



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 360 548**

(21) Número de solicitud: 200930990

(51) Int. Cl.:

A61K 31/221 (2006.01)

A61K 31/661 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación: **13.11.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2011**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
07.06.2011

(71) Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
Serrano, 117
28006 Madrid, ES

(72) Inventor/es:
Fernández-Reyes Silvestre, María del Rosario;
Infante Martínez-Pardo, María Rosa;
Luque Ortega, Juan Román;
Pérez Muñoz, Lourdes;
Morán Bádenas, Carmen;
Pons Pons, Ramón;
Rivas López, Luis Ignacio;
Pinazo Gassol, Aurora y
Lozano Valdés, Neus

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **Formulaciones de lipoaminoácidos catiónicos con menor poder hemolítico basadas en la formación de pares cataniónicos.**

(57) Resumen:

Formulaciones de lipoaminoácidos catiónicos con menor poder hemolítico basadas en la formación de pares cataniónicos.

La presente invención se refiere a una composición formada por un tensioactivo catiónico que es un diacilglicerol derivado de arginina y al menos un fosfolípidos. La estructura de esta composición confiere propiedades antibacterianas y antileishmanicas, con un menor poder hemolítico, por lo que son adecuadas para su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias y protozoos.

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de lipoaminoácidos catiónicos con menor poder hemolítico basadas en la formación de pares catiónicos.

La presente invención se refiere a una composición formada por un tensioactivo catiónico que es un diacilglicerol derivado de arginina y al menos un fosfolípido y a su uso como antibacteriano y antileishmanico.

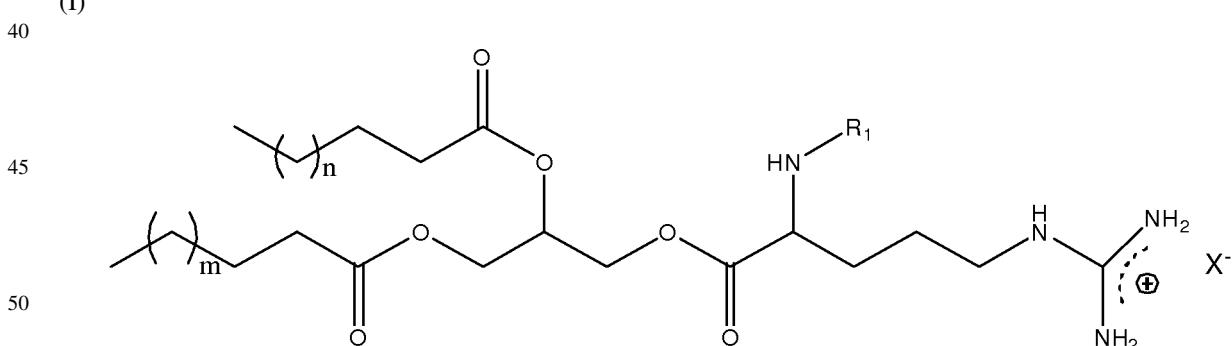
Estado de la técnica anterior

Los diacilglicerol derivados de arginina se sintetizaron con el objetivo de mejorar y abaratar los tensioactivos antimicrobianos existentes. Su uso en alimentos y aplicaciones cosméticas, así como desinfectantes tópicos, han sido estudiados ampliamente (Vinardell, M.P.; Benavides, T.; Mitjans, M.; Infante, M.R.; Clapes, P.; Clothier, R. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46*, 3837-3841). La estructura de estos compuestos consiste en un esqueleto central formado por el glicerol, una parte hidrófoba formada por ácidos alifáticos unidos al glicerol en las posiciones 1 y 2 mediante enlaces éster y una parte de carácter polar formada por un residuo de arginina unido al glicerol en la posición 3 mediante un enlace éster (Pérez, L.; Infante, M.R.; Angelet, M.; Clapes, P.; Pinazo, A. *Prog Colloid Polym Sci* **2004**, *123*, 210-216; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R.; Moran, M.C.; Vinardell, P.; Mitjans, M.; Pinazo, A. *Colloids Surf B* **2004**, *35*, 235-242). Estructuralmente se pueden considerar análogos de fosfolípidos con una funcionalidad mixta entre los lipoaminoácidos y triglicéridos. Además, la inclusión de un aminoácido favorece su biodegradabilidad. La modulación de sus propiedades físico-químicas, y por tanto de sus actividades biológicas asociadas, (Pinazo, A.; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R. *Phys Chem Chem Phys* **2004**, *6*, 1475-1481), se logra mediante la variación de su balance carga-hidrofobicidad, ya sea por acetilación del grupo α -amino o bien por la variación de la longitud de la cadena hidrofóbica, dando lugar a una amplia colección de análogos con diferentes comportamientos en sistemas biológicos.

Las vesículas cataniónicas han sido ampliamente utilizadas como promotores de reacciones químicas y enzimáticas y, más recientemente, como vehículo para facilitar la liberación de ADN o de otros fármacos de tamaño pequeño en células eucariotas (Bramer, T.; Dew, N.; Desmán, K. *J Pharm Pharmacol* **2007**, *59*, 1319-1334). Los tensioactivos iónicos utilizados en la preparación de las mezclas cataniónicas pueden ser de una o múltiples cadenas. Mezclando tensioactivos de una cadena de carga opuesta da lugar a tensioactivos cataniónicos de *pseudo-doble-cadena* (Kamenka, N.; Chorro, M.; Talmon, Y.; Zana, R.; *Colloids Surf* **1992**, *67*, 213-222). Sin embargo, la mayor parte de la literatura se centra en tensioactivos de *simple-doble cadena*, formando mezclas cataniónicas de *pseudo-triple cadena* (Marques, E.F.; Brito, R.O.; Silva, S.G.; Rodríguez-Borges, J.E.; Vale, M.L.; Gomes, P.; Araújo, M.J.; Sóderman, O. *Langmuir* **2008**, *24*, 11009-11017).

Descripción de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula (I)



donde

m y n son iguales o diferentes y tienen un valor entre 6 y 18

R₁ es -CO-R₂ o -H

R₂ es alquilo C₁-C₁₀,

X es un halogenuro

o sus derivados o solvatos;

y al menos un fosfolípido.

ES 2 360 548 A1

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 3 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido.

