram colocados em 20 mL de meio de agar com dextrose Sabouraud (disponível dos laboratórios Difco) contendo 50 µg de cloramfenicol (disponível da Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 100 µg de gentamicina (disponível da Schering-Plough Corporation), 50 µg de 5-fluorocitosina (disponível da Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) e 1 mg de ciclo-heximida (disponível da nacalai tesque, Inc.) por mL. Foi adicionada uma substância de antibiótico ao meio numa quantidade que não permite que as bactérias cresçam e que permite que os fungos cresçam sem problemas. Após 10 dias de cultivo a 30 °C, o resultado é descrito como "negativo para fungos" quando não foi observado crescimento de fungos em todos os pedaços de pele e foi determinado o número de patas negativas para fungos. Na avaliação do efeito 30 dias após o último tratamento, dois dias após o último tratamento as patas tratadas foram limpas com algodão contendo álcool e fixas com o penso de modo a evitar uma reinfecção. O penso foi mudado uma vez por semana. Os efeitos

terapêuticos do KP-103 e lanoconazole, dois dias após e 30 dias após o último tratamento, são mostradas na Tabela 1.

TABELA 1

Substância de teste	O número de patas negativas para fungos/Número total de patas infectadas	
	Dois dias após o último	30 dias após o último
	tratamento	tratamento
Controlo infectado	0/20	0/20
KP-103	20/20	16/20
Lanoconazole	20/20	9/20

Como mostrado na Tabela 1, no grupo tratado com KP-103, foi observado um efeito negativo para fungos em todas as patas dois dias após o último tratamento e foi também observado um efeito negativo para fungos em 16 das 20 patas, 30 dias após o último tratamento. Por outro lado, no grupo tratado com lanoconazole, foi observado um efeito negativo para fungos em todas as patas dois dias após o último tratamento, mas foi observado um efeito negativo para fungos em apenas 9 patas 30 dias após o último tratamento e não existe correlação entre os efeitos terapêuticos dois dias após e 30 dias após o último tratamento. O número de patas negativas para fungos diminuiu 30 dias após o último tratamento. Pensa-se que o efeito terapêutico do lanoconazole, observado dois dias após o último tratamento, resultou da inibição do crescimento de fungos provocado por uma interfusão do fármaco residual na pele tratada no sistema de cultura, porque o lanoconazole tem uma actividade antifúngica potente *in vitro* contra os dermatófitos, tem oito vezes mais actividade do que o KP-103 contra o Tricofiton com uma concentração de

inibição do crescimento de 15,6 ng/mL. Foi efectuado o teste de determinação do agente residual.

EXEMPLO 1 (Exemplo de Referência)

Determinação do fármaco residual na pele que foi já avaliado cinco dias após o último tratamento, de acordo com o método convencional

Foi preparado um modelo de acordo com o Exemplo Comparativo 1. Sendo o lanconazole um composto de teste, foi utilizado para uma experiência terapêutica como uma solução a 1% com o mesmo veículo que o KP-103. Para o grupo de controlo infectado sem uma aplicação de um fármaco, o grupo tratado com KP-103 e o grupo tratado com lanconazole, foram empregues, respectivamente, 20 animais. As duas patas posteriores foram excisadas de cada animal, cinco dias após o último tratamento, do mesmo modo que no Exemplo Comparativo 1. Foram utilizadas 20 patas direitas no total para uma avaliação através do método convencional e foram utilizadas 20 patas direitas no total no presente método de avaliação.

Os pedaços de pele da pata direita foram colocados em 20 mL de meio de agar com dextrose Sabouraud contendo estirpe KD-04 de *Trichophyton mentagrophytes* (2×10^4 células/mL) e a substância de antibiótico descrita no Exemplo Comparativo 1. Após ter sido efectuado o cultivo a 30 °C durante 3 dias, foi observada uma zona de inibição de crescimento de fungos à volta da pele e foi fotografada para 10 das 20 patas. A Figura 1 é um dado electrónico da fotografia da pele após o cultivo na condição mencionada acima. (a) indica o grupo de controlo infectado sem a

aplicação do fármaco, (b) o grupo tratado com KP-103 e (c) o grupo tratado com lanoconazole. Uma das placas foi explicada como representativa das dez placas que correspondiam a cada animal do grupo de controlo infectado (a). Na Figura 1, S indica um dos 15 pedaços de pele da planta da pata derivada de um animal e M o meio mencionado acima. S e M descritos em ambos os grupos tratados com KP-103 (b) e o grupo tratado com lanoconazole (c) são também os mesmos. No meio, a zona a branco mostra o crescimento dos fungos, por outro lado, a zona a preto mostra a inibição do crescimento dos fungos.

