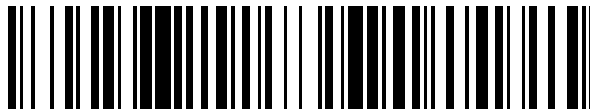


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 671**

21 Número de solicitud: 201230823

51 Int. Cl.:

**A61K 31/722** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**30.05.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.01.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALICANTE (100.0%)**  
**Carretera San Vicente del Raspeig, s/n**  
**03690 San Vicente del Raspeig (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ LLORCA, Luis Vicente;**  
**NISLOW, Corey y**  
**JAIME, María De Los Ángeles**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Composición para su uso como agente antifúngico**

57 Resumen:

Composición para su uso como agente antifúngico.  
La presente invención proporciona una composición que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1 o fluconazol, la cual es de utilidad para inhibir el crecimiento en células eucariotas. Por tanto, se propone su uso como agente antifúngico y para la prevención y/o tratamiento de infecciones fúngicas.

ES 2 436 671 A1

## DESCRIPCIÓN

Composición para su uso como agente antifúngico.

- 5 La presente invención se encuadra en el campo de la terapia génica y las composiciones antifúngicas, específicamente dentro de las composiciones basadas en el uso combinado de quitosano, u oligosacáridos del quitosano, con inhibidores capaces de alterar la expresión génica de determinadas dianas moleculares cuya inhibición conduce a una mayor sensibilidad de las células eucariotas a los efectos del quitosano o de sus oligosacáridos.

### 10 ESTADO DE LA TÉCNICA

La quitina es un polímero natural abundante que forma el exoesqueleto de los crustáceos, la cutícula de los artrópodos y las paredes celulares de la mayoría de los hongos. El quitosano es un polímero de N-glucosamina obtenido por N-deacetilación parcial de la quitina. La hidrólisis ácida o la rotura enzimática de los enlaces glicosídicos de las cadenas de quitosano, genera cadenas más cortas de un tamaño <1-10 KDa de oligosacáridos de quitosano (COS). COS tienen mayores propiedades antimicrobianas que el quitosano y actúan como aquél desestabilizando/permeabilizando las membranas celulares de bacterias, levaduras y de otros hongos.

- 20 El quitosano ejerce una acción antifúngica en diversos hongos (Palma-Guerrero J., *et al.*, 2010, *Appl Microbiol Biot.*, 87:2237-2245). Dicho compuesto inhibe tanto el crecimiento de las hifas como la germinación de esporas y reduce la producción de toxinas. Recientemente, se ha demostrado que el quitosano incrementa la producción de conidios en hongos filamentosos, incluso a concentraciones a las que el crecimiento de las hifas está bloqueado. En conjunto dichas observaciones sugieren que el quitosano ejerce su actividad antifúngica por múltiples mecanismos.

- 30 Por otro lado, COS es más soluble y activo biológicamente que el quitosano (Kim SK., Rajapakse N., 2005, *Carbohydr Polym.*, 62:357-368). La actividad biológica del quitosano y del COS depende de su peso molecular, grado de deacetilación y pH del medio. La actividad antibiótica del quitosano y del COS se debe a la permeabilización de las membranas plasmáticas bacterianas (Liu H., Du Y., Wang X., Sun L., 2004, *International journal of food microbiology*, 95:147-155). De igual forma los efectos antifúngicos del quitosano en levaduras y hongos filamentosos son debidos al daño que este compuesto causa a sus membranas plasmáticas. La sensibilidad fúngica al quitosano depende de la fluidez de la membrana. La permeabilización de la membrana plasmática por quitosano también se ha detectado (indirectamente) en *Saccharomyces cerevisiae*, ya que la delección de genes codificantes para proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática incrementó la sensibilidad al quitosano en dicho microorganismo (Zakrzewska A., *et al.*, 2007, *Eukaryotic cell*, 6:600-608).

- 40 Los COS son no-tóxicos para mamíferos, por lo que son de particular interés para su uso como antifúngicos en diversas aplicaciones. No obstante, debido a que muchos de los hongos patógenos pueden desarrollar resistencias al tratamiento prolongado con quitosano o con COS, es deseable mejorar la acción antifúngica del mismo mediante la identificación de dianas moleculares cuya inhibición/activación contribuya a mejorar el efecto de dicho compuesto en la muerte o inhibición del crecimiento de células eucariotas, preferiblemente de hongos. Además, mediante la identificación de dichas dianas moleculares de quitosano o de COS, se consigue incrementar el conocimiento del modo de acción antifúngico de este compuesto.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- 50 En la presente invención se ha identificado el gen ARL1, el cual codifica para la proteína Arl1, una GTPasa involucrada en el tráfico de la membrana plasmática, como una diana del quitosano o de los oligosacáridos del quitosano (COS) en células eucariotas.

- 55 Como se verá más adelante en los ejemplos, las células eucariotas que presentan delección homocigótica del gen ARL1 son sensibles a COS. La célula de delección heterocigótica (*arl1Δ*) presenta también sensibilidad a COS. Sin embargo, la sobreexpresión del gen ARL1 en células eucariotas confiere resistencia a COS en comparación con las células de tipo salvaje que no son capaces de crecer a la misma concentración del compuesto. Además, dicha sobreexpresión reduce la permeabilización de la membrana plasmática inducida por COS. Este resultado resultó ser dependiente *in vivo* de la dosis de COS en células eucariotas. Todo ello indica que ARL1 posee un papel importante en el modo de acción de COS como agente antifúngico, ya que la permeabilización de la membrana es la acción principal del quitosano como agente antimicrobiano en hongos y bacterias. Por todo ello, en la presente invención se propone el uso de un inhibidor del gen ARL1 para aumentar la sensibilidad de células eucariotas a quitosano o a sus oligosacáridos.

- 65 Además, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante, "composición de la invención", que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1.

En la presente invención se entiende por “quitosano” el polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y de N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) obtenido por N-deacetilación parcial de la quitina, y que posee efectos inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias.

Un “oligosacárido de quitosano” o “COS” es aquel oligosacárido del quitosano que presenta cadenas cortas, preferiblemente de un tamaño  $<1-10$  KDa, obtenido por la hidrólisis ácida o la rotura enzimática de los enlaces glicosídicos de las cadenas de quitosano, y que presenta efectos inhibidores del crecimiento de hongos y bacterias. Preferiblemente, el COS al que se refiere la presente invención es COS-5.44.