Preferiblemente, en la composición descrita anteriormente el fosfolípido es anfótero. Más preferiblemente dicho fosfolípido anfótero es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

10 Preferiblemente, en la composición descrita anteriormente el fosfolípido es aniónico. Más preferiblemente dicho fosfolípido aniónico se selecciona entre L-*α*-fosfatidil-DL-glicerol (PG), diacilfosfatidilserina, diacilfosfatidilinositol o 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfato sal monosódica.

15 Las longitudes de cadena hidrófoba del fosfolípido utilizado en la presente invención pueden ser variables, y dado que se busca biocompatibilidad, los fosfolípidos más adecuados para realizar la presente invención serían los que se encuentran en productos naturales.

En una realización preferida, en la composición descrita anteriormente n es 8, 10 ó 12.

20 En otra realización preferida, en el compuesto de fórmula (I) R₂ es alquilo C₁-C₃.

En otra realización preferida, X es cloruro.

25 Debido a la naturaleza antipática y estructura de los componentes de la composición de la presente invención, éstos tienden a formar vesículas por lo que una realización preferida de la presente invención es en la que dicha composición se presenta en forma de dispersión de vesículas o liposomas, siendo agentes dispersantes preferidos el agua pura o como componente mayoritario de soluciones (de carácter salino, tamponante o orgánico).

30 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a la composición descrita para preparar un medicamento.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición descrita anteriormente para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por bacterias o protozoos.

35 La composición de la presente invención es una mezcla de lipoaminoácidos catiónicos con fosfolípidos de carga negativa, y el resultado de la mezcla de este tipo de compuestos es una composición con actividad antimicrobiana (tanto antibacteriana como antiprotozoaria) pero que a la vez disminuye la actividad hemolítica. La disminución de la hemotoxicidad consiguiendo mantener la efectividad antimicrobiana supone una ventaja respecto a otros compuestos de estructura similar con aplicaciones antibióticas.

40 En una realización preferida, la enfermedad está causada por una bacteria que se selecciona entre las de los géneros *Staphylococcus* o *Acinetobacter*. En una realización más preferida, la enfermedad está causada por una bacteria que se selecciona entre *Staphylococcus aureus* o *Acinetobacter baumannii*.

45 En otra realización preferida, la enfermedad está causada por un protozoo del género *Leishmania*. En una realización más preferida, la enfermedad está causada por un protozoo que se selecciona entre *Leishmania donovani* o *Leishmania pifanoi*.

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

55 Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus derivados o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus derivados o solvatos.

Los compuestos de la presente invención de formula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición descrita anteriormente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, dicha composición farmacéutica además comprende otro principio activo.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de 10 composiciones terapéuticas.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus derivados o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición 15 farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o derivados o solvatos.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión 20 acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la 30 presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la actividad leishmanicida de DPPC (□), DPPC/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los 35 tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en promastigotes *Leishmania donovani*.

Fig. 2. Muestra la actividad leishmanicida de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en promastigotes *Leishmania donovani*.

Fig. 3. Muestra la actividad leishmanicida de (a) PG/1212RAc y (b) PG/1414RAc, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.4 (▲), 0.6 (▼), 0.8 (●) y 1 (○) en promastigotes *Leishmania donovani*.

Fig. 4. Muestra la actividad leishmanicida de DPPC (□), DPPC/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los 45 tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

Fig. 5. Muestra la actividad leishmanicida de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

Fig. 6. Muestra la actividad leishmanicida de (a) PG/1212RAc y (b) PG/1414RAc, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.4 (▲), 0.6 (▼), 0.8 (●) y 1 (○) en amastigotes axénicos de *Leishmania pifanoi*.

Fig. 7. Muestra la actividad antimicrobiana de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en *Staphylococcus aureus*.

Fig. 8. Muestra la actividad antimicrobiana de (a) PG/1212RAc y (b) PG/1414RAc, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○) en *Staphylococcus aureus*.

Fig. 9. Muestra la actividad antimicrobiana de DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b) en *Acinetobacter baumannii*.

Fig. 10. Muestra la actividad antimicrobiana de (a) PG/1212RAc y (b) PG/1414RAc, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○) en *Acinetobacter baumannii*.

Fig. 11. Muestra la actividad hemolítica inducida por DPPC/PG 7:3 (□), DPPC/PG/1.4% tensioactivo (■) y tensioactivo (○) para los tensioactivos 1212RAc (a) y 1414RAc (b).

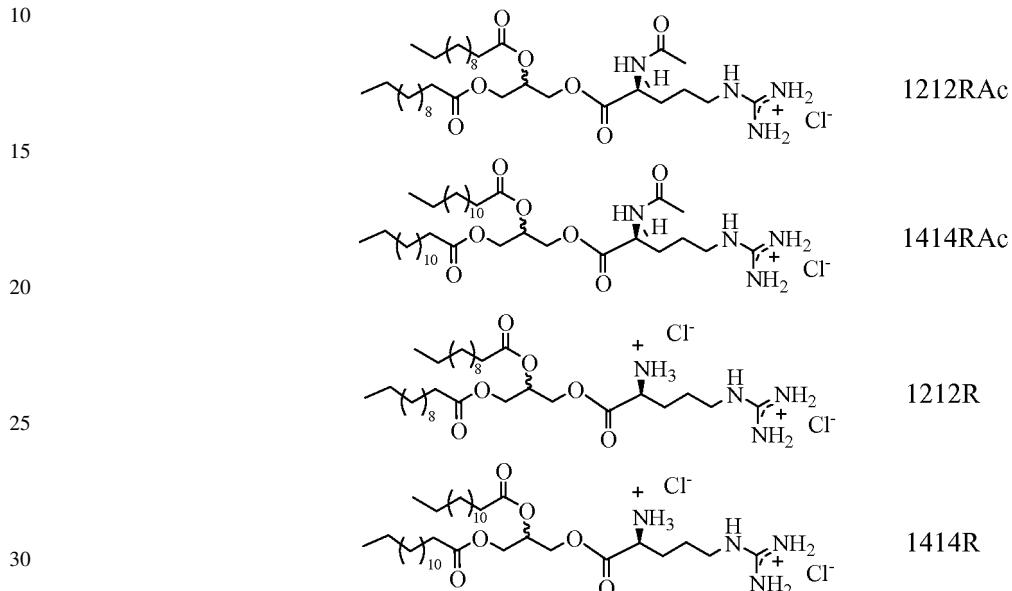
Fig. 12. Muestra la actividad hemolítica inducida por (a) PG/1212RAc y (b) PG/1414RAc, a fracciones molares de tensioactivo de 0 (□), 0.2 (■), 0.8 (●) y 1 (○).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de la composición descrita en la presente invención.