Como apresentado na Figura 1, foi observado um bom crescimento dos fungos à volta do pedaço de pele do grupo de controlo infectado, sem qualquer fármaco. No grupo tratado com KP-103, o crescimento dos fungos foi observado em todos os pedaços de pele, embora à volta dos pedaços de pele, o crescimento dos fungos tenha sido ligeiramente inibido quando comparado com o grupo de controlo infectado. Por outro lado, o crescimento dos fungos foi completamente inibido à volta dos pedaços de pele tratados com lanoconazole. Com estes resultados, o efeito terapêutico do lanoconazole no método convencional apresentado na Tabela 1, foi considerado como um efeito terapêutico aparente, uma vez que o agente residual na pele se mistura no sistema de cultura, para inibir o crescimento de fungos.

Deste modo, torna-se evidente que o efeito medicamentoso não poderá ser avaliado com precisão através do método convencional.

EXEMPLO 2 (Exemplo de Referência)

Determinação do fármaco residual após a remoção do fármaco da pele.

Como no Exemplo 1, foram excisadas 20 patas direitas de cada animal, cinco dias após o ultimo tratamento e foram limpas, de um modo suficiente, com o algodão contendo álcool. De cada pata foi cortada a planta. A pele triturada com tesouras foi colocada numa membrana de diálise (peso molecular fraccionado: 12000-14000, feita por celulose, disponível da VISKASE SALES Corporation) juntamente com 4 mL de água destilada. A diálise foi efectuada sob 3 L de água destilada a 4 °C durante 2 dias. A água da diálise foi substituída duas vezes por dia, 4 vezes no total. O conteúdo foi transferido para um homogeneizador de vidro. A este foram adicionados 4 mL de solução salina tamponada com fosfatos duas vezes concentrada contendo tripsina derivada de pâncreas de porco a 4% (disponível da BIOZYME Laboratories Limited) e a mistura resultante foi homogeneizada. Foi deixada a 37 °C durante uma hora e foi filtrada com a gaze de dupla camada. O filtrado resultante foi centrifugado. A um precipitado obtido por remoção do sobrenadante foram adicionados 8 mL de solução salina tamponada com fosfatos contendo tripsina a 2% e permitindo depois que reaja com agitação a 37 °C, durante uma hora. Após uma centrifugação, o precipitado obtido por remoção do sobrenadante foi lavado três vezes por centrifugação com solução salina tamponada com fosfatos de modo a remover a tripsina. Ao precipitado foram adicionados 2 mL da mesma solução salina, para preparar uma sua suspensão.

Quando a diálise e o tratamento com tripsina foram efectuados utilizando os mesmos fungos utilizados neste Exemplo,

não foi possível observar um efeito destes processos numa taxa de sobrevivência de fungos. Previamente, foi preparado um poço no centro do meio de agar com dextrose Sabouraud (20 mL), contendo a estirpe KD-04 de *Trichophyton mentagrophytes* (2×10^4 células/mL) e a substância de antibiótico descrita no Exemplo Comparativo 1. No poço, foram adicionados 100 µL da suspensão mencionada acima para cultivar a 30 °C durante três dias. Após o cultivo, observou-se um círculo de inibição do crescimento de fungos e foram fotografados 10 das 20 patas. A Figura 2 é um dado electrónico da fotografia da pele após o cultivo na condição mencionada acima. (a) indica o grupo de controlo infectado sem a aplicação do fármaco, (b) o grupo tratado com KP-103 e (c) o grupo tratado com lanoconazole. Uma placa foi explicada como representativa de dez placas correspondendo a cada animal do grupo de controlo infectado (a). Na Figura 2, E indica a suspensão de pele preparada a partir da planta do animal e M o meio mencionado acima. E e M descritos em ambos os grupos tratados com KP-103 (b) e o grupo tratado com lanoconazole (c) são também os mesmos. No meio total, a zona a branco mostra o crescimento dos fungos, por outro lado, a zona a preto à volta do poço mostra a inibição do crescimento de fungos.

Na Figura 1, que mostra o método convencional, não foi observado o crescimento de fungos à volta da pele do grupo tratado com lanoconazole, retirada cinco dias após o último tratamento e foi determinado o fármaco residual na pele. Em contraste, na Figura 2, embora tenha sido observado um círculo de inibição do crescimento em 2 das 10 suspensões de patas obtidas por remoção do fármaco, utilizando o tratamento por diálise do presente método para a pele do grupo tratado com lanoconazole, tirada cinco dias após o último tratamento, nunca

foi observado o círculo de inibição do crescimento nas 8 patas residuais.

