

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 859 518**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014** **E 19153995 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020** **EP 3501498**

54 Título: **Composición y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

25.09.2013 GB 201317005

25.11.2013 GB 201320723

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

04.10.2021

73 Titular/es:

BLUEBERRY THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)

The Biohub, Alderley Park, Alderley Edge

Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB

72 Inventor/es:

RIDDEN, JOHN;

DAVIES, MICHAEL y

GOOD, LIAM

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 859 518 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y métodos de tratamiento

Campo Técnico de la Invención

- 5 La invención se refiere a una composición de nanopartículas tópica (y a métodos de producir composiciones de este tipo) para el tratamiento de una infección fúngica en las uñas o la piel que comprende polihexametileno biguanida (PHMB) y un agente antifúngico.

Antecedentes de la Invención

- 10 Las infecciones fúngicas son cada vez más comunes tanto en seres humanos como en animales, sin embargo, el tratamiento de infecciones de este tipo sigue siendo problemático debido a la toxicidad de las composiciones antifúngicas, la escasa solubilidad de composiciones de este tipo y la ubicación remota de algunas infecciones que pueden resultar difíciles de alcanzar utilizando formulaciones medicinales tradicionales.

- 15 Un amplio espectro de antifúngicos, tales como anfotericina B, hamicina, filipina y nistatina se descubrieron en los años 60. Pero debido a la toxicidad, solo la hamicina y la nistatina se utilizan tópicamente y la anfotericina B sistémicamente. Un gran avance en la terapia antifúngica fue la introducción de azoles, especialmente ketoconazol. Las principales clases de antifúngicos que se utilizan actualmente son polienos, azoles alil aminas, lipopéptidos y pirimidinas. Sin embargo, los polienos son tóxicos para las células de mamíferos. Los azoles son bien tolerados por vía tópica, pero tienen efectos secundarios cuando se administran sistémicamente y ha habido varios informes de resistencia a los azoles. La flucitosina es la pirimidina que se utiliza con más frecuencia. Si bien tiene una excelente penetración en los tejidos, la resistencia a la flucitosina puede desarrollarse rápidamente y producir efectos secundarios gastrointestinales. Los lipopéptidos muestran una baja toxicidad y todavía se están realizando varios ensayos para probar la eficacia.

- 20 El desarrollo de nuevos antifúngicos está limitado porque los hongos son dianas eucarióticas y celulares y si se interrumpen también pueden dañar las células huésped. El aumento de las infecciones fúngicas y el aumento en el uso de antifúngicos ha resultado en la aparición de resistencias entre los hongos. La resistencia antifúngica tiene un alto impacto clínico, ya que las enfermedades fúngicas están provocando un aumento de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes inmunodeprimidos.

- 25 Se estima que alrededor del 40% de los medicamentos recién descubiertos fallan debido a la falta de un correcto suministro debido a problemas de solubilidad acuosa. En el caso del suministro tópico de fármacos, las propiedades de barrera de la piel requieren a menudo potenciadores de la permeación para alcanzar la dosis requerida de fármacos.

- 30 La onicomicosis (más comúnmente conocida como infección fúngica en las uñas) hace que las uñas se engrosen, decoloren, desfiguren y se partan. Sin tratamiento, las uñas pueden volverse tan gruesas que presionan contra el interior de los zapatos, provocando presión, irritación y dolor. Existen riesgos de complicaciones adicionales, especialmente en pacientes con diabetes, aquellos con enfermedad vascular periférica y el paciente inmunodeprimido. La infección fúngica en las uñas puede provocar problemas psicológicos y sociales. La incidencia de la infección fúngica en las uñas aumenta con la edad y tiene una prevalencia del ~30% de los mayores de 60 años con una incidencia significativa en Europa y con niveles aún más altos en Asia. La infección fúngica en las uñas puede afectar a una o más uñas de los pies y/o uñas de los dedos de la mano y puede destruir completamente la uña si no se trata.

- 35 El tratamiento actual para la infección fúngica en las uñas es como una laca/pintura tópica de las uñas (tal como amorolfina) 1-2 veces por semana durante 6-12 meses y/o antifúngicos orales (tales como terbinafina o itraconazol). Los antifúngicos orales pueden tener efectos secundarios graves, tales como malestar gastrointestinal e incluso pueden provocar insuficiencia hepática. En el 25-50% de los casos se informa comúnmente de una recaída y muchos pacientes no se comprometen con el curso del tratamiento debido a los efectos secundarios previstos y la duración del tiempo de tratamiento y, a menudo, solo cuando la enfermedad se vuelve más agresiva, comenzarán el tratamiento. Los tratamientos orales o tópicos actuales pueden tardar entre 6-12 meses en funcionar. Los tratamientos orales tienen que saturar la circulación sistémica para llegar a los dedos de los pies y dosis incrementadas aumentan el riesgo de complicaciones gastrointestinales y hepáticas. Los tratamientos tópicos son ineficaces para penetrar en la uña engrosada y nuevamente requieren una dosis alta.

- 40 El pie de atleta (de otro modo conocido como tiña del pie, Tinea pedis o el pie mocaín) es una infección fúngica de la piel generalmente provocada por hongos del género *Trichophyton* (más comúnmente *T. rubrum* o *T. mentagrophytes*). Los diversos hongos parásitos que provocan el pie de atleta también pueden provocar otras infecciones de la piel, tales como onicomicosis y Tinea cruris. Si bien es distinto de la infección fúngica de las uñas, el pie de atleta también tiene problemas con el cumplimiento y la duración del tratamiento.

La aspergilosis es provocada por una infección de los pulmones provocada por hongos *Aspergillus*. La infección está implicada en un cierto número de afecciones, tales como la tuberculosis y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

La infección a menudo puede ser difícil de tratar, incluso cuando se utiliza un enfoque de terapia combinada. Cada vez más, las infecciones por *Aspergillus* son resistentes a los triazoles.

5 La queratitis fúngica es la inflamación de la córnea provocada por una infección fúngica. La suspensión oftálmica de natamicina se utiliza a menudo para las infecciones por hongos filamentosos, mientras que la solución oftálmica de fluconazol se recomienda para las infecciones por *Candida*. Las gotas para los ojos de anfotericina B se utilizan para casos difíciles de tratar, sin embargo, estas gotas para los ojos pueden ser tóxicas en un individuo.

La candidiasis oral es una infección fúngica de las membranas mucosas de la boca por especies de *Candida*. Puede ser particularmente problemática en pacientes inmunodeficientes en donde a menudo es difícil de tratar con éxito.

10 Un objeto de la presente invención es abordar uno o más de los problemas anteriores asociados con los tratamientos anti-fúngicos actuales. También es un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento anti-fúngico tópico. Adicionalmente, es un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento que permita una mejor penetración del agente antifúngico a través de un cierto número de tejidos corporales, tales como las uñas y/o la dermis, las membranas mucosas y la córnea y/o la esclerótica.

15 GERIT D MULDER ET AL, (2007) "Polyhexamethylene Biguanide (PHMB): An Addendum to Current Topical Antimicrobials", páginas 1 - 11, describe un cierto número de usos para polihexametileno biguanida (PHMB).

W. BEHRENS-BAUMANN ET AL, (2012) "Keratitis", OPHTHALMIC RESEARCH, vol. 48, n° 4, páginas 171-176, es un informe de una serie de tres pacientes con queratitis por *Fusarium* relacionada con lentes de contacto blandas, dos de los cuales fueron tratados con polihexametileno biguanida (PHMB) en combinación con fármacos antifúngicos.

20 El documento US2007/0249546 describe concentrados y soluciones acuosas para aplicación tópica que comprenden aditivos o agentes antifúngicos, así como para la preparación y el uso de concentrados y soluciones de este tipo. Más específicamente, la invención se refiere a la preparación y al uso de soluciones que entran en contacto con los párpados y/o los ojos, tales como, pero no limitados a soluciones para lentes de contacto, soluciones acuosas de enjuague oftálmico y exfoliantes quirúrgicos acuosos para uso oftálmico.

25 El documento US2010/0021530 describe un sistema y un método para suministrar un agente anti-infeccioso a través de las uñas de un sujeto que tiene una infección en las uñas. El sistema puede comprender un mecanismo de suministro de fármacos que comprende un agente anti-infeccioso y un elemento calefactor y un mecanismo de retención para unir de forma liberable el mecanismo de suministro de fármacos al dedo que tiene la uña infectada.

30 El documento US2008/0312610 describe un dispositivo que es adecuado para suministrar al menos una nanopartícula a un sujeto. El dispositivo se puede utilizar para suministrar una diversidad de nanopartículas, por ejemplo, agentes terapéuticos, directamente a través de las capas externas de la piel sin pasar completamente a través de la epidermis del sujeto.

Sumario de la Invención

35 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición de nanopartículas tópica para uso en el tratamiento de una infección fúngica en las uñas o la piel que comprende polihexametileno biguanida (PHMB) y un agente antifúngico.

40 Mediante la formación de nanopartículas a partir de polihexametileno biguanida (PHMB) y agentes antifúngicos, los autores de la invención han encontrado ventajosamente que, los agentes antifúngicos son absorbidos por las células de manera mucho más eficiente y, por lo tanto, se pueden formular en un medicamento tópico que tiene no sólo un perfil de liberación más lenta, sino también una dosis terapéutica reducida que puede suministrarse localmente en lugar de sistémicamente, eliminando así el peligro de algunos agentes antifúngicos administrados por vía oral. Al combinar un sistema seguro de suministro de nanopolímeros con un potente agente antifúngico, se puede proporcionar un tratamiento tópico que puede mejorar la eficacia y reducir potencialmente los plazos de tratamiento actuales para infecciones de 6 meses a 6 semanas.

