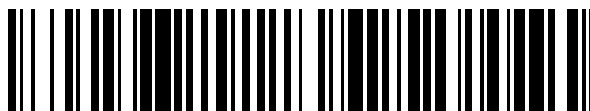


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 734**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2006 E 06842187 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1976863**

54 Título: **Péptidos cíclicos antimicrobianos**

30 Prioridad:

**22.12.2005 GB 0526120**  
**24.02.2006 US 776505 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.04.2013**

73 Titular/es:

**NOVABIOTICS LIMITED (100.0%)**  
**CRUICKSHANK BUILDING CRAIBSTONE**  
**ABERDEEN AB21 9TR, GB**

72 Inventor/es:

**O'NEIL, DEBORAH**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 400 734 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos cíclicos antimicrobianos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos cíclicos catiónicos y su uso en el tratamiento de infecciones microbianas.

10 **Antecedentes de la Invención**

10

Los péptidos antimicrobianos (AMP) conforman la piedra angular de la inmunidad eucariota y proporcionan una primera línea de defensa contra el traspaso de la piel y de las mucosas por micro-organismos. Ejemplos de AMP naturales incluyen las familias de péptidos de las defensinas y catelicidinas. Estos AMP son heterogéneos en longitud, secuencia y estructura, pero es común a la mayoría su pequeño tamaño, carga catiónica neta y estructura anfipática. Los péptidos antimicrobianos catiónicos y pequeños, se han aislado además de muchas bacterias, hongos, plantas, invertebrados y vertebrados y por lo tanto, parecen además jugar un papel en las defensas procariotas.

15

20

Los AMP naturales exhiben una actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y virus con envoltura. Los patógenos microbianos no parecen adquirir resistencia a estos péptidos catiónicos y como tal, los AMP se han conservado como moléculas vitales e innatas de defensa inmunológica del hospedero a través de milenios de evolución. No es de extrañar por lo tanto que los AMP se han implicado como posibles dianas para agentes terapéuticos para una amplia variedad de infecciones. Sin embargo, el hecho de que son técnicamente difíciles y costosos de producir en sistemas recombinantes y tienen potentes funciones biológicas quimiotácticas e inflamatorias descarta las formas naturales de AMP como agentes terapéuticos.

25

30

En el documento WO 2006/018652, hemos mostrado que los péptidos lineales ricos en ciertos residuos básicos tales como lisina o arginina poseen actividad antimicrobiana, y, particularmente, actividad antimicótica. Adicionalmente, el documento WO 2004/050685, describe péptidos que contienen arginina eficaces para inhibir el crecimiento de patógenos fúngicos y es un ejemplo adicional de péptidos con actividad antimicrobiana. Se mantiene, sin embargo, una necesidad de agentes adicionales que pueden usarse en el tratamiento o prevención de las infecciones microbianas.

35

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de un péptido cíclico que consiste de 3 a 15 aminoácidos arginina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección fúngica.

Los péptidos cíclicos de la invención son deseables como un agente terapéutico ya que son muy eficaces, proteolíticamente estables, prácticamente insensibles a sales, no hepatotóxicos, no hemolíticos y fáciles de sintetizar.

40

Se cree que la carga catiónica de los péptidos de la invención facilita la asociación del péptido con los grupos polares de las cabezas de las membranas microbianas. Se cree que la estabilización de los grupos cargados en una conformación más densa por la ciclación mejora esta atracción aumentando de ese modo la potencia antimicrobiana de los péptidos.

45

En un aspecto preferido de la invención el péptido consiste de 5 a 13 aminoácidos. Aún más preferidos son los péptidos que consisten de 3 a 7 aminoácidos, por ejemplo 7 aminoácidos.

50

Como se conoce por los expertos, los aminoácidos se pueden ubicar en diferentes clases dependiendo principalmente de las propiedades químicas y físicas de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, algunos aminoácidos se consideran generalmente como aminoácidos hidrófilos o polares y otros se consideran aminoácidos hidrófobos o no polares. El aminoácido hidrófobo puede seleccionarse del grupo de aminoácidos hidrófobos que consiste de glicina, leucina fenilalanina, prolina, alanina, triptófano, valina, isoleucina, metionina, tirosina y treonina; los aminoácidos catiónicos pueden seleccionarse del grupo que consiste de ornitina, histidina, arginina y lisina. Como se usa en la presente, los términos "hidrófobo" y "catiónico" pueden referirse a los aminoácidos que tienen una hidrofobicidad que es mayor que o igual a -1.10 y/o una carga neta que es mayor que o igual a 0, como se describe en Fauchere y Pliska Eur. J. Med Chem. 10:39 (1983). Un aminoácido hidrófobo o no polar puede además referirse a un aminoácido que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, es no polar y que generalmente se repele por una solución acuosa.

55

Los aminoácidos pueden ser de origen natural o sintéticos.

X y/o Y pueden ser isómeros ópticos de un aminoácido hidrófobo o catiónico como se define en la presente, por ejemplo, D- o L-aminoácidos. Preferentemente X y/o Y son D-aminoácidos.

60

En un aspecto preferido de la invención, el péptido consiste de al menos 90%, por ejemplo al menos 95% tal como 97-99% o incluso 100%, de D-aminoácidos.

En un aspecto preferido de la invención, el péptido consiste de al menos 90%, por ejemplo, al menos 95% tal como 97-99% o incluso 100%, de L-aminoácidos.

5 La invención incluye además isómeros conocidos (estructurales, estéreo, conformacionales & configuracionales), peptidomiméticos, análogos estructurales de los aminoácidos anteriores, y los modificados ya sea de forma natural (por ejemplo, una modificación post-traduccional) o químicamente, que incluyen, pero no exclusivamente, la fosforilación, glicosilación, sulfonilación y/o hidroxilación.

10 Además, la secuencia de aminoácidos del péptido puede modificarse a fin de resultar en una variante de péptido que incluye la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en el péptido por otro residuo de aminoácido, incluyendo las sustituciones que utilizan la forma D en lugar de la L.

15 Uno o más de los residuos del péptido puede cambiarse por otro para alterar, mejorar o preservar la actividad biológica del péptido. Tal variante puede tener, por ejemplo, al menos aproximadamente 10% de la actividad biológica del péptido invariante correspondiente. Los aminoácidos conservadores se utilizan frecuentemente, es decir, las sustituciones de aminoácidos con propiedades químicas y físicas similares como se describió anteriormente. Por lo tanto, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadores pueden involucrar el intercambio de lisina por arginina, ornitina o histidina; o el intercambio de arginina por lisina o isoleucina, ornitina por histidina; o el intercambio de un aminoácido hidrófobo por otro. Después de la introducción de las sustituciones, las variantes se examinan en cuanto a la actividad biológica.

20 El término "péptido", como se usa en la presente significa, en términos generales, una pluralidad de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Estos se usan de manera intercambiable y significan lo mismo que polipéptido y proteína.