El término “inhibidor del gen ARL1” se refiere a una molécula que se une a dicho gen, a sus factores de transcripción o a cualquiera de sus productos de expresión, por ejemplo, aunque sin limitarnos, a la proteína Arl1, e inhibe o disminuye la expresión y/o actividad del factor al que se une y/o su señalización intracelular. Dicho inhibidor se selecciona de la lista que comprende, pero sin que sirva de limitación, antagonistas (preferiblemente químicos), ARN de silenciamiento o anticuerpo específico para la proteína Arl1 (preferiblemente el anticuerpo es monoclonal), en la presente invención este anticuerpo puede denominarse anticuerpo neutralizante del efecto de Arl1. Un ejemplo de inhibidor químico del gen ARL1 es, aunque sin limitarnos, el inhibidor GTP-GAMMA-S (Lee *et al.* 1997, *J. BIOL. CHEM.*, 272 (49), 30998-31005), un análogo de GTP no hidrolizable que actúa como inhibidor de ARL1 de forma dependiente de la concentración. Dicha acción inhibitoria se ve favorecida por la adición de fosfolípidos, en particular el DL-alfa-dimirystoilphosphatidil-colina colato y también de detergentes (SDS). Otros ejemplos de inhibidores de este tipo son, aunque sin limitarnos, los inhibidores de GTPasas MLS000532223 ó AMF-26 (*J. BIOL. CHEM.*, 2012 287,38885-97).

Como se verá en los ejemplos, el análisis del transcriptoma de la célula eucariota que sobreexpresa el gen ARL1, célula que es resistente a COS, reveló que dicha célula presentaba también una reducción global en la producción de energía y un aumento en la proliferación celular en respuesta a la perturbación causada por COS en comparación con las células de tipo salvaje. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para bloquear *ex vivo* el ciclo celular y la transcripción en una célula eucariota. De esta manera, la composición de la invención es de utilidad para provocar, preferiblemente *ex vivo*, la muerte celular o la inhibición del crecimiento o de la proliferación en células eucariotas que se encuentren, por ejemplo, en cultivo.

Tal y como aquí se utiliza, el término “bloquear” se refiere a paralizar el ciclo celular y la transcripción en una célula eucariota. Dicho bloqueo se puede producir, por ejemplo, aunque sin limitarnos, a nivel de mitosis, meiosis, dinámica y modificación de la cromatina o esporulación en el caso de que la célula eucariota proceda de, por ejemplo, un hongo.

La expresión “*ex vivo*” se refiere a que la célula eucariota tratada con la composición de la invención se encuentra fuera del cuerpo humano o animal.

Además, los ejemplos de la presente invención demuestran que la sobreexpresión del gen ARL1 permite a las células eucariotas resistir ligeramente mejor, en comparación con las células control, el estrés oxidativo, como por ejemplo aunque sin limitarnos, el estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), lo que demuestra que la sobreexpresión del gen ARL1 en estas células puede proporcionar cierta protección contra el estrés oxidativo. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del gen ARL1, o de sus productos de expresión, para prevenir y/o tratar el estrés oxidativo en una célula eucariota.

Además, la acción del quitosano o de sus oligosacáridos en las células conlleva asociada la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS), por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para provocar *ex vivo* estrés oxidativo en una célula eucariota, preferiblemente estrés oxidativo provocado por los efectos del quitosano o sus oligosacáridos.

El “estrés oxidativo” es la condición de citotoxicidad que es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad de la célula de defenderse contra ellos, por lo que está causado por un incremento en la formación de dichos radicales libres, por una disminución de los agentes que actúan como antioxidantes, o por ambos motivos conjuntamente.

La proteína “Arl1” a la que se refiere la presente invención es también conocida como “proteína 1 factor de ribosilación ADP-dependiente” o “ADP-ribosylation factor-like protein 1”. Arl1 es una proteína G y una GTPasa soluble y es miembro de la superfamilia Ras, involucrada en el tráfico de membrana. Arl1 está altamente conservada en todos los eucariotas, incluyendo mamíferos no humanos y humanos. Por lo tanto, es razonable esperar que dicha proteína desempeñe el mismo papel en diferentes sistemas eucariotas. Por ello, la “célula eucariota” a la que se refiere la presente invención puede proceder de cualquier organismo eucariota, aunque preferiblemente procede de un hongo o de un mamífero. El término “hongo”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere tanto a hongos filamentosos como a levaduras. Preferiblemente, el hongo al que se refiere

la presente invención se selecciona de la lista que comprende: *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon spp.*, *Malassezia spp.*, *Scedosporium spp.* o cualquiera de los hongos descritos como sensibles a quitosano en Palma Guerrero *et al.*, 2008, *Journal of Applied Microbiology*, 104(2): 541-553. En una realización más preferida, la célula eucariota es una célula tumoral. En una realización aun más preferida, la célula eucariota procede de un humano.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como antifúngico. El término “antifúngico” se refiere un compuesto que inhibe el crecimiento del hongo sin llegar a provocar su muerte (fungistático), o que destruye, es decir, provoca la muerte, del hongo (fungicida). Este uso como agente antifúngico de la composición de la invención se refiere a un uso *ex vivo*. Así, la composición de la invención puede ser utilizada como antifúngico en diversas aplicaciones, por ejemplo, aunque sin limitarnos, en la industria textil; en la industria alimentaria, como por ejemplo, para el recubrimiento de alimentos con el fin de evitar su contaminación microbiana y, por tanto, de evitar una potencial intoxicación en el cuerpo humano o animal una vez que el alimento es ingerido; en agricultura, como por ejemplo, en tratamientos fitosanitarios, preferiblemente en infecciones causadas por *Botrytis cinerea* o *Fusarium oxysporum*; o como detergente, por ejemplo, para la limpieza de diversas superficies.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento.

El término “medicamento” en la presente invención se refiere a un medicamento de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de tumores. El término “tumor”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la lesión que provoca un aumento en el volumen de un tejido como consecuencia de un crecimiento celular anormal, donde dichas células pueden ser o no células neoplásicas. Dentro del término “tumor” se incluyen los tumores benignos, malignos (cáncer) o pre-malignos.

En otra realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas. Se entiende por “infección fúngica” la colonización de un organismo huésped, preferiblemente de un mamífero no humano o de un humano, más preferiblemente de un humano, por parte de un hongo patógeno. Aun más preferiblemente, la infección fúngica es producida por hongos tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon spp.*, *Malassezia spp.* o *Scedosporium spp.*

El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica, pero aún no se ha diagnosticado que la tenga.

Una realización preferida de la invención se refiere al uso de la composición de la invención en todas las aplicaciones aquí propuestas en combinación con al menos otro compuesto antifúngico o antitumoral. Ejemplos de otros compuestos antifúngicos que se podrían emplear en combinación con la composición de la invención son, aunque sin limitarnos, anfotericina B, terbinafina, fluconazol, análogos de fluoropirimidinas o echinocandinas. En concreto, y sin que sirva de limitación, en los ejemplos de la presente invención se muestra que el uso combinado de quitosano, o de oligosacáridos del quitosano, con el antifúngico fluconazol presenta un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de células eucariotas. Por ello, en una realización más preferida, el otro compuesto antifúngico es fluconazol. El “fluconazol” es un medicamento triazol antimicótico usado en el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas superficiales y sistémicas, y disponible comercialmente.

El término “compuesto antitumoral” se refiere a un compuesto que es usado en la prevención y/o tratamiento de tumores benignos, malignos (cáncer) o pre-malignos en animales, preferiblemente en humanos.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una preparación combinada que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1, de ahora en adelante “preparación combinada de la invención”, por separado, simultáneo o secuencial, como antifúngico.