5

En los siguientes ejemplos se han empleado como tensioactivos los compuestos denominados 1212R, 1212RAc, 1414R y 1414RAc que tienen las siguientes fórmulas:

35 **1. Materiales y métodos**

Los tensioactivos diacilglicerol monocatiónicos (1212RAc, 691.4 g/mol, 1414RAc, 747.5 g/mol) y dicatiónicos (1212R, 685.8 g/mol, 1414R, 741.9 g/mol) derivados del amino ácido arginina fueron sintetizados siguiendo la metodología descrita por Pérez, L. (Pérez, L.; Infante, M.R.; Angelet, M.; Clapes, P.; Pinazo, A. *Prog Colloid Polym Sci* **2004**, 123, 210-216; Pérez, L.; Infante, M.R.; Pons, R.; Moran, M.C.; Vinardell, P.; Mitjans, M.; Pinazo, A. *Colloids Surf B* **2004**, 35, 235-242). Su pureza, superior al 99%, fue determinado mediante las técnicas de HPLC, RMN y análisis elemental. Los fosfolípidos fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilcolina (PC) fueron suministrados por Sigma, con una pureza del 99% y utilizados tal y como se recibieron. El agua se obtuvo mediante *Synergy® Water System* (resistividad = 18.2 MΩ cm). El etanol de pureza HPLC fue suministrado por Panreac (agua ≥ 0.2%).

45

Previamente a cualquier manipulación, los tensioactivos y los fosfolípidos fueron esterilizados por solubilización en etanol y posterior evaporación en una campana en condiciones estériles. Las dispersiones madre (C_T de 10 mM), ya sea del tensioactivo puro, de los fosfolípidos, o bien de las formulaciones fosfolípido-tensioactivo, a fracción molar de tensioactivo (X) de 0.2 y 0.8, fueron preparados por peso e hidratadas en agua. Todas las dispersiones fueron agitadas vigorosamente a temperatura ambiente durante 5 minutos y, a continuación, sonicadas a 50°C durante 15 minutos para promover la formación de vesículas uniformes. Las concentraciones más bajas se obtuvieron por dilución de las dispersiones madre.

55 **2. Actividad leishmanicida**

55

La actividad letal de tensioactivo sobre parásitos de leishmania (promastigotes, amastigotes) fue evaluada por la disminución de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las mitocondrias de los parásitos son capaces de reducir el MTT, formando formazán (característico por su color negro), pudiéndose así cuantificar la actividad de los tensioactivos mediante medidas de absorbancia a $\lambda = 595$ nm.

60

Al formular los tensioactivos monocatiónicos con el fosfolípido DPPC, se obtuvieron los resultados representados en la Fig. 1. En esta formulación, debido al carácter anfótero del fosfolípido, el hecho de formular el tensioactivo catiónico no modifica la carga total neta del sistema. En el caso del 1212RAc (Fig. 1a), la formulación del tensioactivo no incrementa la actividad leishmanicida en comparación a la actividad del tensioactivo puro dentro del rango de concentraciones estudiadas de 0-400 μ M. Es necesario destacar que la concentración representada corresponde a la concentración total del sistema, por lo tanto, a una concentración total de 200 μ M, una concentración de tensioactivo del 1.4% corresponde a 2.8 μ M. La adición de esta pequeña cantidad de tensioactivo, hace incrementar la actividad al 17%, mientras que el tensioactivo por sí solo, a 2.8 μ M, no presenta actividad alguna.

La formulación de los tensioactivos con la mezcla de dos fosfolípidos DPPC/PG 7:3 (w/w) tiene como finalidad conseguir modificar la carga neta total del sistema ya que el fosfolípido PG presenta carácter aniónico. Se puede observar que tanto para el 1212RAc (Fig. 2a) como para el 1414RAc (Fig. 2b), la adición de una pequeña cantidad de tensioactivo (1.4%) no es suficiente como para aumentar la actividad leishmanicida del fosfolípido, sino todo lo contrario, ya que es capaz de reducir la actividad del 23% a prácticamente hacerlo inactivo.

En la Fig. 3 se representa la actividad leishmanicida del sistema PG/tensioactivo a diferentes fracciones molares de tensioactivo. Se observa que la carga neta total del sistema no marca ninguna tendencia en la actividad leishmanicida en promastigotes *L. donovani*. La actividad observada es similar para todas las fracciones estudiadas.

En el sistema DPPC/1.4% tensioactivo (Fig. 4), la adición de esta pequeña cantidad de tensioactivo no provoca un aumento de la actividad leishmanicida cuando se trata del tensioactivo 1212RAc (Fig. 4a), mientras que para el 1414RAc (Fig. 4b) sí que aumenta progresivamente en función de la concentración, llegando a valores de actividad del 10% a una concentración total de 400 μM .

En la Fig. 5 se han representado las actividades leishmanicidas frente a los amastigotes de los sistemas formulados con la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3 (w/w). Para ambos tensioactivos, las actividades de los sistemas formulados experimentan un comportamiento similar al DPPC/tensioactivo.

Se ha estudiado el efecto de la carga neta del sistema PG/tensioactivo respecto a la actividad frente a los amastigotes en función de la concentración total (Fig. 6). Ambos tensioactivos presentan una actividad leishmanicida del 30% a 400 μM , a fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 0.6. Estos resultados experimentales confirman que la actividad frente a amastigotes *L. pifanoi axénico* no depende de la longitud de cadena hidrocarbonada, pero sí de la carga neta total del sistema, siendo la carga neta positiva más efectiva en cuanto a la actividad leishmanicida.

3. Actividad antibacteriana

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron bacterias Gram-negativas *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y Gram-positivas *Staphylococcus aureus* CECT 240. La actividad antimicrobiana de los tensioactivos se probó en placas de 96 pocillos por inhibición del crecimiento bacteriano en caldo Müller-Hinton (Oxoid) a 37°C durante 18 h con un inóculo inicial de $A_{600} = 0.005$ (Saugar, J.M.; Rodríguez-Hernández, M.J.; de la Torre, B.G.; Pachón-Ibanez, M.E.; Fernández-Reyes, M.; Andreu, D.; Pachón, J.; Rivas, L. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50-1251-1256). Los tensioactivos fueron ensayados en un rango de concentraciones de 0-250 μM .