25 En una modalidad de la invención, el péptido cíclico se selecciona del grupo que consiste de:

R-R-R-R-R-R

30 Los péptidos de la invención son generalmente péptidos sintéticos. Los péptidos pueden ser péptidos aislados, purificados o variantes de los mismos, que pueden sintetizarse *in vitro*, por ejemplo, por un método de síntesis de péptidos en fase sólida, por síntesis de péptidos catalizada por enzimas o con la ayuda de tecnología de ADN recombinante.

35 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para la preparación de un péptido de acuerdo con la invención, proceso que comprende ciclar un péptido de fórmula (I) o (II) por la reacción del péptido con un agente de acoplamiento.

40 El agente de acoplamiento puede ser cualquier agente capaz de formar un enlace peptídico entre los dos residuos aminoácidos terminales (C y N terminales) del péptido cuando está en su forma lineal, por ejemplo, entre dos cadenas principales o laterales de aminoácidos. La elección del agente de acoplamiento puede influir en la eficiencia de acoplamiento y por lo tanto en el rendimiento del péptido cíclico. Los ejemplos de agentes de acoplamiento útiles en el proceso de la invención se muestran en la Tabla 1 aunque un experto será consciente de otros agentes de acoplamiento conocidos que además son útiles en la invención. Preferentemente el agente de acoplamiento es HATU - O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N, N, N '-tetrametiluroniohexafluorofosfato.

45 Preferentemente la reacción entre el péptido y el agente de acoplamiento tiene lugar en presencia de una base. La base puede incluir, pero no se limita a, N-metilmorfolina (NMM) o diisopropil-etilamina (DIEA). Preferentemente, la reacción tiene lugar a pH alcalino, por ejemplo entre pH 8.5-9. El péptido puede modificarse para incluir un grupo protector antes de su reacción con el agente de acoplamiento. Los grupos de protección pueden incluir Pbf (2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo), tBu (t-butil-éter), Mtr (metoxitrimetilbenceno sulfonilo), Pmc (cloruro de 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo), Mbh (4,4-dimetiloxibencilhidruro), Tmob (2,4,6-trimetoxibencilo), Alloc (aliloxicarbonilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) y Boc (t-butiloxicarbonilo). Después de la reacción con el agente de acoplamiento, el grupo protector puede eliminarse mediante el clivaje del grupo protector bajo condiciones ácidas suaves, por ejemplo, en presencia de una solución de ácido trifluoroacético (TFA).

50 Durante la ciclación de la cadena principal de un péptido, el péptido se expone en el C-terminal del péptido lineal a un grupo de activación del agente de acoplamiento y mientras la reacción ocurre se produce un ceto-enol intermedio en el carbono alfa de este aminoácido. El enol (o alquenol) intermedio puede por lo tanto conducir a la producción de dos enantiómeros cuando el grupo de activación se elimina del carbono adyacente y se forma un enlace peptídico. Esta racemización, es decir, la formación de los respectivos enantiómeros del aminoácido individual (por ejemplo formas dextrógiras y levógiras (es decir, isómeros *d* y *l* respectivamente)) y la producción de diastereómeros del péptido como un todo, puede ocurrir en el sitio de ciclación tras la activación por el agente de acoplamiento usado. Dado que es

deseable para los péptidos de la invención ser enantioméricamente puros, la producción de diastereómeros no deseables debería reducirse o evitarse. Con el fin de reducir o prevenir esta producción de diastereómeros, y producir un péptido puro diastereoméricamente, el péptido de la invención puede modificarse para incluir una porción aquiral que evita la racemización de péptido durante la ciclación.

5 Así, en un aspecto preferido adicional de la invención el péptido de la invención, o el péptido definido en el proceso de la invención, se modifica para incluir una porción que evita la formación de diastereómeros peptídicos durante la ciclación. Como se usa en la presente un "péptido racémico" es uno que contiene cantidades (típicamente cantidades iguales) de los isómeros ópticos respectivos, por ejemplo, las formas dextrógiras y levógiras (es decir, isómeros *d* y *l* respectivamente), del aminoácido en el C terminal del péptido antes de la ciclación del péptido. La porción introducida en el péptido es generalmente un aminoácido aquiral que puede ser un aminoácido de origen natural o un análogo de aminoácido. El aminoácido aquiral puede seleccionarse del grupo que consiste en glicina, β-alanina, ácido 3-aminopropanoico, ácido 4-amino butírico, ácido 5-aminopentanoico y ácido 6-aminohexanoico. En una modalidad de la invención el péptido se modifica en el terminal C para incluir un aminoácido aquiral, por ejemplo glicina.

15 Así como modificar el péptido de la invención para incluir una porción, como se define en la presente, en el terminal C, la relación de los dos enantiómeros formados durante la ciclación del péptido depende de varios factores tales como el disolvente usado, el tiempo de incubación y la temperatura durante la ciclación (es decir la reacción con el agente de acoplamiento) y el grupo de activación usado para facilitar la ciclación.

20 La presente invención además se refiere a péptidos ciclados que se pueden obtener mediante el proceso de la invención.

25 En una modalidad de la invención, el péptido cíclico comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de:

R-R-R-R-R-R

DR-DR-DR-DR-DR-DR

30 Para identificar los péptidos activos que tienen poca o ninguna toxicidad no deseada para células de mamíferos, se pueden obtener péptidos individuales, o bibliotecas de péptidos, y los péptidos individuales o los péptidos de esas bibliotecas se pueden examinar en cuanto a la actividad antimicrobiana y la toxicidad, que incluye, pero no se limita a, actividad antimicótica, antibacteriana, antiviral, antiprotozoaria, antiparasitaria y toxicidad.

35 Los péptidos de la invención pueden existir en diferentes formas, tales como ácidos libres, bases libres, ésteres y otros profármacos, sales y tautómeros, por ejemplo, y la invención incluye todas las formas variantes de los compuestos.

40 Así, la invención abarca la sal o profármaco de un péptido o variante de péptido de la invención.

45 El péptido de la invención puede administrarse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales aceptables farmacéuticamente de la presente invención pueden sintetizarse a partir del péptido principal que contiene una porción básica o ácida mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácidas o bases libres del péptido con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ma ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos, 1985, p. 1418, cuya descripción se incorpora por este medio como referencia; ver además Stahl y otros, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002.

50 La invención incluye así sales aceptables farmacéuticamente del péptido de la invención en donde el compuesto principal se modifica haciendo sales ácidas o básicas del mismo por ejemplo las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos de tales sales ácidas de adición adecuadas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Las sales bases incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como calcio y sales de magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glutamina, y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina, y así sucesivamente. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes tales como haluros alquilo inferiores, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo,

etilo, propilo, y butilo; dialquilsulfatos como dimetil, dietil, dibutil; y diamilsulfatos, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros.