- 10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la preparación combinada de la invención por separado, simultáneo o secuencial, para la elaboración de un medicamento; o alternativamente, a la preparación combinada de la invención para su uso, por separado, simultáneo o secuencial, como medicamento. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de tumores. En otra realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas. Más preferiblemente, la infección fúngica es producida por hongos tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon spp.*, *Malassezia spp.* o *Scedosporium spp.*

- 20 El término “preparación combinada” o “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo en una composición, de manera que pueden encontrarse disponibles para su aplicación separada o secuencial. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende la composición de la invención. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo. En una realización más preferida, el otro principio activo es un compuesto antifúngico o antitumoral. En una realización aun más preferida, el otro principio activo es fluconazol. Esta composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más excipientes.

- 30 El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de los elementos de la composición farmacéutica de la invención, estabiliza dichos elementos, activa o ayuda a la preparación de la composición en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como por ejemplo es el caso de almidones, azúcares o celulosas, la función de endulzar, la función de colorante, la función de protección de la composición, como por ejemplo, para aislarla del aire y/o la humedad, la función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, la función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

- 40 El “vehículo farmacéuticamente aceptable”, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en la composición para diluir cualquiera de los componentes comprendidos en ella hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de los elementos comprendidos en la composición farmacéutica de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros elementos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición.

- 50 Preferiblemente, la composición farmacéutica de la invención comprende la composición de la invención, es decir, quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por “cantidad terapéuticamente efectiva” el nivel, cantidad o concentración de quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1, que produzca el efecto deseado tratando y/o previniendo tumores o infecciones fúngicas, sin causar efectos adversos. La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del individuo al que le va a ser administrada la composición farmacéutica de la invención.

- 55 La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La composición farmacéutica de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microesferas biodegradables.

- 65 Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial,

intracardíaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía vaginal o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

5 Por otro lado, como ya se ha mencionado, tras el uso combinado de quitosano, o sus oligosacáridos, con fluconazol se observa una dramática disminución del crecimiento celular de células eucariotas, preferiblemente de hongos. La combinación de quitosano, o de sus oligosacáridos, preferiblemente de COS, más preferiblemente de COS-5.44, y fluconazol actúa de modo sinérgico, ya que la combinación de ambos compuestos inhibe el crecimiento celular en mayor medida que la suma de la inhibición del crecimiento celular causada por cada uno de estos dos compuestos individualmente. Por ello, otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante "segunda composición de la invención", que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y fluconazol. Preferiblemente, esta segunda composición de la invención comprende COS, más preferiblemente COS-5.44, y fluconazol.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la segunda composición de la invención como antifúngico.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la segunda composición de la invención para la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la segunda composición de la invención para su uso como medicamento. En una realización preferida, el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas. Más preferiblemente, la infección fúngica es producida por hongos tales como por ejemplo, aunque sin limitarnos, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon spp.*, *Malassezia spp.* o *Scedosporium spp.* Aun más preferiblemente, la infección fúngica se produce en humanos.

25 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, "segunda composición farmacéutica de la invención", que comprende la segunda composición de la invención.

En una realización preferida, la segunda composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo. En una realización más preferida, el otro principio activo es un compuesto antifúngico. Esta segunda composición farmacéutica de la invención puede comprender además uno o más excipientes.

35 Preferiblemente, la segunda composición farmacéutica de la invención comprende la segunda composición de la invención, es decir, quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y fluconazol, en una cantidad terapéuticamente efectiva, entendiéndose por "cantidad terapéuticamente efectiva" el nivel, cantidad o concentración de quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y fluconazol, que produzca el efecto deseado tratando y/o previniendo infecciones fúngicas, sin causar efectos adversos.

40 La segunda composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Como ejemplos de preparaciones se incluye cualquier composición sólida (comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, etc.) o líquida (soluciones, suspensiones o emulsiones) para administración oral, tópica o parenteral. La segunda composición farmacéutica de la presente invención también puede estar en forma de formulaciones de liberación sostenida de drogas o de cualquier otro sistema convencional de liberación, así puede estar contenida, aunque sin limitarnos, en nanopartículas, liposomas o nanosferas, en un material polimérico, en un implante biodegradable o no biodegradable o en micropartículas biodegradables, como por ejemplo, microsferas biodegradables.

50 Tal composición y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardíaca, intramuscular, intranasal, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular, tópica, mediante parches transdérmicos, vía vaginal o vía rectal, mediante la administración de un supositorio, percutánea, espray nasal, implante quirúrgico, pintura quirúrgica interna, bomba de infusión o vía catéter.

55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos o componentes. 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 presente invención.

## 60 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1. Muestra los resultados de confirmación de la resistencia a COS-5.44 en la cepa sobreexpresante de Ar11 y la sensibilidad de la cepa heterocigota supresora correspondiente.** La sobreexpresión de ARL1 confiere resistencia a COS-5.44 (112,5 µg/ml) en comparación con el tipo salvaje (vector control) que no es capaz de crecer a dicha concentración. La cepa de delección heterocigótica (arl1Δ) muestra sensibilidad a COS-

5,44 (91,1 µg/ml). A) Curvas de crecimiento de la cepa que sobreexpresa ARL1 y de la cepa salvaje (WT) (control de vectores), en el medio sin quitosano. B) Curvas de crecimiento de la cepa que sobreexpresa ARL1 y de las cepas de tipo salvaje en presencia de COS-5,44 (112,5 µg/ml). C) Curvas de crecimiento de la cepa con delección heterocigota (*arl1Δ*) y de la cepa de tipo salvaje (WT) en medio sin quitosano. D) Curvas de crecimiento de la cepa con delección heterocigota (*arl1Δ*) y las cepas de tipo salvaje en medio con COS-5,44 (91,1 µg/ml). Las lecturas de densidad óptica (DO) se tomaron cada 15 minutos durante 20 horas utilizando un lector Tecan Genios. Las medidas DO Tecan se convirtieron a DO de cubetas convencionales de 1 mm de longitud de paso de luz. Se observó un comportamiento similar para el resto de las cepas seleccionadas sobreexpresantes (BCK2, Erg24, *msg5* y *Rba50*) resistentes al oligosacárido de quitosano COS-5,44 obtenidas en el ensayo de supresión multicopia (MSP). Las cepas de delección heterocigotas de estos genes (*bck2Δ*, *erg24Δ*, *msg5Δ* y *rba50Δ*) también se probaron individualmente para determinar su sensibilidad a COS-5,44 (91,1 µg/ml). Tres colonias de cada cepa se cultivaron por triplicado y se compararon con el tipo salvaje en presencia de COS-5,44 y en medio sin quitosano (vehículo: 1% de DMSO).