En la Fig. 7 se puede observar que la actividad antimicrobiana de los tensioactivos puros 1212RAc y 1414RAc es del 20%, siendo ligeramente superior para el 1414RAc como sucedía en las actividades leishmanicidas tanto en promastigotes como en amastigotes. Al añadir un 1.4% de tensioactivo a la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3, el comportamiento es sorprendente ya que las actividades conseguidas (35%) son superiores a las que presentan los propios tensioactivos (20%). Para ambos sistemas formulados (Fig. 7a, b), existe un máximo de efecto bactericida a 100 μM que corresponde a una actividad aproximada del 45%. Al aumentar la concentración total del sistema, la actividad se ve reducida en un 7%, probablemente debido a la aparición de precipitado. Se puede observar que prácticamente no existen diferencias en las actividades en función de la longitud de cadena hidrocarbonada, mientras que, aparentemente, la carga negativa del sistema formulado está favorecida con respecto a la carga positiva del tensioactivo.

En la Fig. 8 se ha representado el efecto bactericida de los sistemas PG/tensioactivo a diferentes fracciones molares de tensioactivo. De la misma manera que en caso anteriormente descrito, la presencia de carga neta negativa en el sistema favorece la actividad antimicrobiana en las bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus*. A una concentración total de 50 μM , el efecto bactericida a la fracción molar de tensioactivo de 0.2 es máximo para los dos formulados: un 59% para el caso del 1212RAc y un 55% para el 1414RAc. En ambos casos, existe también una pérdida del efecto bactericida de un 7% al aumentar la concentración hasta 300 μM . A la fracción molar de tensioactivo de 0.8 donde la carga neta es positiva, el efecto bactericida es prácticamente nulo.

Una vez analizado el efecto bactericida en gram positivas (*Staphylococcus aureus*), a continuación se procedió a estudiar el efecto de formular los tensioactivos frente a las bacterias gram negativas (*Acinetobacter baumannii*). En la Fig. 9 se ha representado la actividad antimicrobiana del sistema DPPC/PG/tensioactivo. Si nos centramos en el comportamiento de los tensioactivos puros 1212RAc (Fig. 9a) y 1414RAc (Fig. 9b), se puede observar una gran actividad antimicrobiana, alcanzando valores estables del 67 y del 70% a 300 μM . En el momento de formularlos con la mezcla de fosfolípidos DPPC/PG 7:3, las actividades caen a valores cercanos al 0%. Este hecho implica que en este tipo de bacterias, la carga positiva es imprescindible para el efecto bactericida.

En la Fig. 10 se ha representado el efecto bactericida en función de la concentración total para el sistema PG/tensioactivo. Al igual que sucedía en el sistema descrito anteriormente, la presencia de carga positiva en las fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, es la causante de la actividad antimicrobiana frente a las bacterias gram negativas *Acinetobacter baumannii*, mientras que para fracciones molares de tensioactivo de 0.2 y 0, la actividad antimicrobiana es nula. A fracciones molares de tensioactivo de 0.8 y 1, se tiene que destacar el máximo efecto bactericida a 50 μM , del 61% para el sistema PG/1212RAc y del 50% para PG/1414RAc. Al aumentar la concentración total de los dos sistemas, la actividad se ve reducida un 20 y un 25% respectivamente, probablemente debido a la presencia de precipitado en el sistema.

4. Reducción de la actividad hemolítica

Para evaluar la citotoxicidad, se ensayó la actividad hemolítica de los tensioactivos, tal y como se describe a continuación. En resumen, los eritrocitos de oveja de sangre desfribinada por Biomedix (Madrid, España) fueron

- 5 lavados y resuspendidos en el medio Hanks e incubados (20×10^6 células/mL) con los diferentes preparados en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y $400 \mu\text{M}$ durante 4 horas a 37°C . Posteriormente, las células fueron centrifugadas, y el sobrenadante que contiene la hemoglobina liberada, fue recogido y transferido en una placa de 96 pocillos y medida en un lector de microplacas Bio-Rad a 550 nm. Se considera hemólisis completa la obtenida con 0,1% Tritón X-100.

10

La estrategia utilizada para reducir el poder hemolítico de los tensioactivos catiónicos se basa en la formulación de los tensioactivos con fosfolípidos de carga negativa, de tal manera que la carga positiva de los tensioactivos se vea neutralizada. La carga neta de la formulación mixta dependerá de la proporción de tensioactivo/fosfolípido. El formulado DPPC/tensioactivo no se ha estudiado experimentalmente en este apartado debido al carácter anfótero del 15 fosfolípido DPPC. La actividad hemolítica del formulado DPPC/PG/1.4% tensioactivo se ha representado en la Fig. 11. La carga neta negativa del sistema mixto es suficiente como para reducir la hemólisis del tensioactivo 1212RAc y 1414RAc de aproximadamente 100% a valores de 18 y del 6%, respectivamente.

20 Del mismo modo, el hecho de formular los tensioactivos catiónicos con PG provoca una reducción significativa de la actividad hemolítica, en función de la carga total del sistema. Tanto en la Fig. 12a como la 12b, a fracciones molares de tensioactivo de 0.2, las actividades hemolíticas se han visto reducidas considerablemente a valores del 0.1 y del 10%, respectivamente. Se ha constatado que la incorporación una pequeña cantidad de fosfolípido al tensioactivo reduce la hemólisis aproximadamente un 20% respecto a la del tensioactivo puro.

25

30

35

40

45

50

55

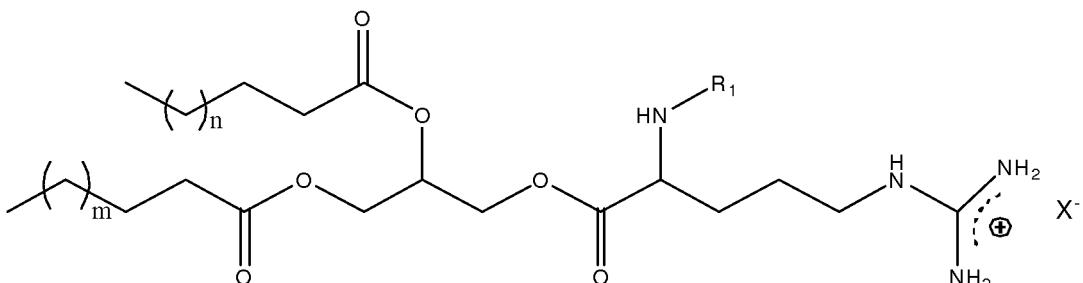
60

65

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de fórmula (I)

5



10

20 donde

m y n son iguales o diferentes y tienen un valor entre 6 y 18

25

R_1 es $-\text{CO}-R_2$ o $-\text{H}$,

25

R_2 es alquilo C_1-C_{10} ,

30

X es un halogenuro

30

o sus derivados o solvatos;

y al menos un fosfolípido.