5 Las sales de grupos carboxilo de un péptido o una variante de péptido de la invención pueden prepararse de la manera habitual poniendo en contacto el péptido con uno o más equivalentes de una base deseada tal como, por ejemplo, una base de hidróxido metálico, por ejemplo hidróxido sódico; un carbonato o bicarbonato de metal tal como, por ejemplo, carbonato o bicarbonato de sodio, o una base amina tal como, por ejemplo, trietilamina, trietanolamina y similares.

10 La invención incluye profármacos para las especies farmacéuticas activas del péptido descrito, por ejemplo, en la cual uno o más grupos funcionales están protegidos o derivatizados pero pueden convertirse *in vivo* al grupo funcional, como en el caso de los ésteres de ácidos carboxílicos convertibles *in vivo* al ácido libre, o en el caso de las aminas protegidas, al grupo amino libre. El término "profármaco", como se usa en la presente, se representa en estructuras particulares que se transforman rápidamente *in vivo* la estructura principal, por ejemplo, por hidrólisis en sangre.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un péptido de la invención, o dos o más péptidos diferentes de la invención.

20 La composición además incluye un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, en su caso, un animal sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación razonable de beneficio/riesgo.

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

30 Un patógeno fúngico puede derivarse a partir de un hongo (que incluye levadura) seleccionado a partir de, pero no limitado a, los géneros *Candida* spp., (por ejemplo *C. albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp., (por ejemplo *T. rubrum* y *T. interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp. (por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*), *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomadura* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp. (por ejemplo, *Malassezia Furfur*), *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

40 En un uso preferido de acuerdo a la presente invención el patógeno fúngico es del género *Trichophyton* spp. o *Cryptococcus* spp. Por ejemplo, el patógeno fúngico puede ser *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* o *Cryptococcus neoformans*.

45 La infección fúngica puede ser una infección sistémica, tópica, subcutánea, cutánea o mucosal.

50 Las infecciones fúngicas tópicas de las uñas y la piel son causadas generalmente por dermatofitos aunque algunos no dermatofitos tales como las levaduras pueden además causar infecciones de la piel. La infección por dermatofitos puede incluir una infección por tiña, por ejemplo, *Tinea barbae* (barba), *Tinea capitis* (cabeza), *Tinea corporis* (cuerpo), *Tinea cruris* (ingle), *Tiña faciei* (cara), *Tinea manuum* (mano), *Tinea pedis* (pie), *Tinea unguium* (uñas), *Tinea versicolor* (pitiriasis), *Tinea incognita* o *Tinea nigra*. La infección puede derivarse a partir de hongos del género *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton* spp. (por ejemplo, *T. rubrum* y *T. interdigitale*).

55 La infección por dermatofitos puede ser una infección de la piel, defectos, el estrato córneo, las uñas (uñas de las manos y de los pies) o el cabello. De particular mención son las infecciones dermatofíticas causadas por un dermatofito del género *Trichophyton*, *Epidermophyton* o *Microsporum*. Los dermatofitos ilustrativos incluyen *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum nanum*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum distortum*, *Microsporum fulvum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *nodulare*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton soudanese*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton megnini*, *Trichophyton schoenlenii*, *Trichophyton gallinae*, *Trichophyton kraidenii*, *Trichophyton yaoundei*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton erinacei* y *Trichophyton verrucosum*.

60 En una modalidad particular de la invención, la infección por dermatofitos es la onicomicosis. El término "onicomicosis"

incluye, pero no se limita a, tipos de onicomicosis subungueal distal lateral, blanca superficial, subungueal blanca proximal, distrófica secundaria, distrófica primaria, endonyx, por candida (por ejemplo, onicolisis & enfermedad mucocutánea crónica) y Tinea unguium.

5 Los hongos no dermatofitos asociados con la onicomicosis incluyen *Aspergillus* spp. *Cephalosporum* spp. *Fusarium oxysporum*, *Scopularis brevicaulis*, *Scytalidium* spp.

10 Los péptidos de la invención son péptidos antimicrobianos potentes para una amplia variedad de organismos patógenos. Sin embargo, los péptidos de la invención pueden además ser útiles en el tratamiento de otras condiciones que incluyen, pero no se limitan a, condiciones asociadas con infecciones de las mucosas, por ejemplo, fibrosis quística, gastrointestinal, urogenital, urinaria (por ejemplo, infección de los riñones o cistitis) o infecciones respiratorias.

15 Los péptidos de la invención pueden además ser útiles en el tratamiento o la prevención de infecciones asociadas, típicamente con la piel, que incluyen, entre otras, las heridas, las úlceras y las lesiones, por ejemplo, las heridas cutáneas tales como cortaduras o quemaduras, y las condiciones asociadas con las mismas.

20 El término "tratamiento" se refiere a los efectos de los péptidos descritos en la presente que confieren un beneficio a pacientes afligidos con una enfermedad (infecciosa), incluyendo una mejora en la condición del paciente o un retraso en la progresión de la enfermedad.

25 Los péptidos de la invención pueden encontrar además aplicación como/en un desinfectante. En este contexto, el péptido o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden aplicarse, ya sea solo o en combinación con otros agentes desinfectantes, a una superficie a tratar. Como se usa en la presente una "superficie a tratar" puede ser un sustrato como se define en la presente o un dispositivo médico.

30 Los mamíferos, las aves y otros animales pueden ser tratados con los péptidos, las composiciones o los métodos descritos en la presente. Tales mamíferos y aves incluyen humanos, perros, gatos y ganado, tales como caballos, ganado vacuno, ovejas, cabras, pollos y pavos y similares. Aún más, las plantas pueden tratarse además con los péptidos, composiciones o métodos de la invención.

Donde el sujeto es un animal, el método de la invención puede aplicarse en características similares a uñas, que incluyen, pero no de modo exclusivo a, pezuñas, garras y cascos.

35 La invención puede incluir, además del tratamiento con péptidos, los tratamientos que pueden mejorar la permeabilidad del péptido en la uña. Esto podría facilitarse por medios químicos o físicos. Los tratamientos físicos, tales como el grabado químico de uñas o el limado de la capa dorsal de la uña pueden aumentar la permeabilidad de los péptidos de la invención. La mejora química de la permeabilidad de las uñas a los péptidos de la invención puede lograrse rompiendo los enlaces físicos o químicos dentro de la queratina de la placa de la uña. Los agentes de reblandecimiento de uñas, que incluyen, pero no de modo exclusivo, a la urea y al ácido salicílico, aumentan la hidratación de la uña para disminuir la densidad de la uña y, por lo tanto, pueden aumentar la permeabilidad a los péptidos de la invención. Los compuestos que contienen grupos sulfhidrilo escindirán los enlaces disulfuro en la queratina de la uña, y pueden conducir a la desestabilización y el aumento de la permeabilidad de los fármacos.