**Fig. 2. Muestra el efecto de los factores de estrés osmótico, agentes antifúngicos y estrés oxidativo en el crecimiento de la cepa que sobreexpresa ARL1 y de las células de tipo salvaje.** A) La sobreexpresión de ARL1 confiere resistencia a COS-5,44 a una concentración que inhibe el crecimiento de las células control (vector, WT). La cepa sobreexpresante de ARL1 es tan sensible como las células de tipo salvaje a los compuestos antifúngicos ensayados: B) Anfotericina B, C-D) Fluconazol; E-F) Terbinafina. G) La sobreexpresión de ARL1 confiere a la célula tolerancia al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparación con el tipo salvaje. Todos los ensayos se realizaron en YPD excepto COS-5,44 que se hizo en YPD 0.5X. Las lecturas de densidad óptica se tomaron cada 15 minutos durante 20 horas utilizando un lector Tecan Genios. Las medidas DO Tecan se convirtieron a DO de cubetas convencionales de 1 mm de longitud de paso de luz. Tres colonias de cada cepa se cultivaron por triplicado y se compararon con las de tipo salvaje cultivadas bajo las mismas condiciones. YPD - levadura peptona caldo de dextrosa.

**Fig. 3. Muestra el efecto sinérgico inhibitorio de COS-5,44 sobre el crecimiento celular cuando se utiliza en combinación con fluconazol.** A) Curvas de crecimiento de la cepa de tipo salvaje (BY4743) creciendo en el medio sin quitosano (vehículo, DMSO), COS-5,44 (77 µg/ml), Fluconazol (16 µg/ml) y COS-5,44 + fluconazol (77 + 16 µg/ml, respectivamente). B) Curvas de crecimiento de la cepa de tipo salvaje (BY4743): crecimiento en presencia del vehículo, COS-5,44 (84 µg/ml), fluconazol (20 µg/ml) y COS-5,44 + fluconazol (84 + 20 µg/ml, respectivamente). Las lecturas de densidad óptica se tomaron como se describe en las figuras anteriores.

## EJEMPLOS DE REALIZACIÓN

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de las composiciones de la invención, las cuales comprenden quitosano o sus oligosacáridos y un inhibidor del gen ARL1 o fluconazol, en la inhibición del crecimiento de células eucariotas. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

## EJEMPLO 1. GENES Y DIANAS MOLECULARES DE COS UTILIZANDO QUIMIOGENÓMICA.

### 1.1. OLIGOSACÁRIDO DE QUITOSANO.

Para los ensayos se utilizó el oligosacárido de quitosano (COS-5,44) (5,44 KDa, PDI (índice de polidispersión) = 1,14 y el 97% de grado de desacetilación). Para los experimentos realizados en este estudio, se preparó una solución madre (25 mg/ml) de COS-5,44 en DMSO al 50%, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20 °C.

### 1.2. SENSIBILIDAD DE LA LEVADURA A COS-5,44.

Se realizó un ensayo de sensibilidad a COS-5,44 en la levadura *S. cerevisiae* de tipo salvaje (BY4743). Se probaron las concentraciones de 62 µg/ml a 125 µg/ml de COS-5,44. Se añadieron a cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc) 98 µl de mezcla de células a una DO<sub>600</sub> inicial de 0,0625 en YPD 0.5X pH 5 (5 g de extracto de levadura Bacto, 10 bacto peptona y 10 g de dextrosa en 1 litro de agua destilada) y luego se añadieron 2 µl de la correspondiente solución madre de COS-5,44, incluyendo los controles (50% de DMSO y 0,25 mol/l HCl neutralizado a pH 5,6). Las células se cultivaron a 30°C en un espectrofotómetro con agitación-(Tecan), tomándose lecturas cada 15 minutos durante 24 horas. Las medidas DO Tecan se convirtieron a DO de cubetas convencionales de 1 mm de longitud de paso de luz. El ensayo con COS-5,44 se realizó para identificar las concentraciones inhibitorias (CI) CI70-90 y CI10-20 en células BY4743 para utilizarse en los ensayos quimiogenómicos de supresión multicopia y delección respectivamente.

### 1.3. ENSAYO DE HAPLOINSUFICIENCIA Y DE HOMOCIGOTOS (HIP-HOP).

Se realizaron ensayos de haploinsuficiencia y homocigóticos, purificación del ADN genómico, amplificación de códigos de barras por PCR, hibridación en micromatriz, su análisis y las confirmaciones. La colección homocigótica se cultivó durante 5 generaciones (aproximadamente 10 horas) y la de heterocigotos durante 20 generaciones (aproximadamente 40 horas). Estos períodos de tiempo son los más adecuados para permitir el crecimiento de cada colección. Los experimentos se realizaron por duplicado. Las cepas de levadura con delección con una relación de  $\log_2$  de 3.5 o superior (cepas supresivas de alta sensibilidad a COS-5.44) se seleccionaron para su confirmación individual. Un ratio de  $\log_2$  3,5 representa aproximadamente la abundancia de 11 veces menos de la cepa de delección después del tratamiento con COS.

### 1.4. TRANSFORMACIÓN DE LOS GENES CANDIDATOS RESISTENTES PARA LA SOBREENPRESIÓN EN LEVADURA.

Sesenta y ocho genes se identificaron por perfiles de supresión multicopia (MSP) como posibles candidatos para conferir resistencia a COS-5.44. Para confirmar los 68 genes que confieren resistencia, cada gen se sobreexpresó de forma individual en levadura. Para ello cepas de *E. coli* que portan los genes de interés se obtuvieron de la colección de MOBY ORF- $\mu$  2. 57 de los 68 genes candidatos estaban disponibles en dicha colección, por lo tanto 11 de los genes de interés no estaban presentes en esta colección y no pudieron ser ensayados.

Se cultivaron las colonias individuales de cada cepa de *E. coli* en medios selectivos en 2YT (1% extracto de levadura, 1,6% de Bacto triptona, y 0,5% de sodio) + glucosa al 0,4% + carbenicilina (200 mg/ml, Sigma) + kanamicina (50 mg/ml, Sigma) en placas de 96 pocillos (Greiner, Bio-uno) a 37°C y a 200-250 rpm. Las células se cosecharon (5 min, 4000 rpm) para proceder a la extracción del ADN. Se utilizó un kit de purificación Macherey-Nagel de multi-96 (MN Cat. # 740 625.4) para hacer minipreps de los plásmidos, siguiendo el protocolo del fabricante. La elución se realizó en 150  $\mu$ l para recoger ~ 100  $\mu$ l de ADN purificado.

Cada extracto plasmídico se digirió doblemente con EcoRI / XhoI (New England BioLabs Inc). Las muestras digeridas se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% para confirmar el vector y el tamaño de fragmentos de la ORF.

Los plásmidos confirmados se transformaron en la cepa de levadura BY4743 (his3 1/his3 1 leu2 ura3 0/leu2 0 0/ura3 met15 0 / + LYS2 0 / +). Cinco colonias individuales de cada cepa se cultivaron por la noche en medios líquidos selectivos que se almacenaron en 15% de glicerol a -80°C.