45 La expresión "composición tópica" pretende dar a entender una composición que es (o puede ser) aplicada a una superficie exterior de la superficie del cuerpo, tal como la piel, las uñas, los ojos, los bronquiolos, las membranas de las mucosas, la boca y el tracto gastrointestinal.

50 El término "nanopartícula" pretende dar a entender una estructura que tiene un diámetro medio en el intervalo aproximado de 0,5 - 200 nm. Preferiblemente, las nanopartículas estarán en el intervalo de 1 a 150 nm, más preferiblemente en el intervalo de 2 a 120 nm y lo más preferiblemente de 5 a 120 nm. En algunos casos, se prefiere que las nanopartículas estén en un intervalo superior de alrededor de 100 a 120 nm, más preferido en el intervalo de 50 a 175 nm, incluso más preferido en el intervalo de 75 a 150 nm y lo más preferido en el intervalo de 110 a 140 nm. En otros casos, se prefiere que las nanopartículas estén en un intervalo inferior de 0,5 a 10 nm, más preferido en el intervalo de 0,5 a 8 nm, incluso más preferido de 1 a 7 nm y lo más preferido aproximadamente de 7 nm o menos. La

expresión "agente antifúngico" pretende cubrir una gama de compuestos y moléculas que son capaces de inhibir el crecimiento y/o la supervivencia de hongos que provocan una infección fúngica.

Polímero	Número CAS
Hidrocloruro de polihexametileno biguanida (PHMB)	27083-27-8 32289-58-0

Números CAS para PHMB

- 5 Las nanopartículas pueden formarse con la presencia del agente antifúngico. Se pueden utilizar diversos métodos para formar las nanopartículas y se prevé que las nanopartículas se formen como un polímero y un complejo de agente antifúngico. Sin embargo, las nanopartículas de polímero pueden formarse independientemente y luego incubarse con el agente antifúngico de modo que se absorba o se fije a las nanopartículas de tal manera que conserve su eficacia contra los hongos.
- 10 En una realización de la presente invención, un agente antifúngico que habitualmente se administra sistémicamente está presente en una cantidad de dosificación dentro de la composición que es menor que la dosis sistémica terapéuticamente eficaz del agente antifúngico. Como la composición tópica puede administrar más eficazmente el agente antifúngico en el sitio de la infección, se puede reducir la dosis y esto puede reducir los posibles problemas toxicológicos con algunos agentes.
- 15 Resultará evidente para el destinatario experto que la composición puede comprender, además, uno o más de los siguientes componentes: tampones, excipientes, aglutinantes, aceites, agua, emulsionantes, glicerol, antioxidantes, conservantes y fragancias o cualquier componente adicional que habitualmente se encuentran en cremas y ungüentos tópicos. Además, la composición podría estar en un cierto número de formas, tales como una pasta o suspensión para su uso con un dispositivo de pulverización o podría formularse para su uso junto con un sistema de suministro de matriz de micro-agujas. Si se emplea una matriz de micro-agujas, entonces ésta puede incorporarse a un parche adhesivo.
- 20 Para determinadas aplicaciones, la composición puede comprender adicionalmente un agente de penetración con el fin de permitir el suministro del agente antifúngico a la zona infectada. Por ejemplo, la urea se puede utilizar para permitir que las nanopartículas rompan la uña de un individuo que padece una infección fúngica en la uña, en que la infección está debajo o en la propia uña.
- 25 La composición de la invención también puede administrarse por vía intranasal o por inhalación y se puede suministrar convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de pulverización de aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano, tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, la bomba, el pulverizador o el nebulizador puede contener una solución o suspensión de la composición, p. ej., utilizando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, p. ej., trioleato de sorbitán. Se pueden formular
- 30 cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador para que contenga una mezcla en polvo de la composición de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- 35 Formulaciones de aerosol o polvo seco se disponen preferiblemente de modo que cada dosis medida o "inhalación" contenga al menos 1 µg de la composición para el suministro al paciente. Se apreciará que la dosis diaria total con un aerosol variará de un paciente a otro y puede administrarse en una sola dosis o, más habitualmente, en dosis divididas a lo largo del día.
- 40 Alternativamente, la composición de la invención se puede administrar en forma de un supositorio o pesario, o pueden aplicarse tópicamente en forma de una loción, solución, crema, ungüento o polvo espolvoreable. La composición de la invención también se puede administrar por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo. También puede administrarse por vía ocular, particularmente para tratar enfermedades del ojo.
- 45 Para uso oftálmico, la composición de la invención puede formularse utilizando sistemas de nanopartículas o en forma de suspensiones micronizadas en solución salina estéril, isotónica y ajustada al pH o, preferiblemente, como soluciones salina estéril, isotónica y ajustada al pH, opcionalmente en combinación con un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Alternativamente, pueden formularse en un ungüento tal como vaselina.
- 50 Para la aplicación tópica a la piel, la composición de la invención puede formularse como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de lo siguiente: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuesto de polioxietileno y polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, se pueden formular como una loción o crema adecuada, suspendidas o

disueltas, por ejemplo, en una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

5 La composición tópica arriba descrita en esta memoria puede utilizarse para tratar un cierto número de infecciones fúngicas. Sin embargo, es especialmente adecuada para tratar la infección fúngica en las uñas, el pie de atleta u otros tipos de infecciones cutáneas por hongos / dermatofitos (tales como tiña inguinal (*Tinea cruris*), tiña corporal (*Tinea corporis*), tiña de la cabeza (*Tinea capitis*), otras infecciones de tipo "tiña"). La invención también será adecuada para tratar infecciones por levaduras, tales como, pero no limitadas a intertrigo, pitiriasis versicolor y aftas (*Candida albicans*).

10 El agente antifúngico empleado será, por supuesto, en gran medida gobernado por su eficacia contra los hongos que provocan la infección. El agente antifúngico puede comprender uno o más agentes seleccionados del siguiente grupo: nistatina, terbinafina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina.

La infección fúngica puede comprender una infección por dermatofitos. Sin embargo, la presente invención también se puede utilizar para tratar infecciones y/o colonización por levaduras.

15 En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un medicamento tópico que comprende una combinación de nanopartículas de polihexametileno biguanida y un agente antifúngico para el tratamiento de una infección fúngica.

20 También se proporciona el uso de polihexametileno biguanida (PHMB) para formar una o más nanopartículas con, o asociados con, un agente antifúngico en la preparación de un medicamento tópico. Las nanopartículas se utilizarán como el vehículo de suministro del agente antifúngico en una zona infectada y también forman un efecto sinérgico cuando se tratan infecciones por hongos. Resultará evidente para el destinatario experto que el uso de PHMB será para formar una composición como la arriba descrita en esta memoria con referencia al primer aspecto de la invención.

25 De acuerdo con aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para producir una composición de nanopartículas tópica para uso en el tratamiento de una infección fúngica, que comprende mezclar PHMB con uno o más agentes antifúngicos en condiciones adecuadas para permitir la formación de nanopartículas, en donde el agente antifúngico comprende uno o más agentes seleccionados del siguiente grupo: nistatina, terbinafina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina. De nuevo, resultará evidente que el método se empleará para producir una composición tal como se describe arriba en esta memoria.

30 En aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una combinación de una composición que comprende un polímero capaz de formar nanopartículas y un agente antifúngico y una matriz de micro-agujas para uso en el tratamiento de una infección fúngica de las uñas. La matriz de micro-agujas puede incorporarse en un parche adhesivo. Las micro-agujas pueden tener menos de 2 mm de longitud. Más preferiblemente, las micro-agujas tienen menos de 1,5 mm de longitud. Lo más preferiblemente, las micro-agujas tienen menos de 1 mm de longitud. Preferiblemente, se insertan en la piel menos de 500 µm de las micro-agujas. Más preferiblemente, se insertan en la piel menos de 400 µm de las micro-agujas. Lo más preferiblemente, se insertan en la piel aproximadamente 300-200 µm de las micro-agujas. Preferiblemente, las micro-agujas administran la composición a la dermis y/o epidermis.

Descripción Detallada de la Invención

Se describirán ahora realizaciones de la presente invención, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los siguientes experimentos y figuras que se acompañan, en los cuales:

40 La Figura 1 es un gráfico que muestra la reducción de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de antifúngicos contra *Saccharomyces cerevisiae EBY100*, cuando se combinan con PHMB. Los cuadrados negros representan la MIC de fármaco solo y los círculos negros representan la MIC de fármaco cuando se combinan con PHMB. La reducción de la MIC de cada uno de los fármacos es: nistatina - 2 veces, anfotericina B - 4 veces, berberina - 2 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina - 8 veces;

45 la Figura 2 es un gráfico que muestra la MIC de antifúngicos contra *Saccharomyces cerevisiae NOD 24*, cuando se combinan con PHMB. Los cuadrados negros representan la MIC de fármaco solo y los círculos negros representan la MIC de fármaco cuando se combinan con PHMB. La reducción de la MIC de cada uno de los fármacos es: nistatina - 4 veces, anfotericina B - 16 veces, berberina - 16 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina - 16 veces;