45 Para lograr el(los) efecto(s) deseado(s), el péptido, una variante del mismo o una combinación de los mismos, puede administrarse como dosificaciones únicas o divididas, por ejemplo, de al menos aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 500 a 750 mg/kg, de al menos aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 300 a 500 mg/kg, al menos aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 100 a 300 mg/kg o al menos aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 a 100 mg/kg del peso corporal o al menos aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal, aunque otras dosificaciones pueden proporcionar resultados beneficiosos. La cantidad administrada variará en dependencia de diversos factores que incluyen, pero no se limitan a, el péptido elegido y sus efectos clínicos, la enfermedad, el peso, la condición física, la salud, la edad del mamífero, si se desea lograr la prevención o el tratamiento, y si el péptido se modifica químicamente.

55 La administración de los agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención puede ser en una dosis única, en múltiples dosis, de manera continua o intermitente, en dependencia de, por ejemplo, la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por los expertos. La administración de los péptidos de la invención puede ser prácticamente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas. Se contemplan tanto la administración local como la sistémica.

60 Para preparar la composición, los péptidos se sintetizan o se obtienen de cualquier otra forma, se purifican según se necesite o se desee, y después se liofilizan y se estabilizan. El péptido puede ajustarse después a la concentración apropiada y opcionalmente se combina con otros agentes. El peso absoluto de un péptido dado incluido en una dosis

unitaria puede variar ampliamente. Por ejemplo, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 2 g o aproximadamente 0.01 a aproximadamente 500 mg, de al menos un péptido de la invención, o una pluralidad de péptidos específicos para un tipo de célula particular puede ser de aproximadamente 0.01 g a aproximadamente 35 g, de aproximadamente 0.1 g a aproximadamente 25 g, de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 12 g, de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 8 g, de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 4 g, o de aproximadamente 0.5 g a aproximadamente 2 g.

Así, una o más formas de dosificación unitaria adecuadas que comprenden los péptidos terapéuticos de la invención pueden administrarse por una variedad de rutas incluyendo las rutas oral, parenteral (que incluye la subcutánea, la intravenosa, la intramuscular y la intraperitoneal), rectal, dérmica, transdérmica, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratoria). Los péptidos terapéuticos pueden formularse además en una formulación de lípidos o para la liberación sostenida (por ejemplo, mediante microencapsulado, ver documento WO 94/07529, y la patente de Estados Unidos. núm. 4,962,091). Las formulaciones pueden, donde sea adecuado, presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria discretas y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en materia farmacéutica. Tales métodos pueden incluir la etapa de mezclar el agente terapéutico con vehículos líquidos, matrices sólidas, vehículos semisólidos, vehículos sólidos divididos finamente o combinaciones de los mismos, y después, si es necesario, introducir o dar forma al producto en el sistema de suministro deseado.

Cuando los péptidos terapéuticos de la invención se preparan para administración oral, generalmente se combinan con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una formulación farmacéutica, o una forma de dosificación unitaria. Para la administración oral, los péptidos pueden presentarse como un polvo, una formación granular, una solución, una suspensión, una emulsión o en un polímero o resina natural o sintético para la ingestión de los ingredientes activos a partir de una goma de mascar. Los péptidos activos se pueden presentar además como un bolo, electuario o pasta. Los péptidos terapéuticos de la invención administrados por vía oral pueden formularse además para una liberación sostenida, por ejemplo, los péptidos pueden depositarse de modo recubierto, micro-encapsulado, o de cualquier otra forma dentro de un dispositivo de suministro sostenido. Los ingredientes activos totales en tales formulaciones comprenden de 0.1 a 99.9% en peso de la formulación.

Las formulaciones farmacéuticas que contienen los péptidos terapéuticos de la invención pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la materia usando ingredientes bien conocidos y fácilmente disponibles. Por ejemplo, el péptido pueden formularse con excipientes, diluyentes, o vehículos comunes, y formar comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, polvos, aerosoles y similares. Los ejemplos de excipientes, diluyentes, y vehículos que son adecuados para tales formulaciones incluyen amortiguadores, así como materiales de relleno y extensores tales como almidón, celulosa, azúcares, manitol y derivados silícicos. Además pueden incluirse agentes aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa y otros derivados de celulosa, alginatos, gelatina, y polivinilpirrolidona. Pueden incluirse agentes hidratantes tales como glicerol, agentes desintegrantes tales como carbonato de calcio y bicarbonato de sodio. Pueden incluirse además agentes para retardar la disolución, tales como parafina. Además pueden incluirse los aceleradores de la reabsorción tales como los compuestos de amonio cuaternario. Los agentes activos de superficie tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol pueden incluirse. Pueden añadirse vehículos adsorbentes tales como caolín y bentonita. Pueden incluirse además lubricantes tales como talco, calcio y estearato de magnesio, y polietilenglicoles sólidos. Se pueden añadir además conservantes. Las composiciones de la invención pueden contener además agentes espesantes tales como celulosa y/o derivados de la celulosa. Además pueden contener gomas tales como goma de xantano, goma guar o carbo o goma arábiga, o alternativamente polietilenglicoles, bentonitas y montmorillonitas, y similares.

Por ejemplo, los comprimidos o pastillas que contienen los péptidos de la invención pueden incluir agentes amortiguadores tales como carbonato de calcio, óxido de magnesio y carbonato de magnesio. Los agentes amortiguadores adecuados pueden incluir además ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal. Las pastillas o comprimidos pueden incluir además ingredientes inactivos tales como celulosa, almidón pregelatinizado, dióxido de silicio, hidroxipropil metil celulosa, estearato magnésico, celulosa microcristalina, almidón, talco, dióxido de titanio, ácido benzoico, ácido cítrico, almidón de maíz, aceite mineral, polipropilenglicol, fosfato sódico, estearato de zinc, y similares. Las cápsulas de gelatina duras o blandas que contienen al menos un péptido de la invención pueden contener ingredientes inactivos tales como gelatina, celulosa microcristalina, laurilsulfato de sodio, almidón, talco, y dióxido de titanio, y similares, así como vehículos líquidos tales como polietilenglicoles (PEG) y aceite vegetal. Además, las pastillas o comprimidos con recubierta entérica que contienen uno o más péptidos de la invención están diseñados para resistir la desintegración en el estómago y disolverse en el medio más neutro o alcalino del duodeno.

Los péptidos terapéuticos de la invención pueden formularse además como elixires o soluciones para una administración oral conveniente o como soluciones apropiadas para administración parenteral, por ejemplo por las vías intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intravenosa. Las formulaciones farmacéuticas de los péptidos terapéuticos de la invención además pueden tomar la forma de una solución o dispersión acuosa o anhidra, o alternativamente la forma de una emulsión o suspensión o bálsamo.