35

2. Composición según la reivindicación 1 donde el fosfolípido es anfótero.

40

3. Composición según la reivindicación 2 donde el fosfolípido anfótero es dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

40

4. Composición según la reivindicación 1 donde el fosfolípido es aniónico.

45

5. Composición según la reivindicación 4 donde el fosfolípido aniónico se selecciona entre L- α -fosfatidil-DL-glicerol (PG), diacilfosfatidilslerina, diacilfosfatidilinositol o 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfato sal monosódica.

45

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde n y m son iguales y tienen un valor que se selecciona entre 8, 10, 12, 14 ó 16.

50

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde R_2 es alquilo C_1-C_3 .

50

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde X es cloruro.

55

9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que se encuentra en forma de dispersión de vesículas.

60

10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento.

65

11. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para preparar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por bacterias o protozoos.

12. Uso según la reivindicación 11 donde la enfermedad esta causada por una bacteria que se selecciona entre las de los géneros *Staphylococcus* o *Acinetobacter*.

60

13. Uso según la reivindicación 12 donde la enfermedad esta causada por una bacteria que se selecciona entre *Staphylococcus aureus* o *Acinetobacter baumannii*.

65

14. Uso según la reivindicación 11 donde la enfermedad esta causada por un protozoo del género *Leishmania*.

15. Uso según la reivindicación 14 donde la enfermedad esta causada por un protozoo que se selecciona entre *Leishmania donovani* o *Leishmania pifanoi*.

ES 2 360 548 A1

16. Composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 junto a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16 que además comprende otro principio activo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 360 548 A1