Uma vez que parece que o fármaco residual na pele tratada pode ser suficientemente removido, utilizando a diálise de acordo com o presente método, confirmou-se que a avaliação do efeito medicamentoso não foi afectada pelo fármaco residual.

EXEMPLO 3 (Exemplo de Referência)

Detecção de fungos viáveis na pele e avaliação do efeito medicamentoso

A dois meios de meio de agar com dextrose Sabouraud (20 mL) contendo a substância de antibiótico descrita no Exemplo Comparativo 1, foram aplicados 100 µL da suspensão de uma pata direita de cada um dos animais obtidos no Exemplo 2. Após ter sido efectuado o cultivo a 30 °C durante 10 dias, o resultado é descrito como “negativo para fungos” quando não é observada uma colónia de fungos nas duas placas de agar (limite de detecção: 10 CFU (unidades formadoras de colónias)/pata). Foi contado o número de patas negativas para fungos. Por outro lado, foram avaliadas 20 patas esquerdas do mesmo modo que no Exemplo Comparativo 1. A Tabela 2 mostra o resultado da comparação do efeito terapêutico avaliado pelo método convencional com o do presente método de avaliação.

TABELA 2.

Substância de teste	O número de patas negativas para fungos/Número total de patas infectadas	
	Método Convencional	Presente método de avaliação
Controlo infectado	0/20	0/20
KP-103	19/20	17/20
Lanoconazole	20/20	3/20

No caso do grupo tratado com KP-103, não foi observada diferença significativa no número de patas negativas para fungos, mesmo que o número seja avaliado pelo método convencional ou presente método de avaliação, como mostrado na Tabela 2. A taxa de patas negativas para fungos, avaliada pelo presente método de avaliação, é de 85% no caso do KP-103. Por outro lado, no grupo tratado com lanoconazole, embora tenha sido observado o efeito “negativo para fungos” em todas as patas, através do método convencional, apenas foi observado o efeito “negativo para fungos” em três patas através do presente método de avaliação.

Como mencionado acima, torna-se evidente que utilizando o presente método de avaliação, pode ser substancialmente avaliado um verdadeiro efeito de fármaco sem um efeito medicamentoso residual após o tratamento com este.

Além disso, um resultado no presente método de avaliação está correlacionado com um resultado obtido pela avaliação no método convencional, descrito no Exemplo comparativo 1, aos 30 dias após o último tratamento. Deste modo, utilizando o presente método de avaliação, pode ser estimado um efeito de um agente antimicrobiano para prevenir uma recaída, através da avaliação inicial após um tratamento. Deste modo, utilizando o

presente método de avaliação, pode ser obtido um tipo de cura completa do agente antimicrobiano sem a recaída.

Pré-tratamento dos Exemplos 4 e 5

[1] Preparação da solução fúngica e produção de um modelo de *tinea unguium* (exemplo de acordo com a presente invenção) e *tinea pedis* em cobaio (exemplo de referência)

Foi preparada uma solução fúngica do mesmo modo que no pré-tratamento do Exemplo Comparativo 1, excepto na alteração da estirpe KD-04 de *Trichophyton mentagrophytes* para a estirpe SM-110 de *Trichophyton mentagrophytes*.

Foi preparado um modelo de *tinea unguium* e *tinea pedis* em cobaio, do mesmo modo que na preparação mencionada acima de modelo interdigital de *tinea pedis* em cobaio, excepto na alteração de cobaios machos da estirpe Hartley com 7 semanas de idade para cobaios machos da estirpe Hartley com 5 semanas de idade e excepto que o disco de papel e o penso foram removidos 21 dias após a infecção em vez de após sete dias após a infecção. A invasão de dermatófitos na pele da planta da pata e placa da unha foi observada 60 dias após a infecção.

[2] Preparação da solução de fármaco e tratamento da *tinea unguium* e *tinea pedis* em cobaio

Como compostos de teste, foram preparadas soluções por dissolução de pós em bruto de KP-103 (exemplo de acordo com a presente invenção), amorolfina (exemplo de referência) e

terbinafina (exemplo de referência) numa concentração de 1% deste numa solução de mistura de polietilenoglicol N°400:etanol (75:25 v/v), respectivamente. Foi preparada uma cápsula de terbinafina por moagem do comprimido comercializado, suspensão uniforme na concentração de 100 mg/mL em Miglyol 812 (disponível da Mitsuba trade Co., Ltd) com homogeneizador de vidro e injeção da suspensão resultante em cada cápsula na concentração de 40 mg/kg, dependendo do peso corporal determinado no dia da administração. Foi aplicada uma solução de KP-103, amorolfina ou terbinafina na quantidade de 0,1 mL na pele da planta da pata e unha de uma pata, uma vez por dia durante 30 dias consecutivos. No caso da cápsula de terbinafina, foi administrada oralmente uma cápsula (40 mg/kg).