5 Así, los péptidos terapéuticos pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosis unitaria en ampulas, jeringas pre-cargadas, recipientes de infusión de pequeño volumen o en contenedores de múltiples dosis. Los péptidos activos y otros ingredientes pueden formar suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes para suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, los péptidos activos y otros ingredientes pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización a partir de la solución por constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

10 Estas formulaciones pueden contener vehículos, portadores y adyuvantes aceptables farmacéuticamente, que son bien conocidos en la materia. Es posible, por ejemplo, preparar soluciones usando uno o más solvente(s) orgánico(s) que es/son aceptable(s) desde el punto de vista fisiológico, elegido(s) a partir de solventes tales como acetona, ácido acético, etanol, alcohol isopropílico, dimetilsulfóxido, éteres de glicol tales como los productos vendidos bajo la denominación "Dowanol", poliglicoles y polietilenglicoles, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> ésteres de alquilo de ácidos de cadena corta, lactato de etilo o isopropilo, triglicéridos de ácidos grasos tales como los productos comercializados bajo la denominación de "Miglyol", miristato de isopropilo, aceites animal, mineral y vegetal y polisiloxanos.

20 Los solventes o diluyentes que comprenden los péptidos de la invención pueden incluir soluciones ácidas, dilataetilsulfona, N-(2-mercaptopropionil) glicina, 2-n-nonil-1,3-dioxolano y alcohol etílico. Preferentemente el solvente/diluyente es un solvente ácido, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido bórico, ácido láctico, ácido propiónico, ácido fosfórico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido succínico o ácido tartárico.

25 Se consideran además los productos de combinación que incluyen uno o más péptidos de la presente invención y uno u otros agentes antimicrobianos o antimicóticos, por ejemplo, polienos tales como anfotericina B, complejo lipídico de anfotericina B (ABCD), anfotericina B liposomal (L-AMB), y nistatina liposomal, azoles y triazoles tales como voriconazol, fluconazol, ketoconazol, itraconazol, pozaconazole y similares; inhibidores de la glucano sintasa tales como la caspofungina, la micafungina (FK463), y la V-equinocandina (LY303366); griseofulvina; alilaminas tales como la terbinafina; flucitosina u otros agentes antimicóticos, incluyendo aquellos descritos en la presente invención. Adicionalmente, se considera que los péptidos pueden combinarse con agentes antimicóticos tópicos tales como ciclopiroxolamina, haloprogina, tolnaftato, undecilenato, nistatina tópica, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina y otros agentes tópicos.

35 Adicionalmente, los péptidos pueden formularse como formas de dosificación de liberación sostenida y similares. Las formulaciones pueden estar constituidas de manera que liberen el péptido activo, por ejemplo, en una parte determinada del tracto intestinal o respiratorio, posiblemente durante un periodo de tiempo. Los recubrimientos, envolturas, y matrices protectoras pueden prepararse, por ejemplo, a partir de sustancias poliméricas, tales como polilactida-glicolatos, liposomas, microemulsiones, micropartículas, nanopartículas, o ceras. Estos recubrimientos, envolturas, y matrices protectoras son útiles para recubrir dispositivos permanentes, por ejemplo, stents, catéteres, tubos de diálisis peritoneal, dispositivos de drenaje y similares.

45 Para la administración tópica, los agentes activos se pueden formular como se conoce en la materia para la aplicación directa a un área de interés. Las formas acondicionadas mayormente para la aplicación tópica toman la forma, por ejemplo, de cremas, leches, geles, polvos, dispersión o microemulsiones, lociones con mayor o menor grado de espesor, almohadillas impregnadas, pomadas o palitos, formulaciones de aerosol (por ejemplo atomizadores o espumas), jabones, detergentes, lociones o pastillas de jabón. Otras formas convencionales para este propósito incluyen apósitos para heridas, vendas recubiertas u otros revestimientos de polímeros, pomadas, cremas, lociones, pastas, jaleas, atomizadores, y aerosoles. Así, los péptidos terapéuticos de la invención pueden suministrarse a través de parches o vendajes para la administración dérmica. Alternativamente, el péptido puede formularse para ser parte de un polímero adhesivo, tal como poliacrilato o copolímero de acrilato/acetato de vinilo. Para aplicaciones a largo plazo podría desearse utilizar un material laminar de soporte microporoso y/o transpirable, de manera que pueden minimizarse la hidratación o ablandamiento de la piel. La capa de soporte puede ser de cualquier espesor apropiado que proporcione la protección deseada y las funciones de sostén. Un espesor adecuado generalmente será de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 micrómetros.

55 La administración tópica puede ser en la forma de un esmalte de uñas o laca. Por ejemplo, los péptidos antimicóticos pueden formularse en una solución para administración tópica que contiene acetato de etilo (NF), alcohol isopropílico (USP), y butil monoéster de poli[metilvinil éter/ácido maleico] en alcohol isopropílico.

60 Las formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden comprender, por ejemplo, una solución salina amortiguada aceptable fisiológicamente que contiene entre aproximadamente 0.001 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo entre 0.1 mg/ml y 10 mg/ml, de uno o más de los péptidos de la presente invención específica para la indicación o enfermedad a tratar.



5 Las pomadas y cremas pueden formularse, por ejemplo, con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y contendrán generalmente además uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes. Los péptidos activos pueden además suministrarse vía iontoforesis, por ejemplo, como se describe en las patentes de Estados Unidos núm. 4,140,122; 4,383,529; o 4,051,842. El porcentaje en peso de un agente terapéutico de la invención presente en una formulación tópica dependerá de varios factores, pero generalmente será de 0.01 % a 95% del total del peso de la formulación, y típicamente 0.1-85% en peso.

10 Las gotas, tales como gotas oculares o gotas nasales, pueden formularse con uno o más de los péptidos terapéuticos en una base acuosa o no acuosa que además comprende uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes o agentes de suspensión. Los vaporizadores líquidos se pueden bombear, o se suministran convenientemente a partir de envases presurizados. Las gotas se pueden suministrar a través de un frasco simple con tapón cuentagotas, a través de una botella plástica adaptada para suministrar contenidos líquidos a manera de gotas, o a través de un cierre diseñado especialmente.

15 El péptido terapéutico puede además formularse para la administración tópica en la boca o la garganta. Por ejemplo, los ingredientes activos pueden formularse como una gragea que además comprende una base saborizante, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden la composición en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden la composición de la presente invención en un vehículo líquido adecuado.

20 Los ejemplos específicos no limitantes de los vehículos y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua y soluciones salinas amortiguadas aceptables fisiológicamente tales como soluciones salinas amortiguadas con fosfato a pH 7.0-8.0.