50 la Figura 3 es un gráfico que muestra la reducción de la MIC de los antifúngicos contra *Candida albicans*, cuando se combinan con PHMB. Los cuadrados negros representan la MIC del fármaco solo y los círculos negros representan la MIC del fármaco cuando se combinan con PHMB. El múltiplo de reducción de la MIC de cada uno de los fármacos es: nistatina - 2 veces, anfotericina B - 2 veces, berberina - 2 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina 4 veces;

las Figuras 4A - 4E son gráficos que muestran los cambios en la fluorescencia / absorbancia de los agentes antifúngicos cuando se combinan con PHMB. Se testaron los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de compuestos fluorescentes en presencia y ausencia de PHMB. La fluorescencia de ketoconazol (Fig. 4A), anfotericina B (Fig. 4B), berberina (Fig. 4C) y nistatina (Fig. 4D) disminuyó (extinción de la fluorescencia). Se testaron los cambios en la absorbancia de terbinafina en presencia y ausencia de PHMB y se encontró que estaban incrementados (efecto hipercrómico) (Fig. 4E);

la Figura 5 (a) y (b) son gráficos que muestran la distribución de tamaño de las partículas formadas, testadas utilizando la dispersión dinámica de luz. La Figura 5 (a) muestra la distribución del tamaño de partículas (tamaño promedio = $22,22 \pm 1,591$ nm) formadas cuando se combinó berberina con PHMB en la relación 1:3, mientras que la Figura 5 (b) muestra la distribución del tamaño de las partículas formadas cuando se combinó ketoconazol con PHMB en la relación 1:3. Tamaño promedio del pico 1 = $1,15 \pm 0,017$, tamaño promedio del pico 2 = $5,88 \pm 0,71$ y tamaño promedio del pico 3 = $498,9 + 65,2$;

la Figura 6 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de *C. albicans* que muestran un suministro potenciado de berberina cuando se combina con PHMB. A = *C. albicans* sin tratar teñida con DAPI, por lo que el núcleo es azul. B = *C. albicans* tratado con 1 µg/ml de berberina sola que muestra fluorescencia verde dentro del citoplasma debido al suministro de una pequeña cantidad de berberina. C = *C. albicans* tratada con 1 µg/ml de berberina y 1,25 µg/ml de PHMB que muestra una fluorescencia verde potenciada del citoplasma que indica un suministro incrementado de berberina. Bar = 5 µm;

la Figura 7 es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células de *C. albicans* berberina positivas cuando se tratan con berberina sola y con una combinación de berberina y PHMB. El % de células se representa como media de triplicados \pm DE. Esta cifra indica que a medida que aumenta la concentración de PHMB de 1,25 a 5 µg/ml hay un aumento en el suministro a las células. Para cada una de las concentraciones de berberina, las columnas son las siguientes: berberina sola, 1,25 µg/ml de PHMB; 2,5 µg/ml de PHMB; y 5 µg/ml de PHMB;

la Figura 8 es un gráfico que muestra el tamaño / la concentración de nanopartículas de nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

la Figura 9 es un gráfico que muestra el tamaño de las nanopartículas / la intensidad relativa de las nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

la Figura 10 es un gráfico que muestra el tamaño de las nanopartículas / la intensidad relativa en 3D de las nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

la Figura 11 es un diagrama de vista en planta de un dedo con una uña que se ha de tratar con un parche de micro-agujas para suministrar la composición de la presente invención;

la Figura 12 es un diagrama en sección transversal de un dedo como se muestra en la Figura 11; y

la Figura 13 es un diagrama en sección transversal de un parche de micro-agujas.

El objetivo de los siguientes experimentos fue investigar si el suministro celular de antifúngicos podría potenciarse utilizando un sistema de suministro basado en la nanotecnología con un polímero catiónico de polihexametileno biguanida (PHMB). Los experimentos también exploraron una nueva estrategia de combinar antifúngicos con PHMB que pueden formar nanopartículas con moléculas pequeñas. PHMB es un desinfectante y antiséptico económico y fácilmente disponible que se utiliza comúnmente en apósitos, piscinas y soluciones para lentes de contacto. Se cree que su acción antiséptica actúa alterando las membranas celulares de los organismos y provocando con ello la fuga del contenido celular. Los experimentos también evaluaron si la combinación de un agente antifúngico y PHMB permitiría una reducción en la dosis del fármaco, reduciendo así la toxicidad y/o incrementando la internalización del fármaco como agente y si existía algún efecto sinérgico.

Los experimentos se centraron en antifúngicos que tienen dianas intracelulares de acción antifúngica y que se utilizan actualmente en las clínicas, pero son menos preferidos debido a problemas de solubilidad, toxicidad y resistencia. Junto con los antifúngicos utilizados clínicamente, también se estudió un nuevo candidato, la berberina, con actividad antifúngica *in vitro* probada (Zhao *et al.*, (2010) *J. Therm. Analysis and Calorimetry*, 102, 49-55). Los candidatos seleccionados se ilustran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Fármacos	Clase	Mecanismo de acción	Razones para la selección	Usos actuales
Nistatina	Polieno	Se une al ergosterol y provoca perturbaciones en la membrana celular al provocar la fuga de contenido celular.	Acción intracelular y toxicidad a dosis elevadas	Infecciones por <i>Candida albicans</i> , coadyuvante en el tratamiento de la dermatitis
Anfotericina B			Acción intracelular, resistencia, toxicidad a dosis elevadas y alta masa molecular evitando la penetración en la piel	Infecciones fúngicas sistémicas, infecciones cutáneas por <i>Candida sp.</i>
Terbinafina	Alil amina		Acción intracelular, menos eficaz contra la levadura común, por lo que se utiliza en combinación con azoles (Kontoyiannis y Lewis, 2002)	Infecciones fúngicas en perros que afectan las garras de las patas delanteras o traseras, utilizadas contra <i>Malassezia sp</i> e infecciones por dermatofitos
Ketoconazol	Azol	Inhibe la enzima 14- α -esterol-desmetilasa del citocromo P450	Acción intracelular, resistencia y alta masa molecular evitando la penetración en la piel	Tratamiento sistémico de la otitis y contra <i>Malassezia sp</i> <i>Candida sp</i> <i>Microsporium canis</i> y Aspergilosis
Berberina	Alcaloide	Desconocido	Acción intracelular, potencial nuevo candidato como antifúngico	No se utiliza clínicamente como antifúngico.

- 5 Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de un aislado clínico de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* NOD 24 y *S. cerevisiae* EBY 100 a la combinación del agente antifúngico y PHMB utilizando un ensayo de tablero de ajedrez. También se evaluó la interacción entre los fármacos y PHMB, la formación de nanopartículas y la captación celular.

Antifúngicos

- 10 Nistatina, terbinafina, ketoconazol y berberina se obtuvieron como polvo de Sigma-Aldrich, Reino Unido. Anfotericina B se obtuvo de Sigma como solución en agua desionizada. Dimetilsulfóxido (DMSO) también era de Sigma. Se prepararon en DMSO soluciones madre de nistatina (5 mg/ml), terbinafina (15 mg/ml), ketoconazol (5 mg/ml) y anfotericina B (0,2 mg/ml). Se disolvió berberina en agua para preparar una solución madre de 10 mg/ml. También se preparó una solución madre de PHMB (5 mg/ml) en agua. Todas las soluciones madre se prepararon en diferentes partes alícuotas de 500 μ l, se mantuvieron a -20°C y se protegieron de la luz.

Cepas

- 15 Se estudiaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y un material aislado clínico de la *Candida albicans*. *S. cerevisiae* NOD 24 se obtuvo de Royal Veterinary College y *S. cerevisiae* EBY 100 de Allinson Bread®, Reino Unido. El material aislado clínico de *C. albicans* también se obtuvo de Royal Veterinary College.

Medios

- 20 Medio RPMI 1640 se obtuvo en forma de polvo y se disolvió en agua destilada y se tamponó con ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) 0,165M de acuerdo con un procedimiento estándar. El pH se ajustó a 7 utilizando una solución de hidróxido de sodio 1M. Se obtuvo agar de glucosa de Sabouraud (SGA) en forma de polvo. Todos los medios y productos químicos eran de Sigma-Aldrich, Reino Unido.

Preparación del inóculo

- 25 Inóculo de levadura se preparó recogiendo cinco colonias de cultivo cultivadas durante 24 h en SGA y mezclando en RPMI 1640 con MOPS. La densidad óptica de la mezcla se ajustó espectrofotométricamente a 1, que es equivalente

a 3×10^7 Unidades Formadoras de Colonias de levadura/ml. Esta suspensión se diluyó adicionalmente en RPMI 1640 con MOPS para dar el tamaño del inóculo final de $0,5 \times 10^4$ UFC/ml.

Test de titulación de tablero de ajedrez

El test de titulación de tablero de ajedrez se llevó a cabo en placas estériles de 96 pocillos según el procedimiento estándar recomendado por CLSI para testar el efecto antifúngico de fármacos solos y en combinación con PHMB. Se utilizó medio RPMI 1640 tamponado con MOPS como medio de ensayo. Se prepararon diluciones de fármaco como medio de ensayo si la solución madre se preparó en DMSO y en el caso de soluciones madres preparadas en agua, las diluciones adicionales de fármaco se hicieron en el propio agua. Las concentraciones testadas fueron: nistatina $0,000039$ mg/ml a $0,02$ mg/ml, anfotericina B $0,032$ mg/ml a $0,0000625$ mg/ml, berberina $0,01$ mg/ml a $0,00002$ mg/ml, ketoconazol $0,032$ mg/ml a $0,0000625$ mg/ml y terbinafina $0,16$ mg/ml a $0,00031$ mg/ml. El control del crecimiento y el control de la esterilidad estuvieron presentes en todas las placas. Todas las placas se prepararon por triplicado.