EXEMPLO 4

Avaliação do efeito de fármaco em *tinea unguium*

Foi avaliado o efeito em *tinea unguium* através do seguinte método.

Os animais foram sacrificados dois dias após o último tratamento. Foi excisada uma pata posterior e suficientemente limpa com o algodão contendo álcool. Foram excisadas as unhas (três no total) de uma pata posterior e trituradas com tesouras. Foram transferidas para um homogeneizador de vidro e foram homogeneizadas adicionando 4 mL de solução salina tamponada duas vezes concentrada (Sais Tamponados com Fosfatos, disponível de Takara Shuzo Co., Ltd.) contendo tripsina derivada de pâncreas de porco a 4% (disponível da BIOZYME Laboratories Limited). A reacção foi efectuada com agitação a 37 °C durante uma hora.

Após uma centrifugação, o precipitado obtido foi lavado três vezes por centrifugação com solução salina tamponada com fosfatos, de modo a remover a tripsina. O precipitado foi suspenso com 4 mL de água destilada e colocado em membrana de diálise (peso molecular fraccionado: 12000-14000, feita de celulose, disponível de VISKASE SALES Corporation). A diálise foi efectuada em 3 L de água destilada a 4 °C durante 14 dias. A água da diálise foi substituída duas vezes por dia, 28 vezes no total. Após uma centrifugação, foi adicionado 1 mL de solução salina tamponada com fosfatos ao precipitado obtido por remoção do sobrenadante para preparar uma suspensão. Esta suspensão foi definida como solução stock e foi diluída dez vezes. Ao meio de agar com dextrose Sabouraud (20 mL) contendo a substância de antibiótico descrita no Exemplo Comparativo 1, foram adicionados 100 µL da solução stock ou a diluição. Após ter sido efectuado cultivo durante 10 dias, o resultado foi descrito como “negativo para fungos” quando não foi observada nenhuma colónia em todos os meios (limite de detecção: 10 CFU/pata). Foi contado o número de patas negativas para fungos na unha. Quando as colónias surgiram no meio, o número de colónias (CFU) foi contado de modo a calcular o número de colónias na unha de uma pata através da taxa de diluição. Após ter sido efectuado o Teste de Kruskal Wallis para o número de fungos na unha, foi efectuada a comparação múltipla baseada no método de Tukey, para analisar a diferença significativa entre grupos. Esses resultados são mostrados na Figura 3 e foi efectuada a respectiva Tabela 3. Na Figura 3, o número de CFU nas unhas em cada grupo tratado foi representado graficamente e o número médio de CFU foi apresentado por uma linha horizontal e valor numérico.

Utilizando a suspensão mencionada acima, foi determinada a remoção suficiente do fármaco através do presente método de avaliação, do mesmo modo que no Exemplo 2.

EXEMPLO 5 (Exemplo de Referência)

Avaliação do efeito medicamentoso em *tinea pedis*

Foram excisados pedaços de pele da pata posterior de cada animal descrito no Exemplo 4. Foi efectuada a remoção do fármaco e uma determinação do fármaco residual do mesmo modo que no Exemplo 2, excepto a diálise para remoção do fármaco que foi efectuada durante 3 dias e a água da diálise foi substituída seis vezes no total. Confirmou-se uma remoção suficiente do fármaco residual.

Depois, foi avaliado o efeito medicamentoso do mesmo modo que no Exemplo 4 (limite de detecção: 20 CFU/patas). Esses resultados são mostrados na Figura 4 e foi efectuada a respectiva Tabela 4. Na Figura 4, o número de CFU na pele em cada grupo tratado foi representado graficamente e o número médio de CFU foi apresentado pela linha horizontal e valor numérico.

TABELA 3

Substância de teste	O número de patas com unha negativa para fungos/Número total de pés infectados	Número médio de células de fungo na unha (Log CFU $\pm$ SD)
Veículo para utilização		
tópica	0/10	3,70 $\pm$ 0,44
Solução de KP-103	0/10	2,20 $\pm$ 0,56**
Solução de Amorolfina	0/10	3,26 $\pm$ 0,54
Solução de Terbinafina	0/10	3,21 $\pm$ 0,47
Veículo para utilização		
oral	0/10	3,76 $\pm$ 0,67
Preparação oral de terbinafina	0/10	38,0 $\pm$ 0,44
**.: apresenta uma diferença significativa versus o veículo para utilização tópica, o veículo para utilização oral e a preparação oral de terbinafina a um nível de significância de 0,01%.		