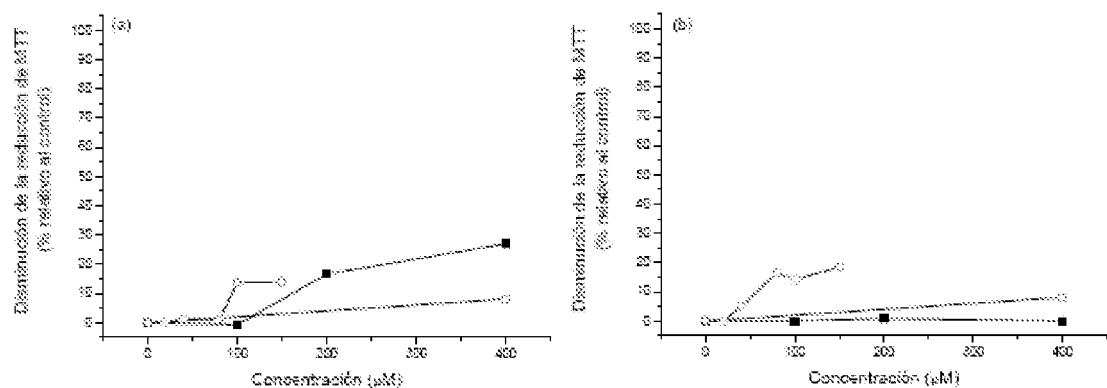


FIG. 1

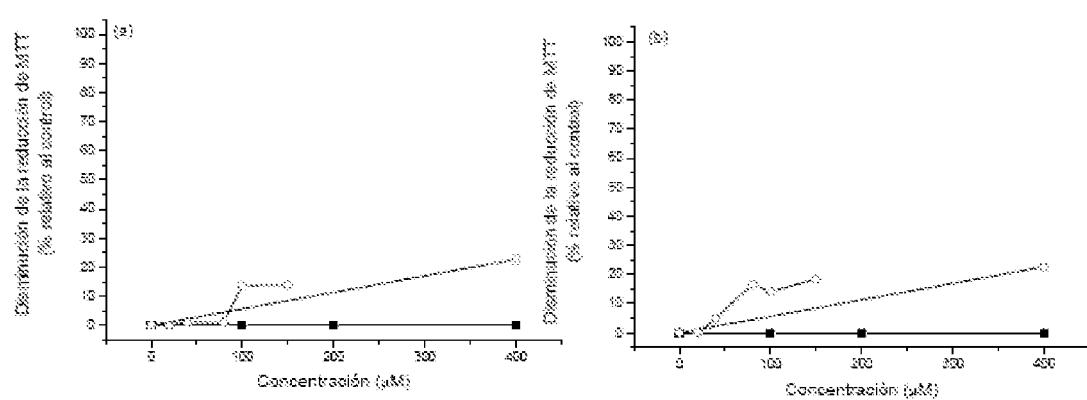


FIG. 2

ES 2 360 548 A1

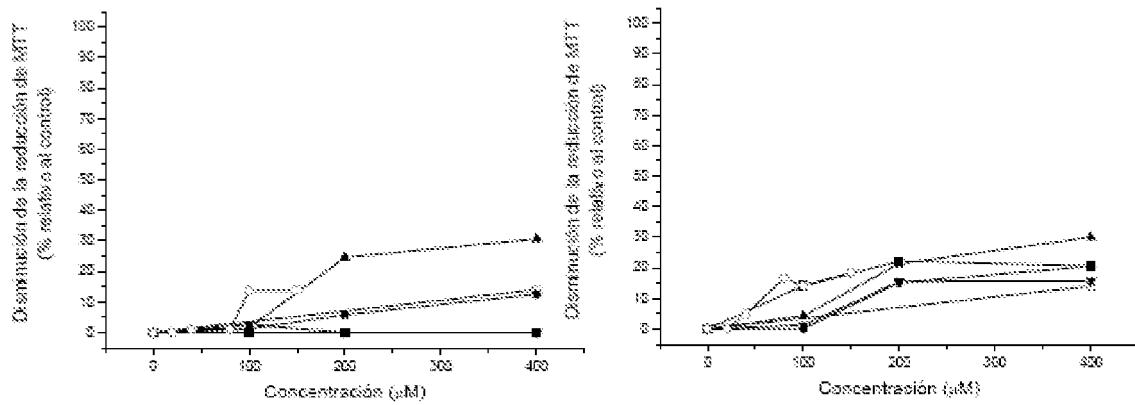


FIG. 3

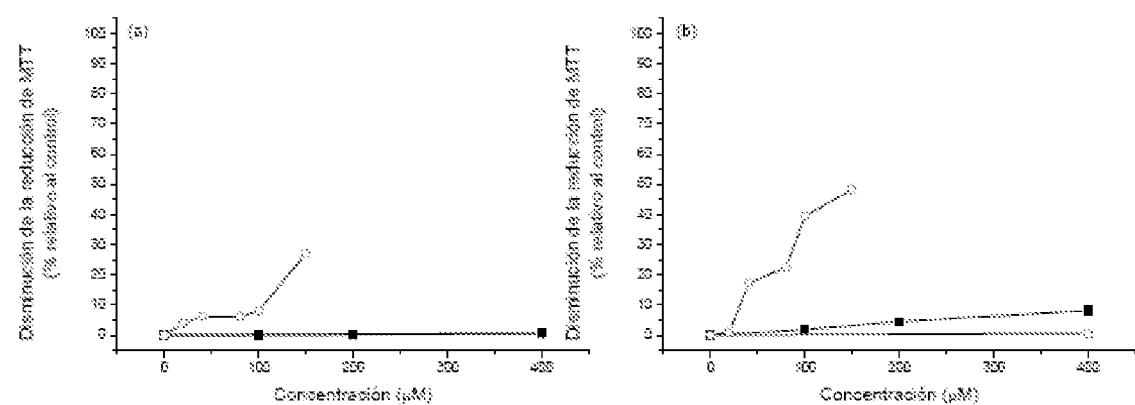


FIG. 4

ES 2 360 548 A1

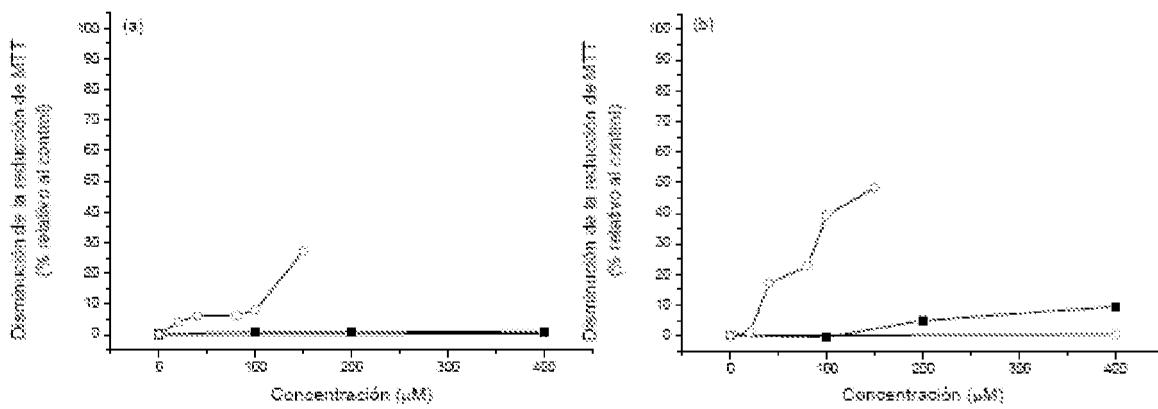


FIG. 5

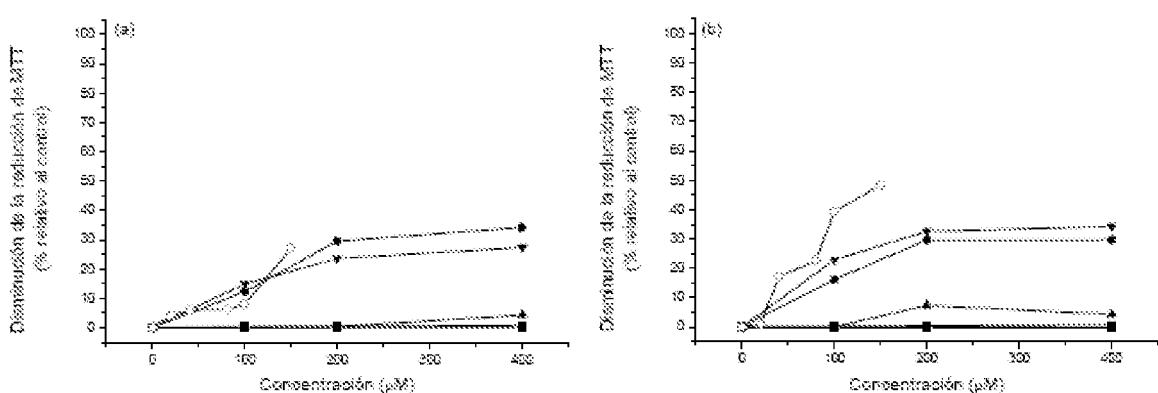


FIG. 6

ES 2 360 548 A1

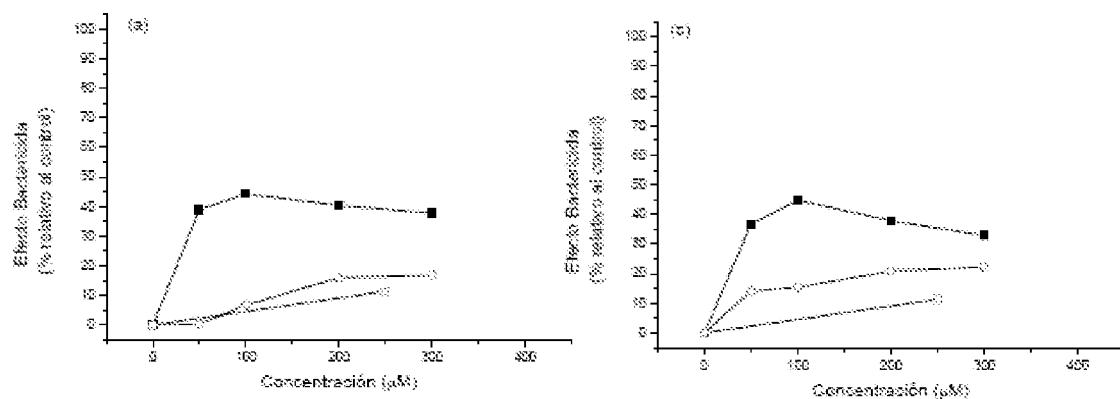


FIG. 7

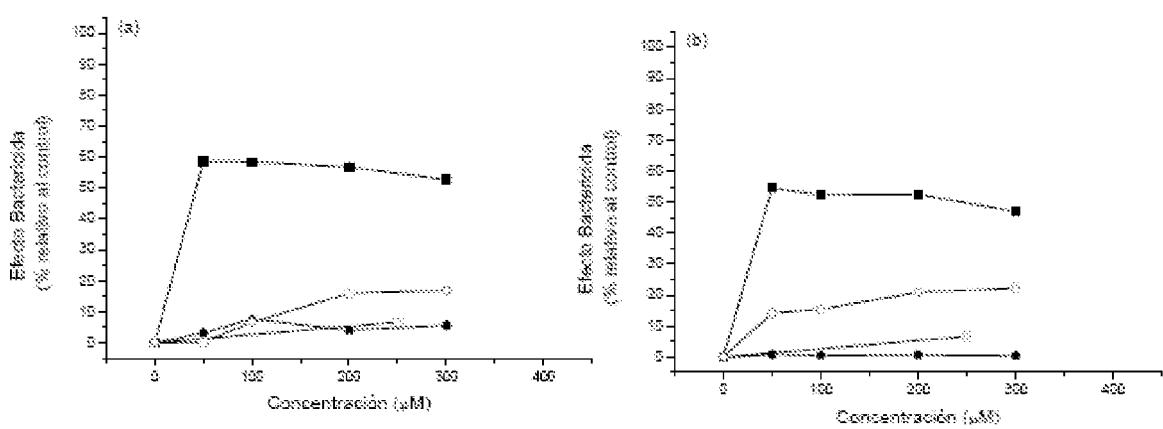


FIG. 8

ES 2 360 548 A1

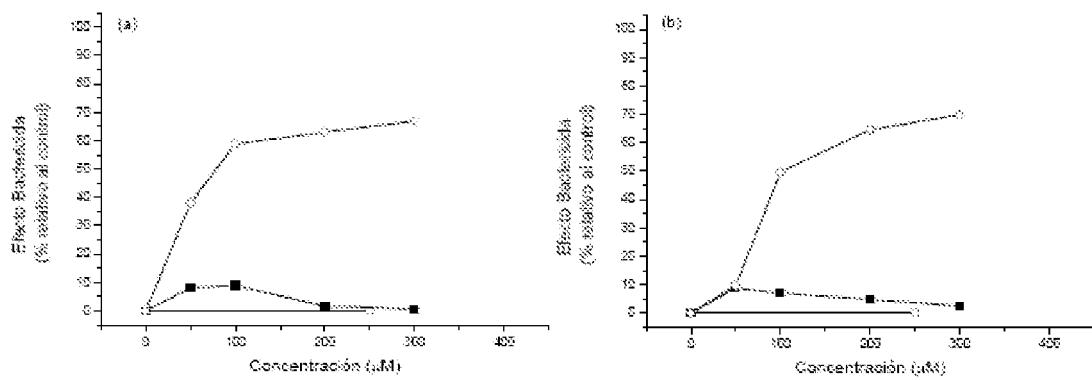


FIG. 9

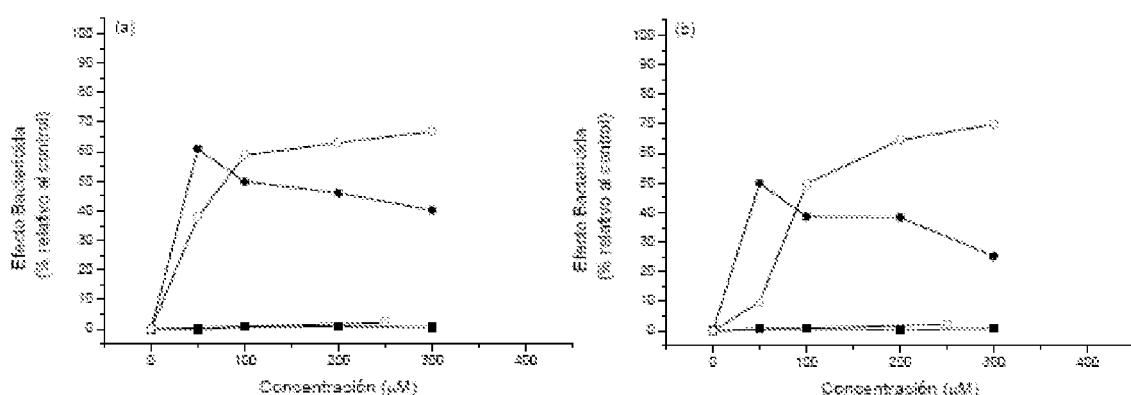


FIG. 10

ES 2 360 548 A1

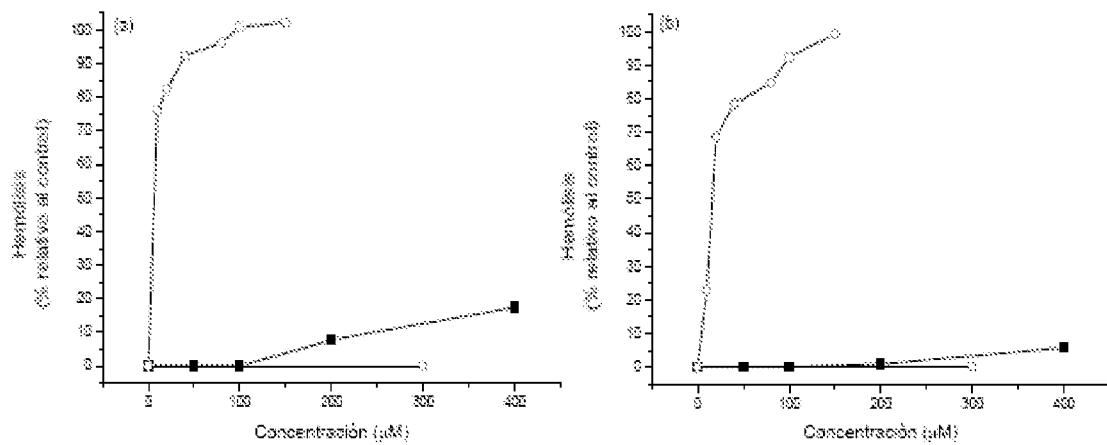


FIG. 11

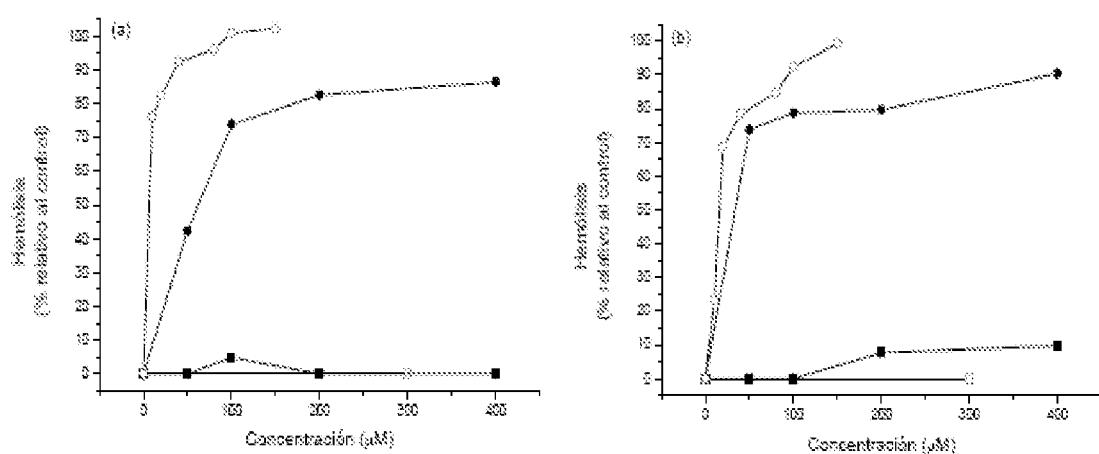


FIG. 12



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 200930990

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 13.11.2009

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | LOZANO, N. y col. Dynamic Properties of Cationic Diacyl-Glycerol-Arginine-Based Surfactant/Phospholipid Mixtures at the Air/Water Interface. Langmuir, 2010, Vol. 26, Nº 4, páginas 2559-2566, ISSN 0743-7463. Publicado en la Web 11.05.2009. Página 2560, "Experimental Section"; figuras 3,4. | 1-3,6-8 |
| X | LOZANO, N. y col. Surface tension and adsorption behavior of mixtures of diacyl glycerol arginine-based surfactants with DPPC and DMPC phospholipids. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1 Noviembre 2009, Vol. 74, Nº 1, páginas 67-74, ISSN 0927-7765. Página 68, párrafo "2.2. Preparations of samples"; página 69, tabla 1; página 72, tabla 4. | 1-3,6-8 |
| X | LOZANO, N. y col. Interaction studies of diacyl glycerol arginine-based surfactants with DPPC and DMPC monolayers, relation with antimicrobial activity. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 15 Abril 2008, Vol. 319, Nº 1-3, páginas 196-203, ISSN 0927-7757. Página 197, párrafo "2.1.Materials"; página 200, figuras 3,4; página 201, figura 5. | 1-3,6-8 |
| X | LOZANO, N. y col. Catanionic Vesicles Formed with Arginine-Based Surfactants and 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate Monosodium Salt. J. Phys. Chem. B. 2009, Vol. 113, Nº 18, páginas 6321–6327, ISSN 1520-6106. Todo el documento. | 1,4-9 |