Incubación y cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) e Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FICI)

Las placas se sellaron con papel de parafina para evitar la evaporación y se mantuvieron a 37°C para *C. albicans* y a 30°C para *S. cerevisiae*. La MIC se registró visualmente, con la ayuda del espectrofotómetro universal de microplacas Powerwave 340 (Biotek) después de 24 horas para *C. albicans* y *S. cerevisiae* NOD 24. Pero se registró después de 48 horas para *S. cerevisiae* EBY 100, ya que no hubo crecimiento incluso en los pocillos de control de crecimiento después de 24 h. La MIC se definió como la concentración más baja a la que no hay crecimiento visible. El FICI se utilizó para analizar las interacciones farmacológicas *in vitro* y se calculó utilizando la ecuación que se indica a continuación:

$$\text{FICI} = \frac{\text{MIC de fármaco en combinación}}{\text{MIC de fármaco solo}} + \frac{\text{MIC de PHMB en combinación}}{\text{MIC de PHMB solo}}$$

Los valores FICI fueron interpretados de acuerdo con patrones recomendados ($\text{FICI} \leq 0,5$ es 'efecto sinérgico', $> 0,5$ pero ≤ 4 es 'sin interacción' y > 4 es 'efecto antagonista').

Estudios de Fluorescencia y Absorbancia

La interacción de antifúngicos fluorescentes con PHMB se testó con fluorimetría. Se permitió que una concentración específica de cada uno de los fármacos interactuara con diferentes concentraciones de PHMB y se estudiaron los cambios en la intensidad de la fluorescencia. El experimento se llevó a cabo en placas de cuarzo de fondo plano de 96 pocillos. Se mezclaron 150 $\mu\text{g/ml}$ de berberina, 5 $\mu\text{g/ml}$ de ketoconazol y 5 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina B con PHMB en relaciones p/p de $1:0$ a $1:10$. Se mezclaron 50 $\mu\text{g/ml}$ de nistatina con PHMB en relaciones p/p de $1:0$ a $1:4$. En el caso de terbinafina, que no es fluorescente, se estudiaron los cambios en la absorbancia. Se mezclaron 10 $\mu\text{g/ml}$ de terbinafina con PHMB en relaciones p/p de $1:0$ a $1:5$. Se prepararon soluciones a partir de materiales en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para todos los fármacos excepto para berberina, para la que se utilizó agua a medida que precipitaba en PBS a la concentración. La mezcla se combinó minuciosamente pipeteando y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se ensayó para determinar el cambio en la fluorescencia/absorbancia. La fluorescencia se testó en el fluorómetro Infinite M200 Pro (Tecan). Los ensayos de la intensidad de fluorescencia, la excitación y la longitud de onda de emisión fueron 320 nm y 410 nm para nistatina, 340 nm y 480 nm para anfotericina B, 350 nm y 550 nm para berberina, 260 nm y 375 nm para ketoconazol, respectivamente. En el caso de terbinafina, los cambios en la absorbancia se estudiaron utilizando un espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop). El pico de absorbancia de terbinafina fue de 272 nm. Los cambios en la absorbancia máxima a 272 nm se representaron frente a la concentración de PHMB.

Formación de partículas y determinación del tamaño de partículas

Se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS) para estimar el tamaño de los complejos formados. Se basa en el principio de que midiendo la luz dispersa de las partículas en movimiento se puede determinar su tamaño. Se mezclaron a fondo antifúngicos (100 $\mu\text{g/ml}$) y PHMB en una relación p/p $1:3$ en PBS y se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente. El tamaño de partícula se determinó utilizando un aparato Zetasizer S (Malvern instruments, Reino Unido).

Microscopía

El suministro celular de berberina se detectó visualmente, ya que el compuesto es lo suficientemente fluorescente como para ser detectado por microscopía. Células de *C. albicans* se trataron con berberina sola y también con combinaciones de berberina y PHMB. Se mezclaron adecuadamente 50 μl de 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ y 3 $\mu\text{g/ml}$ de soluciones de berberina con 50 μl de 1 $\mu\text{g/ml}$ y $2,5$ $\mu\text{g/ml}$ de PHMB en placas estériles de 96 pocillos pipeteando 3-4 veces y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 100 μl de células de *C. albicans* en RPMI 1640 a

estos pocillos, a 100 µl de soluciones de berberina sola y a 100 µl de PBS y se mantuvieron a 37°C durante 1 hora. El contenido de cada uno de los pocillos se transfirió a tubos Eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. Después de eliminar el sobrenadante, se añadieron 100 µl de 2,5 µg/ml de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) a cada uno de los tubos para teñir el núcleo de los hongos. Los portaobjetos se prepararon en un lecho de agarosa y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia vertical DM4000 (Leica microsystems) utilizando lentes de inmersión en aceite.

Citometría de flujo

El suministro celular de berberina en *C. albicans* cuando se combinan con PHMB se testó cuantitativamente utilizando citometría de flujo. En una placa de 96 pocillos, las células de levadura se trataron con 1 µg/ml-5 µg/ml de berberina sola y combinaciones de estas concentraciones con 1,25, 2,5, 5 µg/ml de PHMB. El procedimiento fue exactamente el mismo que el de la microscopía. Después de la centrifugación, se retiraron 100 µl de sobrenadante y se añadieron 400 µl de PBS y se testó el suministro de berberina utilizando un filtro FITC (isotiocianato de fluoresceína) en un citómetro de flujo FACS Canto™ II (BD Biosciences). Los datos se adquirieron utilizando el software FACS Diva y se analizaron con el software Flowjo 5.6.5.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para analizar estadísticamente los cambios en las MICs de antifúngicos cuando se combina con PHMB. Se consideró significativo un valor de p menor que 0,05. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS versión 2.0.

Ensayo de tablero de ajedrez

La susceptibilidad de los hongos a los antifúngicos seleccionados y su combinación con el ensayo PHMB de tablero de ajedrez se midió evaluando los cambios en las MICs de antifúngicos para conocer si hay alguna reducción cuando PHMB y los fármacos están actuando juntos. Todos los fármacos mostraron una reducción significativa de la MIC cuando se combinaron con PHMB (valor de p = 0,043). Las MICs de los antifúngicos y los valores del FICI se resumen en la Tabla 2 que figura a continuación.

Tabla 2

Organismo	Antifúngicos	MIC de antifúngicos solos (mg/ml)	MIC cuando se combina con PHMB (mg/ml)	FICI	Tipo de interacción
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NOD 24	PHMB	0,001	-	-	
	Nistatina	0,0025	0,000625	0,75	Sin interacción
	Anfotericina B	0,004	0,00025	0,56	Sin interacción
	Berberina	0,05	0,00056	0,56	Sin interacción
	Ketoconazol	0,016	0,001	0,5	Sinérgica
	Terbinafina	0,004	0,0025	0,312	Sinérgica
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY 100	PHMB	0,002	-	-	-
	Nistatina	0,005	0,0025	0,53	Sin interacción
	Anfotericina B	0,016	0,004	0,5	Sinérgica
	Berberina	0,05	0,025	0,75	Sin interacción
	Ketoconazol	0,00125	0,00031	0,263	Sinérgica
	Terbinafina	0,02	0,0025	0,14	Sinérgica
<i>Candida albicans</i>	PHMB	0,001	-	-	-
	Nistatina	0,005	0,0025	1	Sin interacción
	Anfotericina B	0,001	0,0005	0,53	Sin interacción
	Berberina	0,0625	0,03125	0,53	Sin interacción
	Ketoconazol	0,004	0,001	0,281	Sinérgica
	Terbinafina	0,004	0,001	0,5	Sinérgica

La caída de las MICs se muestra en las Figuras 1 a 3. Todos los fármacos mostraron una caída en las MICs contra todos los organismos en combinación con menos de 0,00005 mg/ml de PHMB. También hubo una disminución significativa (valor de p = 0,045) en las MICs de PHMB cuando se combinaron con antifúngicos, lo que se ilustra en la Tabla 3 que figura a continuación.

Tabla 3

Organismo	MIC de PHMB (mg/ml)	Fármacos	MIC de PHMB con antifúngicos (mg/ml)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NOD 24	0,001	Nistatina	0,0005
		Anfotericina B	0,0005
		Berberina	0,0005
		Ketoconazol	0,0005
		Terbinafina	0,000062
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY 100	0,002	Nistatina	0,000062
		Anfotericina B	0,0005
		Berberina	0,0005
		Ketoconazol	0,000031
		Terbinafina	0,000031
<i>Candida albicans</i>	0,001	Nistatina	0,0005
		Anfotericina B	0,000031
		Berberina	0,000031
		Ketoconazol	0,000062
		Terbinafina	0,0005

Durante el ensayo de tablero de ajedrez los autores de la invención toparon con problemas de solubilidad con terbinafina en el medio. Pero esto se resolvió manteniéndolo a 37°C durante 10 minutos. Algunos de los antifúngicos mostraron sinergia. Como se esperaba, hubo diferencias en las MICs de diferentes fármacos frente a diferentes organismos. Se observaron enormes descensos en las MICs de los antifúngicos frente a *S. cerevisiae* NOD 24. Se encontró un fuerte sinergismo con PHMB en el caso de terbinafina y ketoconazol. En el caso de anfotericina B se observó sinergia cuando se testó contra *S. cerevisiae* EBY 100. Los resultados del ensayo de tablero de ajedrez indican que PHMB puede potenciar la acción de estos antifúngicos.