Como mostrado na Figura 3 e Tabela 3, não foi observada nenhuma pata com unha negativa para fungos em todos os grupos tratados com a substância testada durante 30 dias. Mas o KP-103 reduziu significativamente o número de células fúngicas na unha como comparado com o veículo para utilização tópica. O seu efeito terapêutico foi significativamente superior à preparação oral da terbinafina. Por outro lado, não foi observado efeito fungicida significativo na amorolfina e terbinafina (para utilização externa, utilização oral), quando comparado com o veículo. Não foi observado o seu efeito terapêutico. Como mencionado acima, foi sugerido que o KP-103 exibia efeito terapêutico em *tinea unguium* por aplicação tópica e que o KP-103 poderá curar a *tinea unguium* mais cedo do que a preparação oral de terbinafina.

TABELA 4

Substância de teste	O número de patas com pele negativa para fungos/Número total de patas infectadas	Número médio de células fúngicas na pele (Log CFU $\pm$ SD)
Veículo para utilização tópica	0/10	4,37 $\pm$ 0,33
Solução de KP-103	10/10 **	< 1,3**
Solução de amorolfina	4/10	1,74 $\pm$ 0,45*
Solução de terbinafina	10/10 **	< 1,3**
Veículo para utilização oral	0/10	3,85 $\pm$ 0,68
Preparação oral de terbinafina	10/10 **	< 1,3**
*: é mostrada uma diferença significativa <i>versus</i> o veículo para utilização tópica para um nível de significância de 0,05%.		
**: é mostrada uma diferença significativa <i>versus</i> o veículo para utilização tópica e o veículo para utilização oral para um nível de significância de 0,01%.		

Como mostrado na Figura 4 e Tabela 4, foi observado um excelente efeito terapêutico em *tinea pedis* em todos os fármacos, KP-103, terbinafina e amorolfina em qualquer um dos casos em que foi avaliado pela taxa de patas negativas para fungos ou pelo número de células fúngicas na pele. Por outro lado, tornou-se evidente que o KP-103 exibe um excelente efeito fungicida em *tinea unguium*, embora a terbinafina e amorolfina não exibam o efeito terapêutico em *tinea unguium*, como mostrado na Figura 3 e Tabela 3.

Como mencionado acima, os fármacos recentemente desenvolvidos com uma actividade extremamente potente contra

Trichophyton in vitro, tal como o lanconazole, são avaliados se forem negativos para fungos, de acordo com o método convencional, independentemente da existência de fungos não tratados na pele, uma vez que o fármaco residual na pele tratada inibe um crescimento de fungos na pele.

Pelo contrário, de acordo com o presente método, pode ser avaliado com precisão um efeito de um agente antimicrobiano, uma vez que um fármaco residual pode ser removido por diálise do local infectado com um microrganismo de animal ou amostra biológica, tal como a pele tratada utilizando uma membrana de diálise. Além disso, embora seja difícil a comparação quantitativa de um efeito antimicrobiano, tal como um efeito antifúngico no método convencional, o presente método de avaliação permite que os efeitos antimicrobianos sejam comparados quantitativamente, uma vez que o número de fungos viáveis no local infectado de um animal ou de uma amostra biológica, tal como a pele, pode ser determinado com precisão. Além disso, o efeito terapêutico baseado no presente método de avaliação reflecte um resultado tal como a recaída, no método convencional e, deste modo, pode ser estimado um efeito para prevenir a recaída, avaliando imediatamente após o tratamento, de acordo com o presente método de avaliação. Deste modo, no presente método de avaliação, pode ser avaliado um verdadeiro efeito de um agente antimicrobiano e é possível seleccionar um agente antimicrobiano com um excelente efeito de esterilização contra fungos *in vivo* ou um agente antimicrobiano do tipo cura completa que não vem acompanhado de recaída. Como mencionado acima, o presente método de avaliação é muito útil como um método para avaliar o agente antimicrobiano.

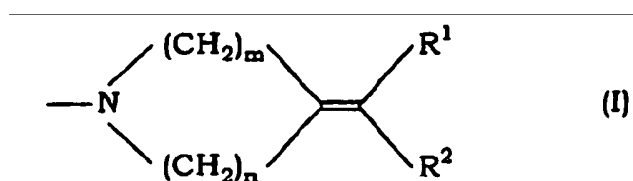
Além disso, na onicomicose é a primeira vez que é possível avaliar um efeito terapêutico contra onicomicose num modelo de *tinea unguium*, através do presente método de avaliação.