| A | BENAVIDES, T. y col. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. Toxicology. 3 Mayo 2004, Vol. 197, Nº 3, páginas 229-237. Todo el documento. | 1-17 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

| | | |
|--|--------------------------------|---------------|
| Fecha de realización del informe 23.02.2011 | Examinador E. Albarán Gómez | Página 1/4 |
|--|--------------------------------|---------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/221 (01.01.2006)**A61K31/661** (01.01.2006)**A61P31/04** (01.01.2006)**A61P33/02** (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BEILSTEIN, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.02.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 10-17
Reivindicaciones 1-9

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 10-17
Reivindicaciones 1-9

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | LOZANO, N. y col. Dynamic Properties of Cationic Diacyl-Glycerol-Arginine-Based Surfactant/Phospholipid Mixtures at the Air/Water Interface. Langmuir, 2010, Vol. 26 , Nº 4, páginas 2559-2566, ISSN 0743-7463. Publicado en la Web 11.05.2009. | |
| D02 | LOZANO, N. y col. Surface tension and adsorption behavior of mixtures of diacyl glycerol arginine-based surfactants with DPPC and DMPC phospholipids. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 1 Noviembre 2009, Vol. 74, Nº 1, páginas 67-74, ISSN 0927-7765. | |
| D03 | LOZANO, N. y col. Interaction studies of diacyl glycerol arginine-based surfactants with DPPC and DMPC monolayers, relation with antimicrobial activity. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 15 Abril 2008, Vol. 319, Nº 1-3, páginas 196-203, ISSN 0927-7757. | |
| D04 | LOZANO, N. y col. Cationionic Vesicles Formed with Arginine-Based Surfactants and 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate Monosodium Salt. J. Phys. Chem. B. 2009, Vol. 113, Nº 18, páginas 6321–6327, ISSN 1520-6106. | |