Estudios de Fluorescencia y Absorbancia

La interacción entre PHMB y antifúngicos se testó mediante el estudio de los cambios en su intensidad de fluorescencia. Los resultados se representan en la Figura 4. Hubo una disminución en la fluorescencia de todos los compuestos. A una relación de 1:6 entre ketoconazol y PHMB, su fluorescencia se redujo a casi un 50%. La fluorescencia de nistatina mostró solo una pequeña disminución. Durante el estudio, se encontró que la berberina precipitaba en PBS, por lo que se utilizó agua como disolvente. Hubo una caída en la fluorescencia de berberina, pero luego comenzó a aumentar ligeramente, pero nunca fue más que la muestra con berberina sola. Similar fue la observación con anfotericina B. Esta caída en la fluorescencia de la muestra se denomina extinción de la fluorescencia. En el caso de terbinafina, se encontró que la absorbancia aumentaba ligeramente. A esto se le denomina efecto hipercrómico. La extinción de la fluorescencia y el efecto hipercrómico muestran que el PHMB interactúa con los antifúngicos.

Tamaño de las partículas formadas

El tamaño de los complejos formados entre PHMB y antifúngicos se determinó utilizando DLS. Se observaron nanopartículas en el caso de ketoconazol y berberina (Figura 5). Pero en el caso de ketoconazol también había varias partículas de mayor tamaño. En el caso de berberina (Figura 5 (a)) el 64,5% de las partículas estaba alrededor de $22,2 \pm 1,5$ nm. Pero para ketoconazol (Figura 5 (b)) solo menos del 10% de las partículas tenían un tamaño inferior a 10 nm. El índice de polidispersidad fue más de uno 1, lo que significa una distribución del tamaño de partícula más amplia. En el caso de otros fármacos, se observaron partículas de $50 \text{ a } \leq 1000$ nm. Los resultados demuestran que PHMB forma partículas con todos los antifúngicos y nanopartículas con terbinafina, ketoconazol y berberina.

Microscopía

El suministro celular de berberina en *C. albicans* se testó utilizando microscopía de fluorescencia. Hubo un aumento considerable en la fluorescencia de las células cuando se combinó berberina con PHMB, en comparación con berberina sola tal como se muestra en la Figura 6. También se observó un aumento en la fluorescencia cuando la concentración de PHMB aumentó para la misma concentración de berberina. La Figura 6 representa solo una concentración de berberina, pero se observaron resultados similares para todas las concentraciones estudiadas. Los resultados indican que con la adición de PHMB hay un aumento en la entrada de berberina en las células en comparación con berberina sola. Esto demuestra cualitativamente que PHMB puede potenciar el suministro de berberina a los hongos.

Citometría de flujo

El suministro potenciado de berberina en *C. albicans* se cuantificó utilizando citometría de flujo. Se utilizó el filtro FITC, ya que el pico de emisión de berberina se encuentra dentro del espectro de absorción de FITC. Hubo un claro aumento en el número de células positivas para berberina cuando se combinó con PHMB tal como se muestra en la Figura 7. La observación fue similar a la microscopía, es decir, aumento en las células positivas para berberina con aumento en la concentración de PHMB. También se observó un ligero aumento con una mayor concentración de berberina sola. Estos resultados indican que PHMB aumenta el suministro celular de berberina en *C. albicans*.

Resultados

PHMB es un antiséptico clínicamente seguro, de baja toxicidad, y los experimentos demuestran un suministro potenciado de antifúngicos al combinarlos con este polímero catiónico. Los fármacos se testaron para detectar cambios en su actividad antifúngica contra *C. albicans* y *S. cerevisiae* cuando se combinaron con PHMB. La interacción entre el polímero y los fármacos se testó utilizando estudios de fluorescencia/absorbancia y dispersión dinámica de la luz. El suministro celular de berberina se estudió utilizando citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Los experimentos demuestran que hay una reducción significativa (valor de $p = 0,043$) en las MICs de todos los fármacos cuando se combinan con PHMB. Además, la intensidad de la fluorescencia y la absorbancia de todos los fármacos estudiados se alteraron en presencia de PHMB, lo que indica una interacción. Las interacciones fármaco-PHMB se confirmaron mediante dispersión dinámica de la luz. Se observaron nanopartículas en el caso de berberina, terbinafina y ketoconazol. El aumento del suministro celular de berberina en *C. albicans* se visualizó utilizando microscopía y se cuantificó mediante citometría de flujo.

PHMB potencia la acción de los antifúngicos, forma nanopartículas y potencia el suministro celular de berberina y se prevé que el uso de nanopartículas en combinación con agentes antifúngicos mejorará las actividades antifúngicas *in vivo*.

PHMB potenció la acción antifúngica de todos los fármacos estudiados, ya que hubo una disminución en las MICs de todos los fármacos que se ilustra en la Tabla 2. Se observó un efecto sinérgico para ketoconazol, terbinafina y anfotericina B.

Se formuló la hipótesis de que PHMB forma nanopartículas con los antifúngicos seleccionados. No se detectaron nanopartículas cuando se combinaron nistatina, terbinafina y anfotericina B con PHMB en una relación de 1:3. Se detectaron partículas de mayor tamaño dentro del intervalo de tamaños de 500 a 1000 nm. Esto podría deberse a la agregación o la precipitación. Sin embargo, se cree que la combinación de los fármacos y PHMB en diferentes relaciones daría como resultado la formación de nanopartículas, además de alterar la temperatura a la que se forman las partículas, cambiando el medio/disolvente de reacción y ajustando el pH.

La técnica de suministro de fármacos alternativa explorada en este estudio tiene sus potenciales aplicaciones en las infecciones por hongos intracelulares y tópicos, e infecciones con hongos altamente resistentes. Las infecciones por hongos intracelulares tales como *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans* son difíciles de tratar debido a la dificultad de transporte a través de las membranas celulares y la disminución de la actividad dentro de las células. El sistema de suministro de fármacos basado en PHMB ofrece una solución menos costosa en comparación con las existentes y permite el uso de dosis más bajas de agentes antifúngicos.

Se prevé que la PHMB (o polímeros de hecho similares, capaces de formar nanopartículas) se puede combinar con agentes antifúngicos para fijar como objetivo a los hongos enumerados en la Tabla 4 que figura a continuación.

Tabla 4

GÉNERO	ESPECIE
Trichophyton	mentagrophytes
Trichophyton	Rubrum
Epidermophyton	Floccosum

Formación de nanopartículas con terbinafina y PHMB

Se llevaron a cabo experimentos para formar nanopartículas formadas con terbinafina y PHMB.

Terbinafina se disolvió en DMSO a una concentración madre de 10 mg/ml. Luego se diluyó adicionalmente hasta una concentración de 1 mg/ml en agua ultrapura (se añadieron 20 μ l de 10 mg/ml de terbinafina a 180 μ l de H₂O) y se mezcló a fondo mediante agitación con vórtice).

PHMB (1 mg/ml en agua) se calentó durante 20 min a 60°C y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

La relación de PHMB:terbinafina se mantuvo constante a 3:1, ya que esto proporcionó el tamaño óptimo de las nanopartículas y números en las condiciones testadas hasta la fecha.

Formulación de nanopartículas de PHMB/Terbinafina:

Se preparó una formulación de nanopartículas diez veces mayor de 30:10 ($\mu\text{g/ml}$ de PHMB:terbinafina) en 300 μl . Se añadieron 288 μl de PBS a un tubo estéril de 1,5 ml. Se añadieron 9 μl de PHMB a 1 mg/ml y se mezclaron pipeteando arriba y abajo 5 veces. Después se añadieron lentamente 3 μl de terbinafina a 1 mg/ml y se mezclaron pipeteando arriba y abajo 5 veces. A continuación, se dejó la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de PHMB para formar nanopartículas.

Después, la solución se diluyó adicionalmente diez veces con PBS para la medición en la máquina para analizar la distribución del tamaño de nanopartículas Nanosight LM10 (para dar una concentración final de 3 $\mu\text{g/ml}$ de PHMB y 1 $\mu\text{g/ml}$ de terbinafina).

Las mediciones se leyeron en la máquina Nanosight LM10 (obtenida de Nanosight Limited, Wiltshire, Reino Unido) durante 1 minuto a 20°C, nivel de cámara 9, ganancia de pantalla 10 y un umbral de detección 6.

Los resultados de la NanoSight se muestran en las Figuras 8 a 10 y se resumen en la siguiente Tabla 5:

Tabla 5

Distribución de tamaño: Media: 119 nm, Modo: 126 nm, DT: 18 nm
Datos acumulados (nm): D10: 90, D50: 121, D90: 141, D70: 130
Líneas de usuario: 0 nm, 0 nm
Concentración total: 1.27 partículas / marco, 0.14E8 partículas / ml
Concentración seleccionada: 0,00 partículas / marco, 0,00E8 partículas / ml
Curva ajustada: Media: 0 nm, DT: 0
Pistas completadas: 27
Velocidad de deriva: 1331 nm/s

Tal como se muestra en las Figuras 8 - 10, se produjeron nanopartículas que comprenden PHMB y terbinafina y PHMB que entonces podría ser utilizadas en la preparación de un medicamento tópico para el tratamiento posterior de una gama de posibles infecciones fúngicas.

Parche de Micro-Agujas

Los parches transdérmicos han sido utilizados durante mucho tiempo para la administración de fármacos lipofílicos de moléculas pequeñas que pueden ser fácilmente absorbidos por la piel. Esta vía de suministro no invasiva es ventajosa para la administración de muchos fármacos incompatibles con el suministro oral, ya que permite la absorción directa del fármaco en la circulación sistémica, evitando los sistemas portales digestivo y hepático, que también pueden reducir drásticamente la biodisponibilidad de muchos fármacos. El suministro transdérmico también supera muchos de los desafíos asociados con la inyección subcutánea al reducir en gran medida la incomodidad del paciente, la ansiedad por la aguja, el riesgo de pinchazo accidental con la aguja para el administrador y problemas relacionados con la eliminación de objetos punzantes.