Como um resultado da avaliação do efeito terapêutico contra a onicomicose, de acordo com o presente método de avaliação, tornou-se evidente que o KP-103 exibe um excelente efeito terapêutico contra a onicomicose com uma simples aplicação, em que o efeito não é exibido utilizando o agente antifúngico tópico convencional. Deste modo, o KP-103 é um agente benéfico para o tratamento da onicomicose, industrialmente.

Lisboa, 28 de Julho de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Agente terapêutico para utilização no tratamento de onicomíose compreendendo um composto de agente antifúngico com um grupo representado pela fórmula (I):



em que R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e são o átomo de hidrogénio, grupo alquilo C_{1-6} , um grupo arilo não substituído, um grupo arilo substituído com 1 a 3 substituintes seleccionados de um átomo de halogéneo, grupo trifluorometilo, grupo nitro e grupo alquilo C_{1-6} , grupo alcenilo C_{2-8} , grupo alquinilo C_{2-6} ou grupo aralquilo C_{7-12} ,

m é 2 ou 3,

n é 1 ou 2,

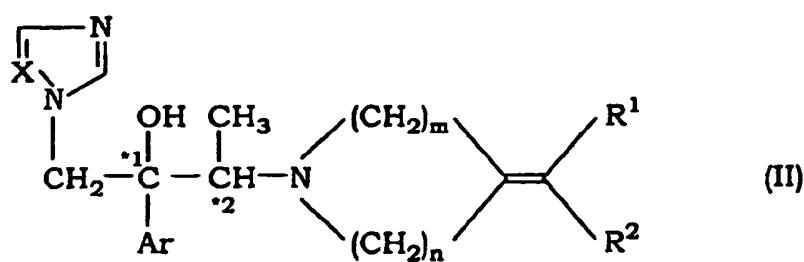
ou um seu sal como um ingrediente activo,

em que o agente terapêutico é para ser administrado topicamente.

2. Utilização de um agente antifúngico, como definido na reivindicação 1, ou um seu sal, para a preparação de um

agente terapêutico para o tratamento de onicomicose, em que o agente terapêutico é para ser administrado topicamente.

3. Agente terapêutico da reivindicação 1 ou utilização da reivindicação 2, no qual o composto é o composto representado pela fórmula (II):



em que Ar é um grupo fenilo não substituído ou um grupo fenilo substituído com 1 a 3 substituintes seleccionados de um átomo de halogéneo e grupo trifluorometilo,

R^1 e R^2 são iguais ou diferentes e são átomo de hidrogénio, grupo alquilo C_{1-6} , um grupo arilo não substituído, um grupo arilo substituído com 1 a 3 substituintes seleccionados de um átomo de halogéneo, grupo trifluorometilo, grupo nitro e grupo alquilo C_{1-6} , grupo alcenilo C_{2-8} , grupo alquinilo C_{2-6} ou grupo aralquilo C_{7-12} ,

m é 2 ou 3,

n é 1 ou 2,

X é um átomo de azoto ou CH, e

*1 e *2 significam um átomo de carbono assimétrico.

4. Agente terapêutico ou utilização da reivindicação 3, na qual o composto representado pela fórmula (II) é (2R,3R)-2-(2,4-difluorofenil)-3-(4-metilenopiperidina-1-il)-1-(1H-1,2,4-triazole-1-il)butano-2-ol.

Lisboa, 28 de Julho de 2009

FIG. 1(a)

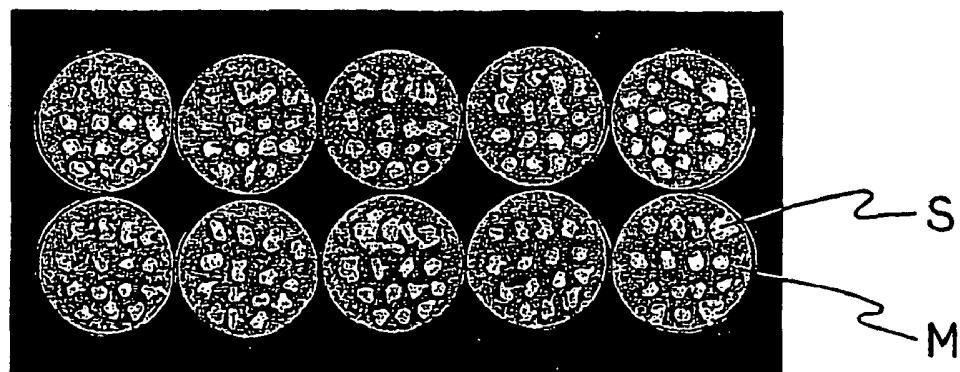


FIG. 1(b)