| D05 | BENAVIDES, T. y col. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. Toxicology. 3 Mayo 2004, Vol. 197, Nº 3, páginas 229-237. | |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a una composición formada por un tensioactivo catiónico que es un diacilglicerol derivado de arginina de fórmula (I) y al menos un fosfolípido anfótero como el dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o un fosfolípido aniónico, a las composiciones farmacéuticas que comprenden esta composición y a su uso como medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias como *Staphylococcus aureus* o *Acinetobacter baumannii* o infecciones causadas por protozoo como *Leishmania donovani* o *Leishmania pifanoi*. En los ensayos descritos en la solicitud se utilizan los tensioactivos derivados de arginina:

1,2-dimiristoil-rac-glicero-3-O-(N-acetil-L-arginina) (1414RAc),

1,2-dilauroil-rac-glicero-3-O-(N-acetil-L arginina) (1212RAc),

y los correspondientes tensioactivos en los que el grupo amino esta sin acetilar denominados respectivamente: 1212R y 1414R.

Los documentos D01, D02 y D03 describen mezclas de tensioactivos diacil glicerol derivados de arginina, en concreto los surfactantes 1414RAc y 1212RAc junto con los fosfolípidos dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 8 de la presente solicitud carecen de novedad (Art.6.1 LP 11/1986).

El documento D04 divulga un estudio sobre la estabilidad de formaciones vesiculares que comprenden mezclas de cada uno de los tensioactivos 1414RAc y 1212RAc y el fosfolípido aniónico DPPA.

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1 y 4 a 9 de la presente solicitud carecen de novedad (Art.6.1 LP 11/1986).

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el uso de una composición formada por la mezcla de un tensioactivo catiónico con estructura de diacilglicerol derivado de arginina de fórmula (I) y un fosfolípido, ni la composición farmacéutica de la mencionada mezcla junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 10 a 17 de la presente solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).