A pesar de estas muchas ventajas, la administración transdérmica de fármacos se limita a clases de moléculas compatibles con la absorción a través de la piel. El suministro de sales de moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas no son típicamente viables con el suministro transdérmico tradicional, ya que la piel proporciona una barrera protectora eficaz para estas moléculas, incluso en presencia de excipientes potenciadores de la absorción. Sin embargo, se puede emplear una tecnología de micro-agujas para suministrar las nanopartículas que contienen agentes antifúngicos directamente a la epidermis, la dermis y la matriz de la uña (en los casos en los que la uña y la piel se encuentran en el eponiquio). Al suministrar la composición de la invención de esta manera, las nanopartículas penetrarán en la matriz ungüal y el sistema capilar y suministrarán la composición de nanopartículas antifúngicas al lecho ungüal, debajo de la placa ungüal dura y dentro de los hongos. De esta manera, los potentes agentes antifúngicos pueden suministrarse directamente al sitio de acción, reduciendo así el tiempo de tratamiento y mejorando la potencia.

Las Figuras 11 y 12 muestran diagramas de un dedo 10 al que un parche de micro-aguja (ilustrado en la Figura 13) se puede aplicar a un dedo dentro de la zona de tratamiento 12 mostrada por una línea de puntos. La zona de tratamiento 12 está formada por la dermis detrás de la uña 14 y también en la matriz ungüal (eponiquio) 16 en donde se encuentran la uña y la piel. La raíz 18 de la uña está ubicada en la zona debajo de la dermis detrás de la uña y, por lo tanto, puede tratarse eficazmente aplicando un parche de micro-agujas para administrar la composición de la presente invención. Por supuesto, el parche de micro-agujas podría utilizarse para las uñas de los pies además de las uñas de las manos.

La Figura 13 muestra un diagrama de un parche de micro-agujas que se puede utilizar para aplicar la composición de la presente invención a un individuo que padece una infección por hongos en las uñas. El parche 20 de micro-agujas está formado por una banda flexible de material 22 que tiene un adhesivo 24 aplicado en su cara inferior. Ubicado centralmente en la cara inferior de la banda flexible hay una matriz de micro-agujas 26 que se extienden hacia abajo que tienen una pluralidad de puntos 30. Los puntos se pueden formar como agujas que tienen conductos que están conectados a un depósito 28 que contiene la composición o simplemente tienen sus puntos recubiertos en la composición. En una configuración alternativa, un depósito 28 puede expulsar la composición a través de orificios dispuestos alrededor de las matrices de micro-agujas, de modo que la composición puede revestir continuamente los puntos de la matriz a lo largo de un período de tiempo predeterminado. Resultará evidente para el destinatario experto que actualmente se encuentra disponible un cierto número de parches de micro-agujas diferentes y que la composición de la presente invención podría adaptarse para su uso con una diversidad de ellos.

Las micro-agujas pueden ser de menos de 2 mm de longitud, y preferiblemente aproximadamente 250 μm se insertarán en la piel con mínimas molestias del paciente y, dado el pequeño orificio creado, con un riesgo mínimo de infección post-inyección, sangrado o riesgo de inyección IV inadvertida para una administración intradérmica. Además, las micro-agujas reducen el riesgo para el administrador de la inyección, ya que la perforación accidental de la piel es casi imposible con estas pequeñas proyecciones.

Se prevé que el parche de micro-agujas podría ser utilizado para un único tratamiento en los casos en los que todo lo que el paciente tiene que hacer es separar el parche de una envoltura y aplicarlo a la parte apropiada del dedo de la mano o dedo del pie durante un período de tiempo determinado. Como alternativa, el parche de micro-agujas podría venderse en combinación con la composición y el paciente cubriría una cantidad de la composición sobre la superficie de las micro-agujas y aplicaría el parche al cuerpo de la manera prescrita. El parche puede venir con marcas en su exterior para ayudar al paciente o al médico a alinear correctamente las micro-agujas con la ubicación correcta en el dedo de la mano o del pie a tratar.

Aerosol

La composición de la invención también puede formularse en una formulación de aerosol. En este ejemplo de trabajo, las nanopartículas de PHMB se forman con caspofungina (un lipopéptido antifúngico) y se secan. Las nanopartículas secas se añaden luego a un propulsor. El propulsor proporciona la fuerza para generar la nube de aerosol y también es el medio en el que se suspende o disuelve el componente activo de la nanopartícula de caspofungina.

Se puede utilizar una gama de propelentes, pero en términos generales debe tener:

- un punto de ebullición en el intervalo de -100 a $+30^{\circ}\text{C}$
- una densidad de aproximadamente $1,2$ a $1,5\text{ g cm}^{-3}$ (aproximadamente la del fármaco que se ha de suspender o disolver)
- una presión de vapor de 40 a 80 psig ($2,75$ a $5,50$ bares)
- sin toxicidad para el paciente
- ser no inflamable
- ser capaz de disolver los aditivos habituales. Los ingredientes activos deberían ser completamente solubles o completamente insolubles.

Propulsores que se utilizan en inhaladores para el asma serán particularmente adecuados, tales como hidrofluoroalcanos (HFA): bien HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) o HFA 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) o combinaciones de los mismos. Adicional, o alternativamente, se pueden utilizar fosfolípidos que potencien la penetración y la biodisponibilidad.

Las nanopartículas se reconstituirán cuando se añade la humedad, por ejemplo, cuando la preparación se pulveriza en el entorno húmedo de los pulmones. Se prefiere que la preparación esté contenida en un recipiente de aleación de aluminio que esté revestido internamente con fluoropolímero y sellado con una válvula dosificadora de modo que pueda dispensarse una dosis medida. Si es necesario, también se puede instalar una boquilla atomizadora y un tapón antipolvo.

Las formas de realización precedentes no están destinados a limitar el alcance de la protección conferida por las reivindicaciones, sino más bien para describir ejemplos de cómo la invención puede ser puesta en práctica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica de nanopartículas para uso en el tratamiento de una infección fúngica en las uñas o la piel, que comprende polihexametileno biguanida (PHMB) y un agente antifúngico.
- 5 2. La composición tópica de nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende, además, uno o más de los siguientes componentes: tampones, excipientes, aglutinantes, aceites, agua, emulsionantes, glicerol, antioxidantes, conservantes y fragancias.
3. La composición tópica de nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la composición comprende, además, urea.
- 10 4. La composición tópica de nanopartículas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde la infección fúngica comprende una infección fúngica en las uñas, pie de atleta o una infección fúngica en la piel.
5. La composición tópica de nanopartículas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el agente antifúngico comprende uno o más agentes seleccionados del siguiente grupo: nistatina, terbinafina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina.
- 15 6. La composición tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la infección fúngica comprende una infección dermatofítica y/o por levaduras.
7. La composición tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición está en forma de crema, pomada, spray o polvo.
8. La composición tópica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición se administra mediante una matriz de micro-agujas.
- 20 9. La composición tópica de nanopartículas de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la matriz de micro-agujas está incorporada en un parche adhesivo.
- 25 10. Un método para producir una composición tópica de nanopartículas para uso en el tratamiento de una infección fúngica en las uñas o la piel, que comprende mezclar polihexametileno biguanida (PHMB) con uno o más agentes antifúngicos en condiciones adecuadas para permitir la formación de nanopartículas, en donde el agente antifúngico comprende uno o más agentes seleccionados del siguiente grupo: nistatina, terbinafina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina.