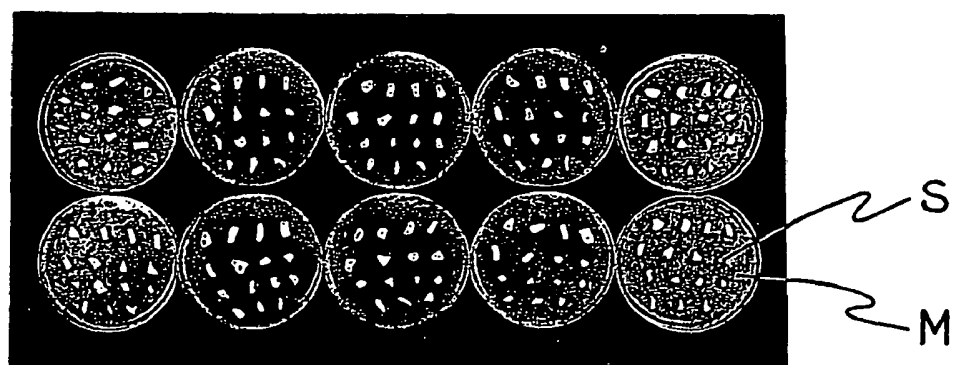


FIG. 1(c)

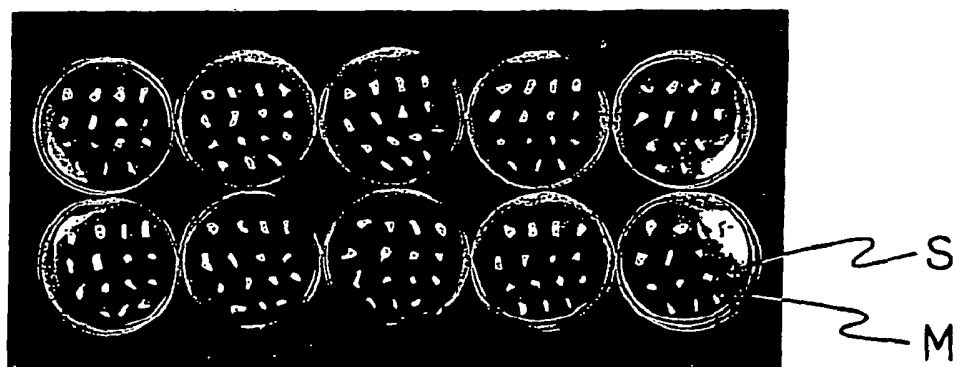


FIG. 2(a)

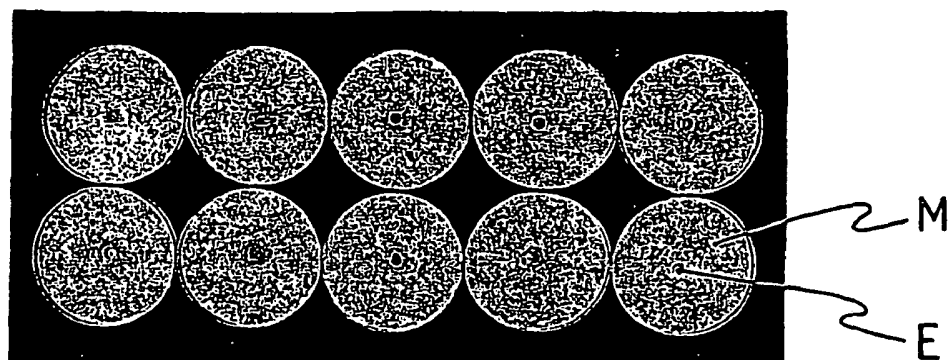


FIG. 2(b)