Una vez obtenidas las cepas sobreexpresantes, se realizó la confirmación de su resistencia a COS-5.44. Dichas cepas se cultivaron a diferentes concentraciones de COS-5.44, determinadas previamente como inhibitorias de la cepa de tipo salvaje en el MSP. Las concentraciones ensayadas fueron 101.25, 106.28, 112.5, 118.75, 125.0 y 250.0  $\mu$ g/ml. Para asegurar que la resistencia fue conferida por el gen sobreexpresado, el ADN del plásmido se extrajo a partir de dos colonias de cada cepa sobreexpresante, y se transformó en *E. coli*. Los plásmidos amplificados se obtuvieron mediante Genejet Kit (Fermentas), utilizando el protocolo del fabricante. Los plásmidos purificados fueron digeridos doblemente como ya se ha descrito anteriormente. Los plásmidos confirmados se retransformaron en BY4743, se seleccionaron tres colonias individuales de las que se confirmó su resistencia a COS-5.44 como ya se ha descrito previamente.

### 1.5. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO COS-5.44 EN LA COLECCIÓN DE PERFILES DE SUPRESIÓN MULTICOPIA (MSP).

Los ensayos MSP implican la transformación de levadura con una biblioteca de plásmidos supresión multicopia que contienen fragmentos al azar de aproximadamente 7 kpb de ADN. El ensayo MSP se realizó con 101.25 a 250.0  $\mu$ g/ml de COS-5.44 y se determinó que 112,5  $\mu$ g/ml de COS inhibió el crecimiento de la levadura tipo salvaje por lo menos en un 70%. Las levaduras que contienen plásmidos de supresión que proporcionan resistencia a 112.5  $\mu$ g/ml de COS-5.44 crecerán más rápidamente que el resto de las levaduras de la población. Se extrajeron ADNs genómicos procedentes de una población resistente y una población transformada pero no tratada y se hibridaron con micromatrices ORF para identificar los genes presentes en multicopias en la población resistente.

Dos réplicas independientes del ensayo MSP identificaron un total de 68 genes putativos como supresores de sensibilidad a COS-5.44. Los fragmentos aleatorios de ADN genómico de la biblioteca de la supresión del plásmido multicopia contienen una media de 2 - 3 genes de la levadura por fragmento. Sólo un gen en cada fragmento es el responsable más probable de la resistencia, por lo tanto, se espera que sólo 33-50% de estos genes se confirmen como supresores de sensibilidad a COS-5.44 Entre los genes supresores encontrados, apareció ARL1, un gen que codifica una proteína GTPasa. Este gen se encontró que era sensible a COS-5.44 como cepa de delección en el ensayo de HIP-HOP.



**1.6. CONFIRMACIÓN DE LAS CEPAS SUPRESORAS DE SENSIBILIDAD A QUITOSANO.**

Después de la identificación de las cepas putativamente resistentes se probó la resistencia a COS de cada cepa de forma individual. De los 68 genes candidatos a supresores se obtuvieron, a partir de una colección de ORFs cuya expresión es impulsada por los promotores nativos, 57 cepas individuales sobreexpresantes / supresoras cada una con un solo gen de resistencia putativo. Veintiún (~ 31%) de los genes supresores putativos confirieron resistencia a COS-5,44. Las cepas sobreexpresantes resistentes a COS fueron capaces de crecer a 112.5 µg/ml del compuesto, donde el tipo salvaje (transformado con un vector vacío) fue incapaz de crecer, esto se cumplió para el caso de ARL1 (Fig. 1).

Entre los genes confirmados que confieren resistencia a COS-5,44 se encontraron dos genes esenciales: RBA50 (YDR527W), un gen cuyo producto proteico está implicado en la transcripción, y Arp2 (YDL029W), un gen que codifica la proteína relacionada con la actina 2, una subunidad del complejo Arp2 / 3 que se requiere para la motilidad y la integridad de los parches de actina corticales. Entre los restantes 19 genes no esenciales, se encontraron una gran diversidad de funciones, como una esteroil reductasa, una proteína de choque térmico, los factores de ribosilación de ADP-, GTPasas solubles, alfa tubulina, y una enzima conjugación de ubiquitina. Se probaron todos los supresores putativos de la acción antifúngica de COS en la levadura como cepas de delección heterocigotas y de las 21 cepas sobreexpresantes resistentes a COS, 11 resultaron ser sensibles cuando se ensayaron como cepas de delección heterocigóticas. Cinco genes que proporcionaron resistencia a COS cuando se sobreexpresaban o sensibilidad como cepa de delección homocigota o heterocigota se seleccionaron para su estudio principalmente por las funciones conocidas o putativas de los genes implicados. Más específicamente se seleccionaron los genes con funciones en las vías de señalización, la integridad de la membrana celular o regulación de la transcripción.

Se seleccionaron las siguientes 5 cepas que sobreexpresaban: ARL1, que codifica para una GTPasa involucrada en el tráfico de membrana, fue seleccionada debido a que se detectó en el ensayo HIP-HOP como cepa sensible de delección homocigótica y en el ensayo de MSP como un supresor multicopia. Otras cepas sobreexpresantes resistentes incluyeron los siguientes genes: BCK2 y msg5, que están involucrados en las vías de la integridad celular, ERG24, un gen implicado en la síntesis de ergosterol, y RBA50 (mencionado anteriormente). BCK2 es una proteína rica en Ser-Thr-quinasa con actividad de la proteína C que actúa en la transducción de señales.

**EJEMPLO 2. ARL1 ES UNA DIANA FUNDAMENTAL DE COS.**

**2.1. TOMA DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ARN DE LAS CEPAS SOBREEXPRESANTES.**

Una colonia de cada cepa sobreexpresante confirmada y la de tipo salvaje con el vector vacío se cultivaron durante la noche a 30°C y en agitación a 200-250 rpm. Un cultivo de una noche se utilizó para inocular 3 matraces cada uno con 400 ml de YPD 0.5X pH 5. Las células se cultivaron hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0,8 y entonces se recogió una muestra de 100 ml (tiempo cero). Los restantes 300 ml se trataron con COS-5.44 (112,5 µg/ml) y se recogieron muestras de 100 ml en 15, 30 y 60 minutos después del tratamiento. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos, 4000 rpm), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C, para la extracción de RNA y etiquetado. Una vez que todas las muestras se recogieron se llevó a cabo un extracción de RNA con fenol ácido -cloroformo en caliente.

Los análisis de microarrays (micromatrices) de las células tipo salvaje tratadas con COS determinaron que el número máximo de genes expresados diferencialmente se obtuvo con el tratamiento de 60 minutos con una mínima pérdida de genes expresados diferencialmente en puntos de tiempo anteriores, pero no a los 60 minutos. Por lo tanto, para las cepas de sobreexpresión, el análisis de microarrays se llevó a cabo sólo en muestras sin tratar y tratadas 60 minutos con COS.

**2.2. RESISTENCIA A OTROS COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS Y CATIONICOS.**

Para comprobar si la sobreexpresión de ARL1 confiere resistencia a otros compuestos catiónicos, el tipo salvaje y la cepa sobreexpresante de ARL1 se cultivaron en presencia de otros compuestos catiónicos. Se realizó un ensayo de respuesta a dosis en la cepa de tipo salvaje y en la de sobreexpresión de ARL1 utilizando los siguientes compuestos: NaCl (0,5 y 1 M); sorbitol (1 y 2 M); LiCl (0,01 M); higromicina B (25, 12, y 6 µg/ml); anfotericina B (25, 12 y 6 µg/ml); fluconazol (32, 28, 24 y 20 µg/ml); terbinafina (16, 8 y 4 µg/ml); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.012% 0.006%) y SDS al 1% (0.05, 0.025 y 0.012%).