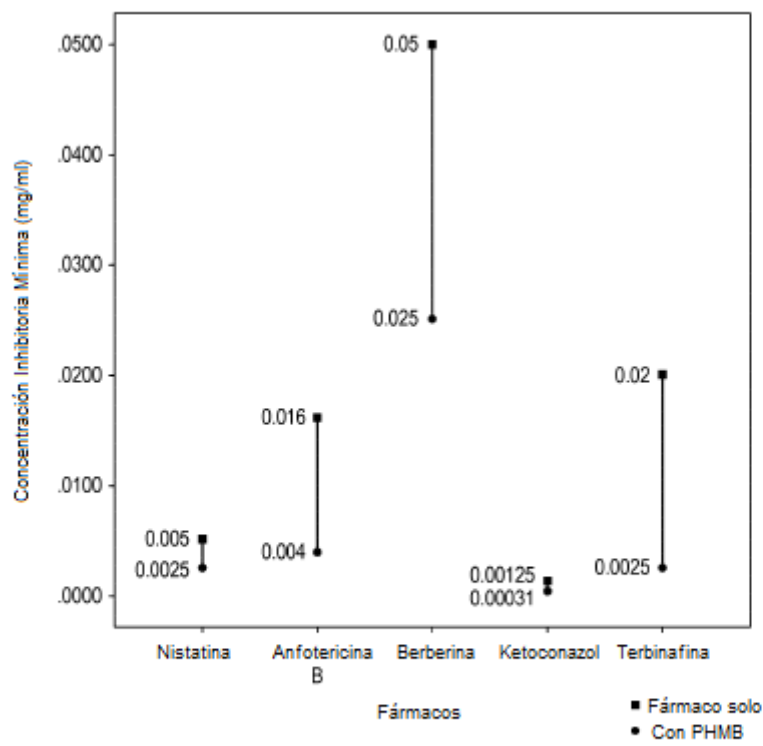


FIG. 1

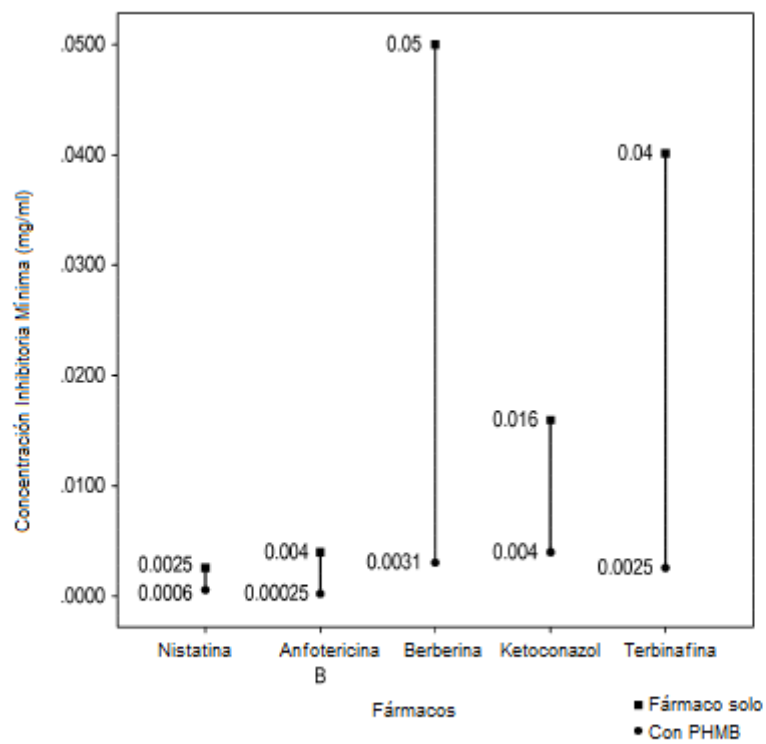


FIG. 2

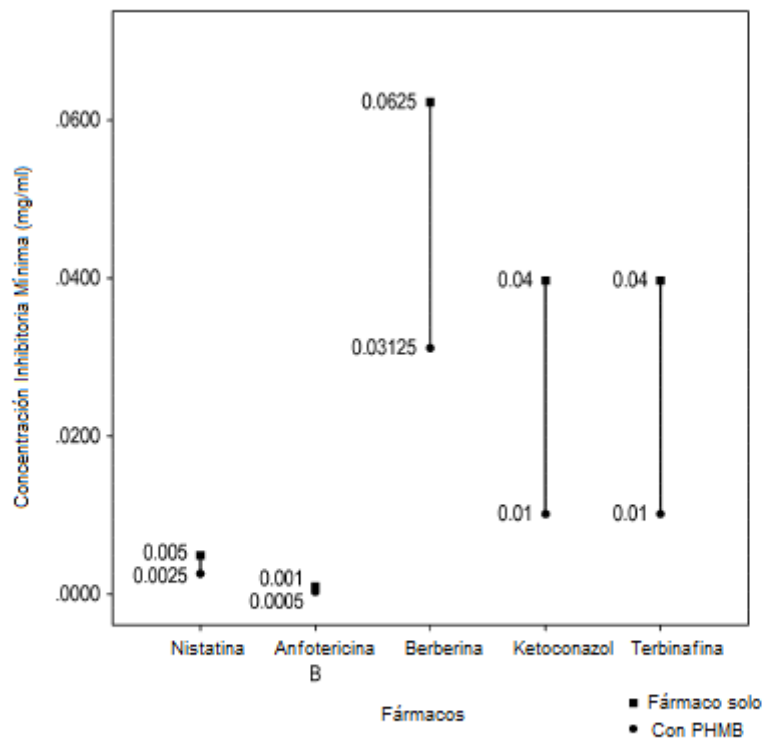


FIG. 3

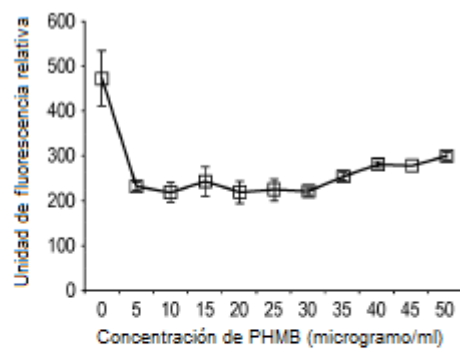


FIG. 4A

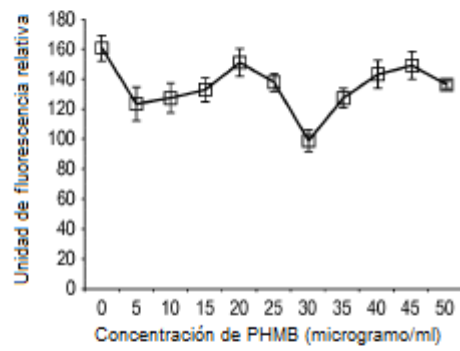


FIG. 4B

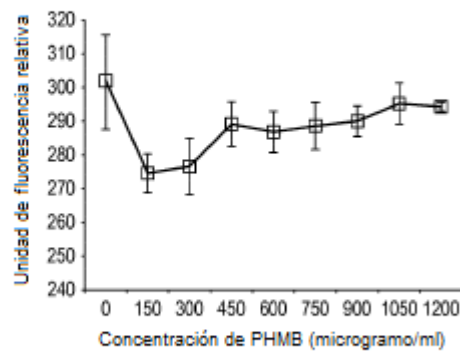


FIG. 4C

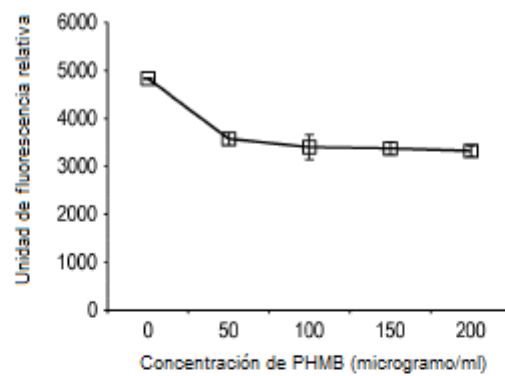


FIG. 4D

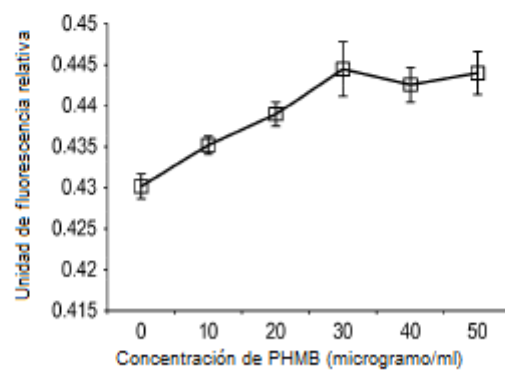


FIG. 4E

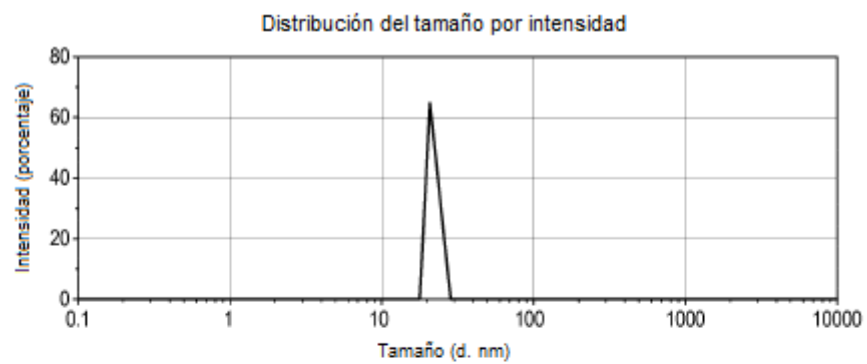


FIG. 5A

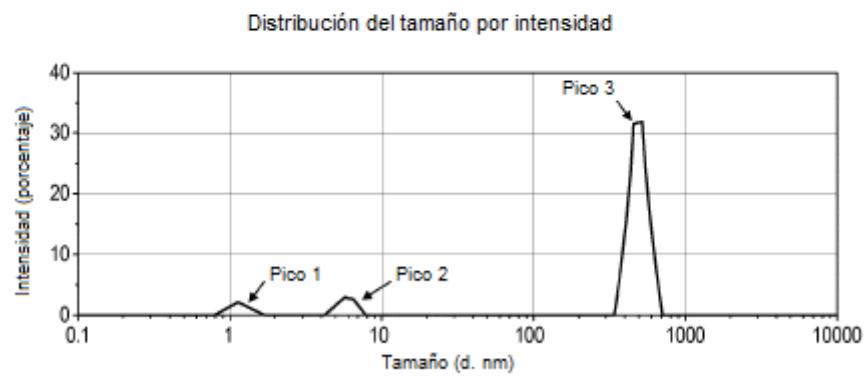


FIG. 5B

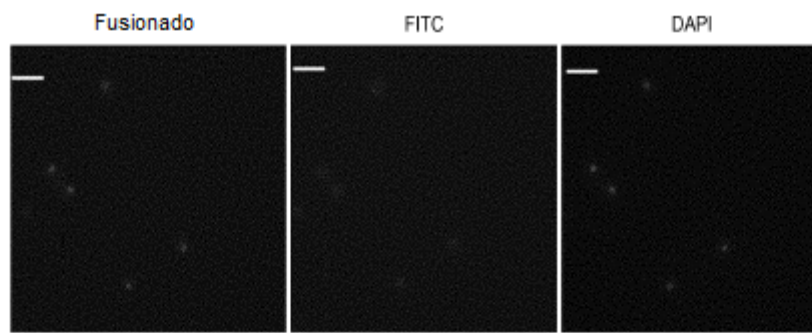