25 Los péptidos de la invención pueden administrarse además al tracto respiratorio. Para la administración por inhalación o insuflación, la composición puede tomar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla de polvo del agente terapéutico y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Los péptidos terapéuticos de la presente invención además pueden administrarse en una solución acuosa cuando se administra en forma inhalada o de aerosol. Así, otras formulaciones farmacéuticas en aerosol pueden comprender, por ejemplo, una solución salina amortiguada aceptable fisiológicamente que contiene entre aproximadamente 0.001 mg/ml y aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo entre 0.1 y 100mg/ml, tales como 0.5-50mg/ml; 0.5-20mg/ml, 0.5-10mg/ml, 0.5-5mg/ml o 1-5mg/ml de uno o más de los péptidos de la presente invención específicos para la indicación o enfermedad a tratar.

30 A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan "que incluyen pero no se limitan a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas.

35 A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la especificación, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

40 Los elementos, enteros, características, compuestos, grupos o porciones químicas descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente a menos que sea incompatible con éste.

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos

50 Ejemplo 1 (solamente para propósitos ilustrativos)

55 La ciclación de un péptido de polilisina de 7 aminoácidos se llevó a cabo mediante la disolución de 1eq del péptido protegido con 1eq (eq = volumen equivalente) de HATU en DMF (dimetilformamida) a 100mg/ml. Para aumentar el pH se añadieron 2.5eq de DIEA (diisopropiletilamina) y el progreso de la reacción se siguió por HPLC. Cuando finalizó, el péptido se precipitó en agua y se lavó en agua adicional. Después el péptido se secó y se desprotegió con ácido fluorhídrico para producir el péptido cíclico final. La cromatografía de intercambio iónico se utiliza después para sustituir el ácido fluorhídrico solvente con ácido acético antes de la liofilización.

60 Ejemplo 2

La ciclación de un péptido de poliarginina de 7 aminoácidos se llevó a cabo mediante la combinación del 1eq de péptido protegido con 5eq de NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sodio) y 2eq de PyBOP disueltos en DMF a 28.5mg/ml. La reacción se

siguió por TLC y cuando finalizó, el péptido se precipitó en agua y se lavó en agua adicional. El péptido se secó después y se desprotegió con ácido fluorhídrico para producir el péptido cíclico final. La cromatografía de intercambio iónico se utiliza después para sustituir el ácido fluorhídrico solvente con ácido acético antes de la liofilización.

5 Ejemplo 3

Ciclación de un péptido de poliarginina de 7 aminoácidos:

10 Una solución 1: 57 mg de HBTU (PM=379.3, 0.15 mmol) o 57 mg de HATU (M=380.3, 0.15 mmol) y 60 µl de 0.92mg/ml NMM (n-metilmorfolina, PM=101.2, 0.55 mmol) se disolvió en 2.86 ml de DMF.  
Una solución 2: 288 mg de H-[Arg(Pbf)]<sub>7</sub>-OH (PM=2877.6, 0.1 mmol) (péptido de poliarginina de 7 aminoácidos ) se disolvió en 0.71 ml de DMF.

15 La solución 2 se añadió en forma de gotas a la solución 1 durante 30 min. El pH se comprobó mediante papel de pH humedecido y debe ser 8.5-9. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche\*. La mezcla se concentró al vacío. Se añadió una solución de NaHCO<sub>3</sub> (5%). El precipitado del ciclopéptido protegido se filtró y se lavó con agua. Se obtuvieron 150-200 mg. El clivaje de los grupos Pbf se realizó en TFA/agua (95/5, v/v) (10 ml para 1 g de ciclopéptido protegido). La mezcla se concentró y se añadió IPE para precipitar el producto crudo. Se obtuvieron 100-110 mg de cicloArg bruto.

20 (\*El acoplamiento usando HATU se completó después de 5 horas. La cantidad de NMM depende en exceso del TFA en H-[Arg(Pbf)]<sub>7</sub>-OH).

25 Los péptidos cíclicos se sintetizaron para que fueran al menos 95% enantioméricamente puros, y tiendan a variar entre 97 y 99%. Estos son al menos 95% enantioméricamente puros cuando se sintetizaron por este método.

Pruebas de susceptibilidad antimicótica por dilución en caldo

30 La sensibilidad de las cepas de hongos aplicables a los péptidos ciclados se determinó usando los estándares aprobados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, antes NCCLS). La susceptibilidad fúngica se estudió usando el "Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antimicótica por dilución en caldo para hongos filamentosos; estándar aprobado M38-F", y la susceptibilidad de levaduras se estudió utilizando el "Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antimicótica por dilución en caldo para levaduras, estándar aprobado - M27-A segunda edición".

35 Pruebas de susceptibilidad antibacteriana por dilución en caldo

40 La sensibilidad de las cepas bacterianas aplicables a la péptidos ciclados se determinó usando las normas aprobados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI; antes NCCLS). La susceptibilidad bacteriana se estudio usando los "Métodos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen anaeróbicamente; Norma aprobada - M7-A7 séptima edición".

Ensayos de hemólisis

45 El péptido en estudio se dividió en alícuotas a la concentración deseada por triplicado en placas Nunc de 96 pocillos y se prepararon diluciones 1:1 seriadas (100µl). Se añadieron 100µl de una mezcla lavada (3 lavados de 50 ml de HBSS) de glóbulos rojos humanos (RBC) (1x10<sup>8</sup> RBC/ml) a los pocillos de ensayo y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Después de la incubación se añadieron 100µl adicionales de HBSS a todos los pocillos y la placa se incubó a 4°C durante toda la noche. Se tomaron 100µl del sobrenadante y se colocaron en una placa de microtitulación que se leyó en un lector de placas Sunrise (Tascam) a 450/620nm. Además se incluyeron pocillos controles (por cuadruplicado) del amortiguador solo, del amortiguador y RBC, y H<sub>2</sub>O y RBC. Los datos se graficaron y se analizaron estadísticamente usando Graph Pad (paquete de programas Prism).

55 Resultados

Secuencia de los péptidos ciclados

La secuencia analizada de los péptidos es como sigue:

Péptido 1:	Cíclico-K-K-K-K-K-K-K*
Péptido 2:	Cíclico-R-R-R-R-R-R-R

Péptido 3:	Cíclico-K-K-K-K-K-K-G*
Péptido 4:	Cíclico-R-R-R-R-R-R-G
Péptido 5:	Cíclico-O-O-O-O-O-O-G*
Péptido 6:	<u>Cíclico-DR-DR-DR-DR-DR-DR-G</u>
Péptido 7:	Cíclico-DO-DO-DO-DO-DO-DO-G*
Péptido 8:	Cíclico-DK-DK-DK-DK-DK-DK-G*
* solamente para propósitos ilustrativos	

El prefijo 'D-' indica un isómero D del aminoácido que se usó en la síntesis del péptido. 'O' representa el aminoácido no natural ornitina.

5

Se sintetizaron los péptidos cíclicos que consisten de 3, 5, 9, 11, 13 o 15 aminoácidos de arginina o lisina y se determinó la actividad (datos no mostrados).