**2.3. ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS CEPAS RESISTENTES A COS-5.44.**

Para obtener una mayor comprensión sobre el modo de acción y mecanismos de resistencia a COS, se realizó un análisis del transcriptoma de las 5 cepas sobreexpresantes seleccionadas que aumentaron la resistencia a COS-5.44. Cada cepa sobreexpresante y el tipo salvaje (vector control) fueron tratadas con COS-5.44 (o con vehículo solo) durante 1 hora aislándose el ARN de cada muestra. El ARN se transformó en ADNc marcado y se hibridó con microarrays de expresión NimbleGen. Se realizaron dos series de análisis. El primer análisis se

diseñó para detectar los genes expresados diferencialmente en cada cepa de sobreexpresión en comparación con el tipo salvaje en ausencia de COS con el fin de ver si la sobreexpresión del gen en cuestión cambió el perfil de la transcripción (y, potencialmente, la fisiología o la estructura de la célula). El segundo análisis se diseñó para detectar los genes expresados diferencialmente en cada cepa de sobreexpresión en comparación con la de tipo salvaje en presencia de COS para ver si las cepas de sobreexpresión respondieron de manera diferente a COS que de la tipo salvaje.

En el primer análisis, se identificaron 184 genes con expresión diferencial en al menos una de las 5 cepas de sobreexpresión en comparación con el tipo salvaje (control vector), sin tratar con COS-5.44. Este efecto representa el cambio en el perfil de transcripción como resultado de la sobreexpresión de uno de los 5 genes en ausencia de perturbación por COS-5,44. Cada una de las 5 cepas de sobreexpresión mostró una mayor expresión del gen contenido en el vector de transformación.

El análisis de transcriptoma del tratamiento con COS-5.44 mostró 1220 genes (~ 589 sobreexpresados y ~ 631 reprimidos) con expresión diferencial significativa en relación con el tipo salvaje bajo las mismas condiciones de crecimiento (P-valor < 0.05 y log2 veces que cambian  $\geq 1$  ó  $\leq -1$ ,) en al menos una de las 5 cepas sobreexpresantes. Los procesos biológicos identificados por análisis de enriquecimiento significativamente más representados en los 589 genes sobreexpresados incluyen la transcripción, ciclo celular, la modificación de proteínas, la respuesta al estrés y la transducción de señales RAS. Los procesos biológicos enriquecidos en los genes reprimidos incluyeron el plegado de proteínas, los del complejo de ensamblaje de proteínas y los genes del complejo de la cadena respiratoria.

Los procesos primarios biológicos asociados con las 5 cepas de sobreexpresión en presencia de COS fueron los siguientes: funciones de señalización de la membrana (ARL1, BCK2, msg5), transcripción (RBA50) y la síntesis de ergosterol (ERG24). Los genes que se reprimieron en diversos grados en las 5 cepas se asociaron con procesos tales como la generación de energía celular (biología mitocondrial, el metabolismo de la ATP, los metabolitos de almacenamiento de energía) y subproductos asociados (estrés oxidativo). La mayoría de las cepas de sobreexpresión (ARL1, ERG24 y RBA50) mostraron sobreexpresados los genes implicados en la progresión del ciclo celular (mitosis / meiosis, la dinámica de la cromatina y la modificación y la esporulación) y la transcripción. En conjunto estos resultados sugieren que las cepas de sobreexpresión resistentes a COS tenían una reducción global en la producción de energía y un aumento en la proliferación celular en respuesta a la perturbación por COS-5,44 en comparación con las células de tipo salvaje, y en particular la cepa ARL1.

## 2.4. RESISTENCIA DE ARL1 A OTROS COMPUESTOS ANTIFÚNGICOS O ESTRES.

Para probar si la sobreexpresión de ARL1 confiere resistencia a otros agentes antifúngicos, compuestos catiónicos, o estresadores osmóticos, se cultivaron células de tipo salvaje (vector control) y la cepa que sobreexpresaba ARL1 en presencia de dichas perturbaciones. La sobreexpresión de ARL1 no confirió resistencia a NaCl, sorbitol o LiCl en comparación con el control (vectores). La sobreexpresión de ARL1 confirió resistencia a COS-5,44 a altas concentraciones (112,5  $\mu\text{g/ml}$ ) en las que control (vector) es incapaz de crecer (Figura 2A). Curiosamente, la cepa que sobreexpresaba ARL1 fue tan sensible a Anfotericina B (12  $\mu\text{g/ml}$ , figura 2B) y terbinafina (16 (no mostrado), 8 y 4  $\mu\text{g/ml}$ , Figuras 2E y F) como las células de tipo salvaje. La cepa que sobreexpresaba ARL1 pareció ser ligeramente más sensible que el control (vector) a fluconazol (32, 28, (no mostrado) 24 y 20  $\mu\text{g/ml}$ , figuras 2C y D). Estos resultados sugieren que la resistencia a COS resultante de la sobreexpresión de ARL1 es específica y no se extiende a otros compuestos antifúngicos que rompen las membranas celulares de los hongos. La sobreexpresión de ARL1 permite a las células resistir perturbaciones por  $\text{H}_2\text{O}_2$  ligeramente mejor (12%) que las células de control, lo que sugiere que la sobreexpresión de ARL1 puede proporcionar cierta protección contra el estrés oxidativo (Figura 2G).

## EJEMPLO 3. SINERGIA DE COS CON ANTIFÚNGICOS.

### 3.1. INTERACCIÓN ENTRE COS Y FLUCONAZOL.

Para COS-5.44, se preparó un intervalo de concentración de 35-105  $\mu\text{g/ml}$  y para fluconazol, un intervalo de concentración 4-24  $\mu\text{g/ml}$ . Se prepararon soluciones stock para cada fármaco en 12,5% de DMSO para obtener una concentración final de 1% en DMSO. Se crecieron levaduras de tipo salvaje (BY4743) por la noche y se diluyó a una  $\text{OD}_{600}$  de 0,0625 en YPD 0.54X pH 5. Se tomaron alícuotas de 92  $\mu\text{l}$  de la mezcla de células y se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc), y se añadieron 4  $\mu\text{l}$  stock de COS-5.44 y/o fluconazol en una matriz de 7 x 12 dosis-respuesta. Se realizaron dos matrices de dosis-respuesta: la auto-auto (COS-5,44 - 5,44 y COS-Fluconazol - Fluconazol) y dos repeticiones de la COS-5.44 y la matriz de fluconazol. Las células se cultivaron a 30°C en un espectrofotómetro con agitación (Tecan), tomándose lecturas cada 15 minutos durante 24 horas. Se utilizó el área bajo la curva de crecimiento como un indicador para medir el defecto en el crecimiento y la interacción de fármacos.