FIG. 6A

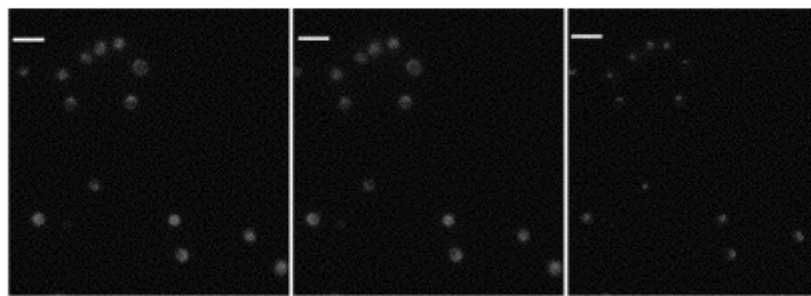


FIG. 6B

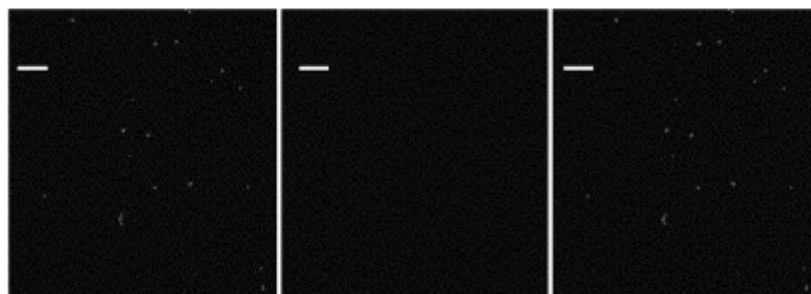


FIG. 6C

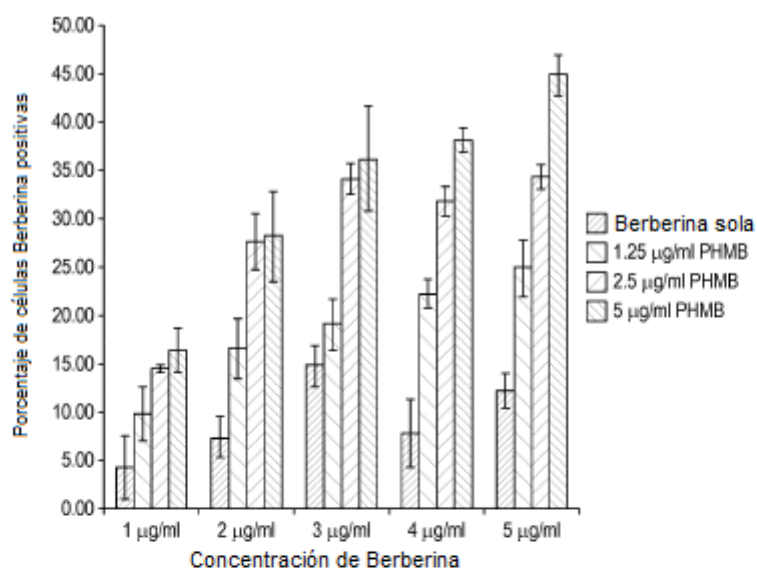


FIG. 7

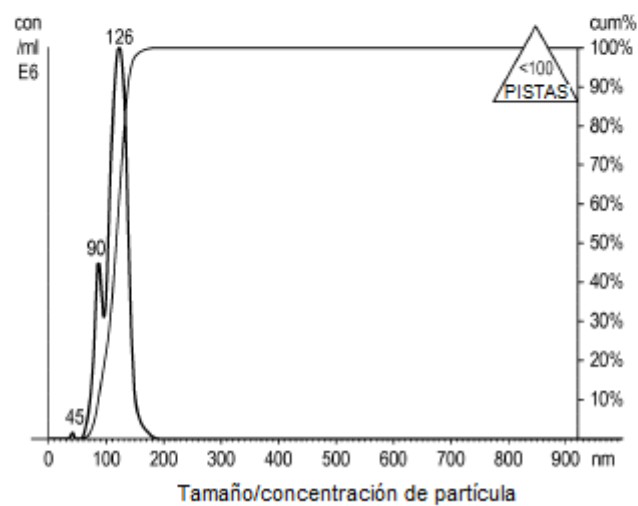


FIG. 8

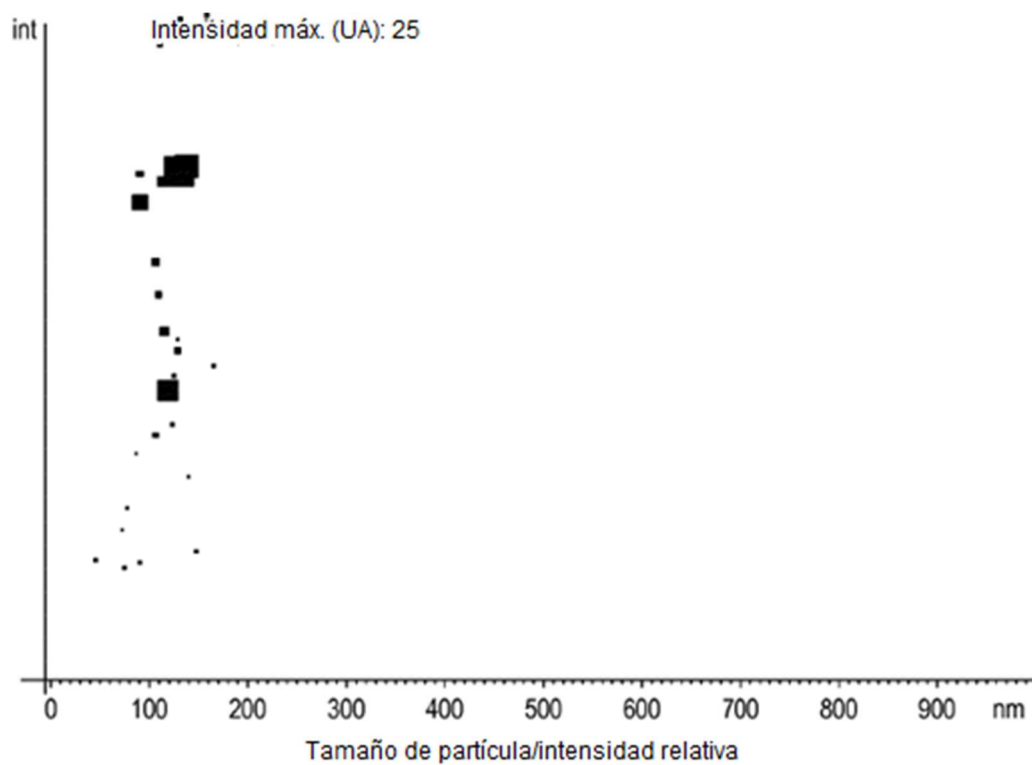
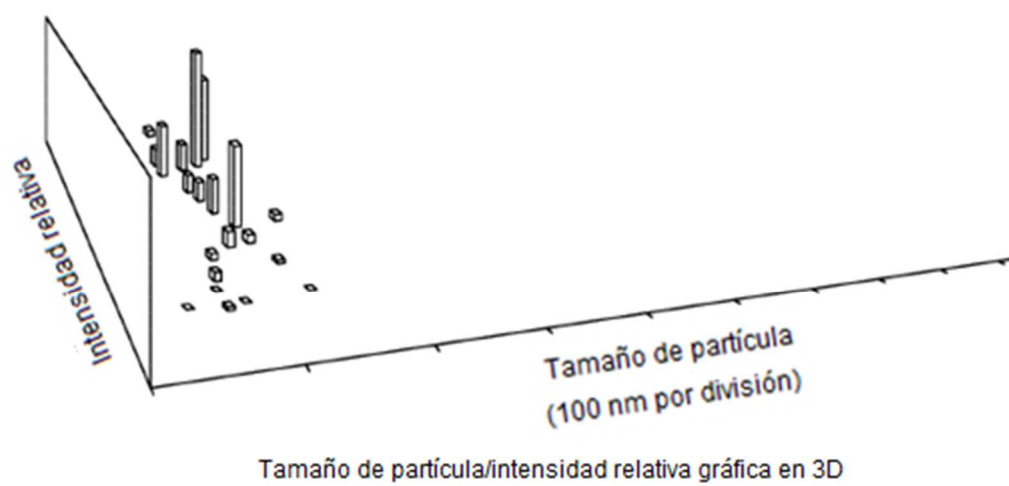


FIG. 9



Tamaño de partícula/intensidad relativa gráfica en 3D

FIG. 10

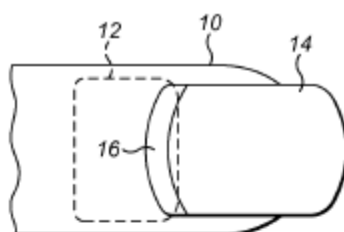


FIG. 11

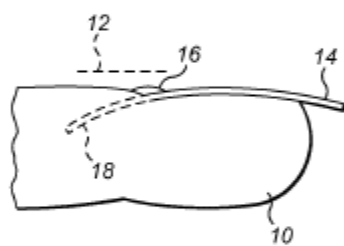


FIG. 12

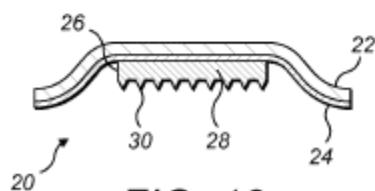


FIG. 13