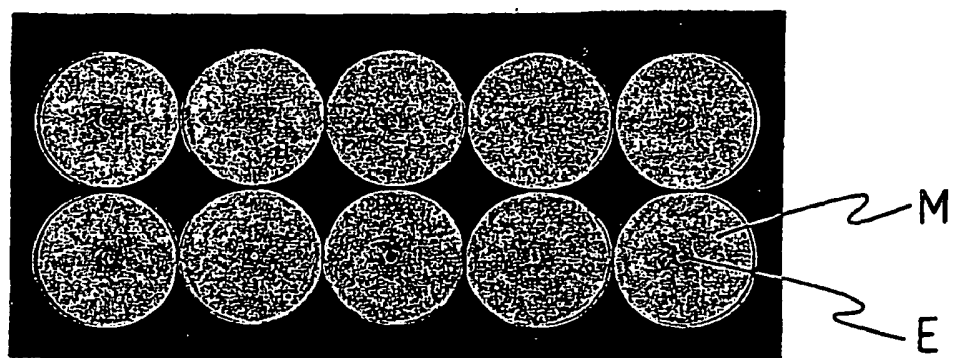
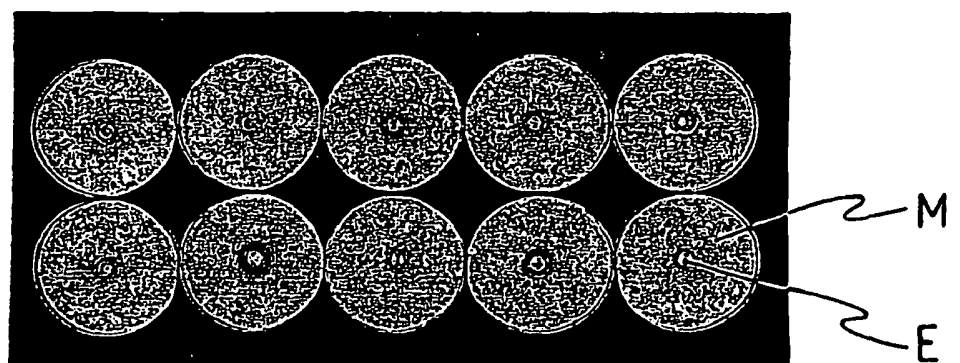


FIG. 2(c)



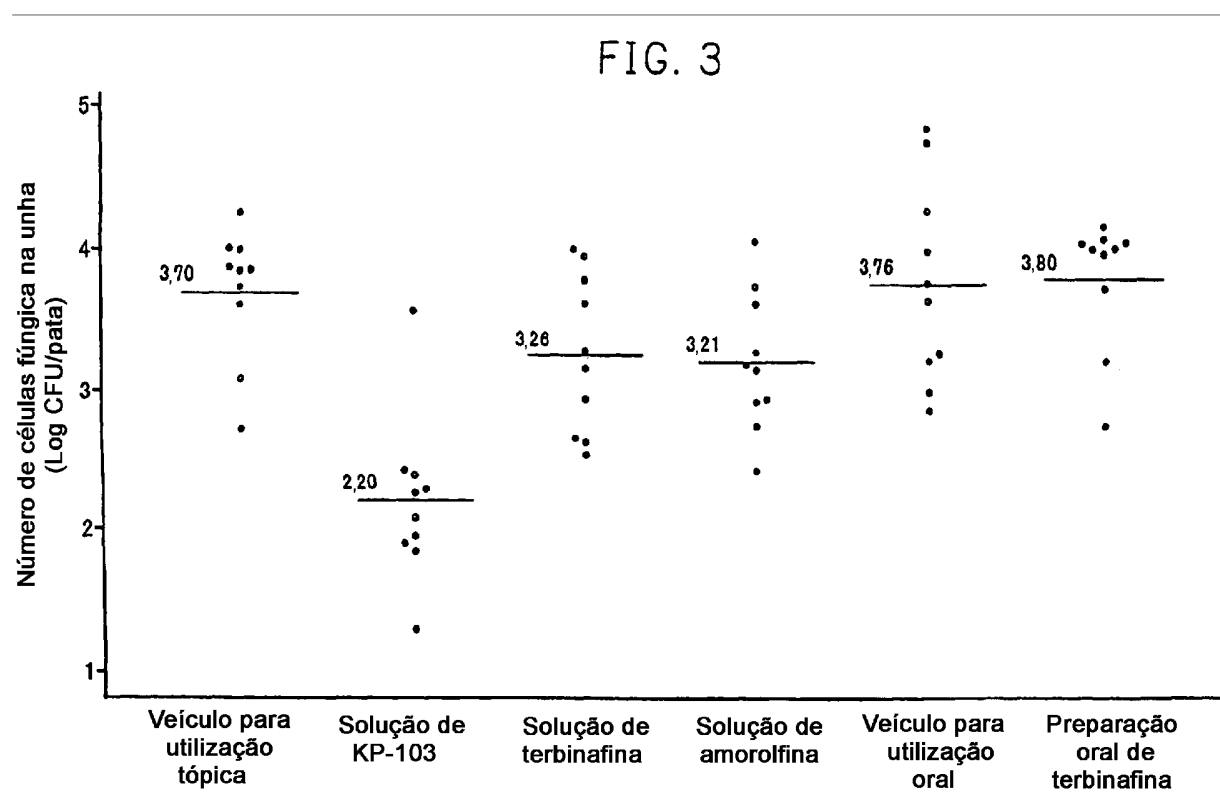


FIG. 4