Actividad antibacteriana de los péptidos ciclados (solo para fines ilustrativos)

10

Se expusieron cultivos de *E. coli* y *Staphylococcus aureus* al péptido 1 y la MIC fue de 1 mM después del crecimiento durante las siguientes 16 horas a 37°C para ambos organismos (Tabla 2). El Péptido 1 inhibe totalmente el crecimiento tanto de *E. coli* como de *Staphylococcus aureus* a esta concentración.

15

Este experimento se repitió con el Péptido 2. La MIC para el Péptido 2 frente a *E. coli* fue de 0.1 mM; la MIC para el Péptido 2 frente a *S. aureus* fue de 1.0 mM. Esto indica un impacto significativo de los péptidos ciclados sobre la actividad bacteriana.

20

Los péptidos lineales que se corresponden en tamaño a los péptidos 1 y 2 demostraron una actividad significativamente menor que los péptidos 1 y 2 respectivamente.

Actividad antimicótica de los péptidos ciclados frente a *Trichophyton rubrum*

25

Se estudió la susceptibilidad de *T. rubrum* a los péptidos 1-8. El Péptido 1 demostró una MIC de 0.1 mM frente a los cultivos de *T. rubrum* (tabla 2). El Péptido 2 demostró una MIC de 0.25 mM frente a los cultivos de *T. rubrum*.

Los péptidos lineales que se corresponden en tamaño a los péptidos 1 y 2 demostraron una actividad significativamente menor que los péptidos 1 y 2 respectivamente.

30

Los Péptidos 3 - 8 tenían un residuo único de glicina insertado en el anillo del péptido cíclico. Así, los Péptidos 3 - 8 son de 8 aminoácidos de longitud, en comparación con los 7 aminoácidos de los Péptidos 1 - 2. Todos los péptidos del 3 - 6 demostraron actividad antimicótica contra *T. rubrum* (MIC (mM) 4.0, 2.0, 4.0, 1.0, respectivamente). Los Péptidos 7 - 8 no demostraron actividad antimicótica contra *T. rubrum* a las concentraciones máximas ensayadas (4 mM).

35

Los Péptidos 3 - 6 demuestran actividad antimicótica, pero la introducción del aminoácido no catiónico glicina reduce significativamente la actividad antimicótica. Por ejemplo, esto se puede ver en la actividad del péptido 2 (sin glicina; MIC = 0.2 mM) en comparación con el Péptido 4 (adición de glicina; MIC = 2.0 mM) (tabla 2). Estos datos muestran que la actividad antimicótica está presente en los péptidos cíclicos tanto de 7 como de 8 aminoácidos de longitud, pero los péptidos con menor cationicidad son menos antimicóticos hacia *T. rubrum*.

40

Inhibición de *Trichophyton interdigitale* mediante péptidos ciclados

Se estudió la susceptibilidad de *T. interdigitale* a los péptidos 2 - 8. La actividad antimicótica de los péptidos 2 - 8 contra *T. interdigitale* se muestra en la tabla 2. Los péptidos 2, 4 y 6 son activos hacia *T. interdigitale*.

45

Inhibición de *Cryptococcus neoformans* mediante péptidos ciclados

Se estudió la susceptibilidad de *C. neoformans* a los péptidos 4 y 6 - 8 usando el "Método de referencia para pruebas de susceptibilidad antimicótica por dilución en caldo para levaduras, estándar aprobado - M27-A segunda edición". La tabla 2 demuestra que los péptidos cíclicos catiónicos 4 y 6 - 8 son antimicóticos frente a la levadura patógena *C. neoformans* (MIC = 1.0 mM, 0.5 mM, 2.0 mM y 0.5 mM, respectivamente).

50

Actividad antimicrobiana del Péptido 2 frente a patógenos microbianos seleccionados (sólo con fines ilustrativos)

En la Tabla 3 se demuestra la actividad antimicrobiana del Péptido 2 contra 60 patógenos microbianos seleccionados. Como puede verse, se observa de forma consistente mayor actividad antimicrobiana (es decir MIC más bajas) contra hongos, en especial los dermatofitos, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Malassezia furfur*, non-albicans *Candida* spp y la bacteria *E. coli*.

Efecto del uso de aminoácidos enantioméricos en los péptidos ciclados

En la Tabla 2 se demuestra la comparación del efecto inhibitorio de los péptidos todo-L y todo-D cíclicos catiónicos. Los Péptidos 4 y 6 son péptidos todo-L y todo-D cíclicos catiónicos equivalentes que contienen los aminoácidos arginina (7 aa) y glicina (1 aa). La actividad antimicótica contra *T. rubrum* es mayor para la variante todo-D que para la variante todo-L (MIC = 1.0 y 2.0 mM, respectivamente). La actividad antimicótica contra *T. interdigitale* es mayor para la variante todo-D que para la variante todo-L (MIC = 0.25 mM y 0.5, respectivamente). La actividad antimicótica contra la levadura *C. neoformans* es mayor para la variante todo-D que para la variante todo-L (MIC = 0.5 mM y 1.0, respectivamente). Esto indica que la variante todo-D de este péptido es más activa que la variante todo-L. Los péptidos 3 y 8 son péptidos todo-L y todo-D cíclicos catiónicos equivalentes que contienen los aminoácidos lisina (7 aa) y glicina (1 aa). La actividad antimicótica contra *T. rubrum* es mayor para la variante todo-L que para la variante todo-D (MIC = 4.0 y >4.0 mM, respectivamente). Ningún péptido demuestra actividad antimicótica contra *T. interdigitale* (MIC >4.0 mM para ambos péptidos).