### 3.2. INTERACCIÓN SINÉRGICA DE COS-5.44 CON FLUCONAZOL.

Debido a que COS-5.44 y el fluconazol tienen diferentes modos de acción, se analizó el efecto del tratamiento de células con ambos compuestos simultáneamente, para comprobar si estos dos compuestos podrían interactuar de manera sinérgica. A concentraciones en las que ninguno de los fármacos inhibe o inhibe débilmente el crecimiento de las células (COS inhibe el crecimiento de <15%, mientras que el fluconazol inhibe <9%), cuando se utilizan en combinación se observa una dramática disminución en el crecimiento celular (Figura 3A-B). Usando el área bajo la curva de crecimiento como una medida, se vio que la combinación de COS-5.44 y Fluconazol actúa de modo sinérgico ya que la combinación de ambos fármacos inhibe el crecimiento mucho más (45 a 86%) que la suma de inhibición del crecimiento causado por cada compuesto individualmente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1 seleccionado de la lista que consiste en: ARN de silenciamiento, anticuerpo específico para la proteína Arl1, inhibidor GTP-GAMMA-S, inhibidor MLS000532223 o inhibidor AMF-26.
2. Uso de la composición según la reivindicación 1 como reactivo para bloquear *ex vivo* el ciclo celular y la transcripción en una célula eucariota.
- 10 3. Uso de la composición según la reivindicación 1 como reactivo para provocar *ex vivo* estrés oxidativo en una célula eucariota.
4. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3 donde la célula eucariota procede de un hongo o de un mamífero.
- 15 5. Uso de la composición según la reivindicación 4 donde la célula eucariota es una célula tumoral.
6. Uso de la composición según la reivindicación 1 como antifúngico.
- 20 7. Uso de la composición según la reivindicación 1 para la elaboración de un medicamento.
8. Uso de la composición según la reivindicación 7 donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas.
- 25 9. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 en combinación con al menos otro compuesto antifúngico.
10. Uso de la composición según la reivindicación 9 donde el otro compuesto antifúngico es fluconazol.
- 30 11. Uso de una preparación combinada que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1 seleccionado de la lista que consiste en: ARN de silenciamiento, anticuerpo específico para la proteína Arl1, inhibidor GTP-GAMMA-S, inhibidor MLS000532223 o inhibidor AMF-26; por separado, simultáneo o secuencial, como antifúngico.
- 35 12. Uso de una preparación combinada que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1 seleccionado de la lista que consiste en: ARN de silenciamiento, anticuerpo específico para la proteína Arl1, inhibidor GTP-GAMMA-S, inhibidor MLS000532223 o inhibidor AMF-26; por separado, simultáneo o secuencial, para la elaboración de un medicamento.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12, donde el medicamento es para el tratamiento y/o prevención de infecciones fúngicas.
14. Composición según la reivindicación 1 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y/u otro principio activo.
- 45 15. Composición según la reivindicación 14 donde el otro principio activo es un compuesto antifúngico.
16. Composición según la reivindicación 15 donde el otro principio activo es fluconazol.

FIG. 1

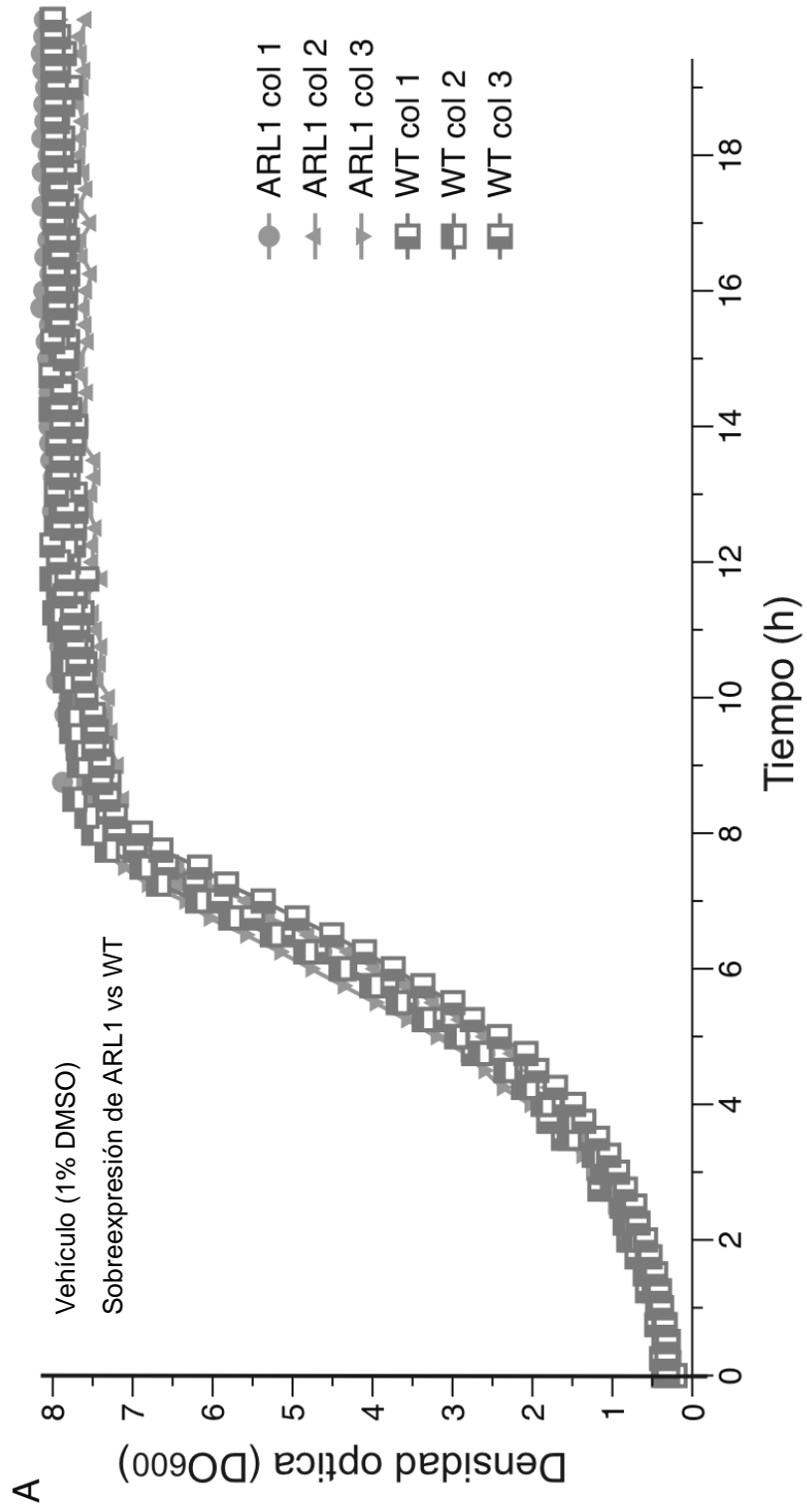


FIG. 1 (Cont.)