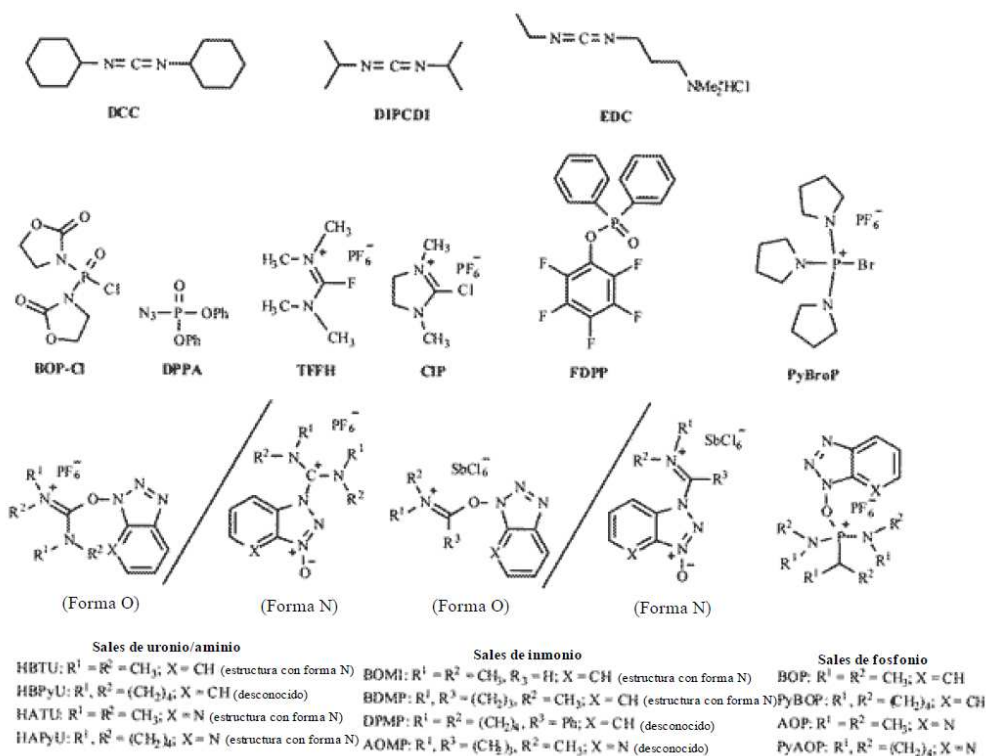
Actividad hemolítica de los péptidos ciclados

Las actividades hemolíticas de los péptidos cíclicos catiónicos (Tabla 4) son insignificantes a concentraciones superiores a las que demuestran actividad antimicótica.

Hepatotoxicidad de los péptidos ciclados

Los Péptidos 2, 9 y 10 no muestran hepatotoxicidad a concentraciones similares a las que demuestran actividad antimicótica.

**Tabla 1 – Agentes de acoplamiento**



**Tabla 2: Actividad antimicrobiana (MIC; mM) de los péptidos ciclados frente a patógenos microbianos seleccionados**

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

**Tabla 3: Actividad antimicrobiana (MIC; mM) del péptido 2 frente a agentes microbianos seleccionados**

Hongo	Número	MIC (mM)	Bacteria	Número	MIC (mM)
<i>T. rubrum</i>	NCPF118	0.25	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	NCTC10442	0.25
<i>T. rubrum</i>	7 aislados clínicos <sup>2</sup>	0.5-1.0	<i>S. aureus</i> <sup>3</sup>	NCTC6571	>1.9
<i>T. interdigitale</i>	NCPF335	<0.125	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	NCTC 10788	>1.9
<i>T. mentagrophytes</i>	DM2006 978	0.5	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	ATCC12598	0.95
<i>T. mentagrophytes</i>	DM2006 1023	0.5	<i>S. atreus</i> <sup>2</sup>	NCTC8325	>1.9
<i>M. furfur</i>	DSM6170	0.031	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	Col	0.95
<i>S. brevicaulis</i>	NCPF2177	0.5	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	N315	0.95
<i>S. brevicaulis</i>	DM2006 1025	0.5	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	ANS46	0.95
<i>A. niger</i>	NCPF2022	0.5	<i>S. aureus</i> <sup>1</sup>	MW2	0.95
<i>A. terreus</i>	NCPF2729	>2	<i>S. aureus</i>	16 aislados clínicos <sup>4</sup>	>3.8
<i>Fusarium oxysporum</i>	NCPF2722	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC27853	>1.9
<i>Fusarium spp</i>	DM2006 294	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	DSM50071	>2
<i>Fusarium spp</i>	DM2006 495	>2	<i>Ps. aeruginosa</i>	ATCC27853	>2
<i>Fusarium spp</i>	DM2006 1026	>2	<i>B. cepacia</i>	ATCC25609	>1.9
<i>C. albicans</i>	NCTC3179	>2	<i>E. coli</i>	NCTC12900	0.1
<i>C. albicans</i>	ATCC24433	>2			
<i>C. albicans</i>	ATCC90028	>2			
<i>C. albicans</i>	AM2003-020	>2			
<i>C. albicans</i>	IHEM3742	>2			
<i>C. albicans</i>	s20122.073	>2			
<i>C. krusei</i>	NCPT3953	0.128-0.256			
<i>C. krusei</i>	ATCC6258	0.125			
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC22019	0.25			
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC90018	1.0			

<sup>1</sup> MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina)

<sup>2</sup> Números de referencia: DM2006 517; DM2006 902; DM2006 932; DM2006 953; DM2006 1008; DM2006 1093; DM2006 1377

<sup>3</sup> MSSA (*S. aureus* sensible a meticilina)

## ES 2 400 734 T3

Hongo	Número	MIC (mM)	Bacteria	Número	MIC (mM)
<sup>4</sup> Números de referencia: 97.2935.K; 98.1695.K; 97.2637.D; 98.2028.X; 05.5240.R; 00.9523.R; 03.8996.T; 98.1515.F; 00.5472.R; 00.1039.P; 02.6225.E; 03.3200.J; 01.7995.S; 03.8951.G; 00.9521.M; 97.1636.D					

**Tabla 4: Actividad hemolítica de los péptidos seleccionados frente a glóbulos rojos**

Péptido	Máxima concentración probada (mM)	Hemólisis
1		
2	73.7	Ninguno
3	10.0	Ninguno
4	10.0	Ninguno
5	10.0	Ninguno
6	5.0	Ninguno
7	10.0	Ninguno
8	10.0	Ninguno

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Uso de un péptido cíclico que consiste de 3 a 15 aminoácidos de arginina en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una infección fúngica.
2. El uso como se reivindicó en la reivindicación 1 en donde el péptido consiste de 5 a 13 aminoácidos.
3. El uso como se reivindicó en la reivindicación 1 en donde el péptido consiste de 3 a 7 aminoácidos.
- 10
4. El uso como se reivindicó en cualquier reivindicación precedente en donde los aminoácidos son D-aminoácidos.
5. El uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde los aminoácidos son L-aminoácidos.
- 15
6. El uso como se reivindicó en cualquier reivindicación precedente en donde el péptido es R-R-R-R-R-R.
7. El uso como se reivindicó en cualquier reivindicación precedente en donde la infección es una infección por dermatofitos.
- 20
8. El uso como se reivindicó en la reivindicación 7 en donde la infección por dermatofitos es causada por un dermatofito de los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* o *Microsporum*.
9. El uso como se reivindicó en la reivindicación 8 en donde el dermatofito es *Trichophyton* spp.
- 25
10. El uso como se reivindicó en la reivindicación 9 en donde el dermatofito es *Trichophyton interdigitale*.
11. El uso como se reivindicó en la reivindicación 9 en donde el dermatofito es *Trichophyton rubrum*.
- 30
12. El uso como se reivindicó en cualquier reivindicación precedente en donde la infección es onicomicosis.
13. El uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6, en donde la infección es una infección por Tinea.
- 35
14. El uso como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6, donde la infección es una infección por no dermatofitos.