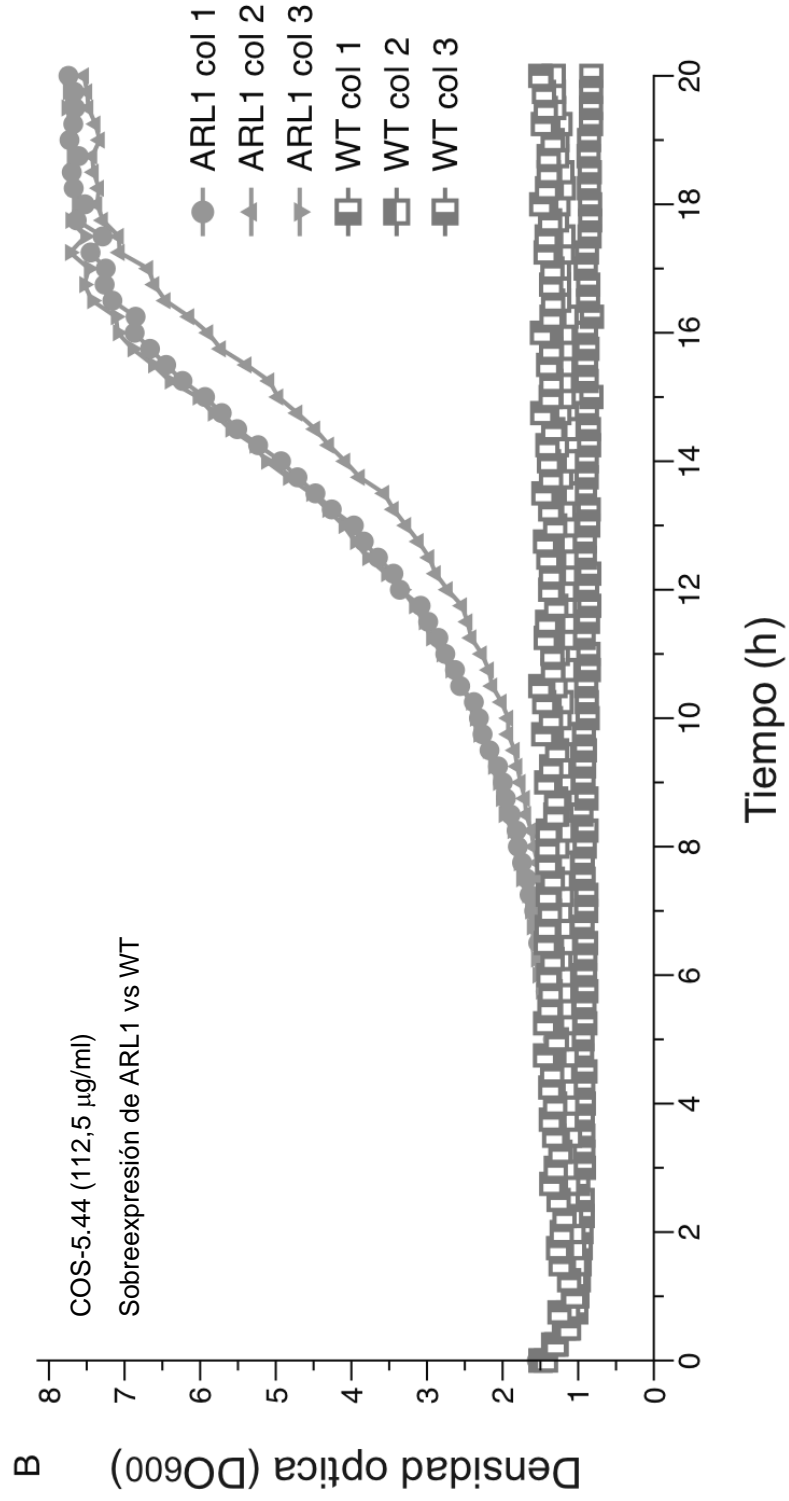


FIG. 1 (Cont.)

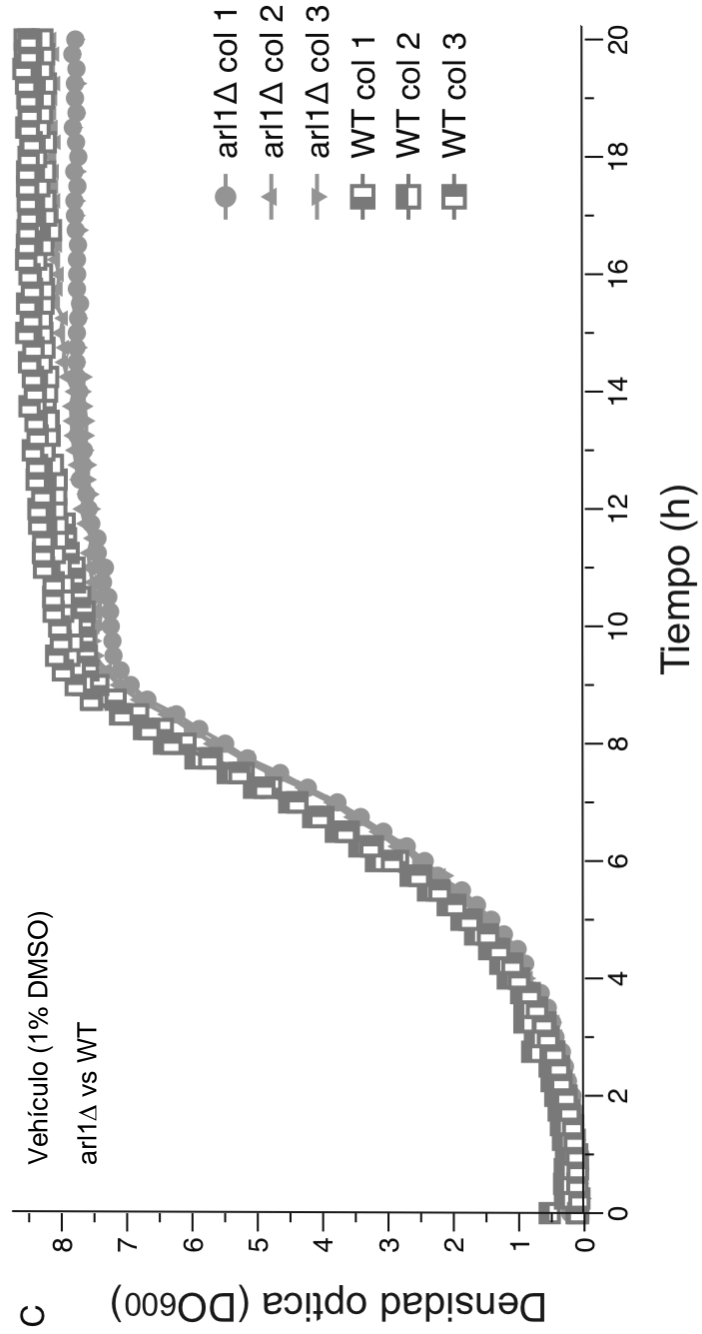


FIG. 1 (Cont.)

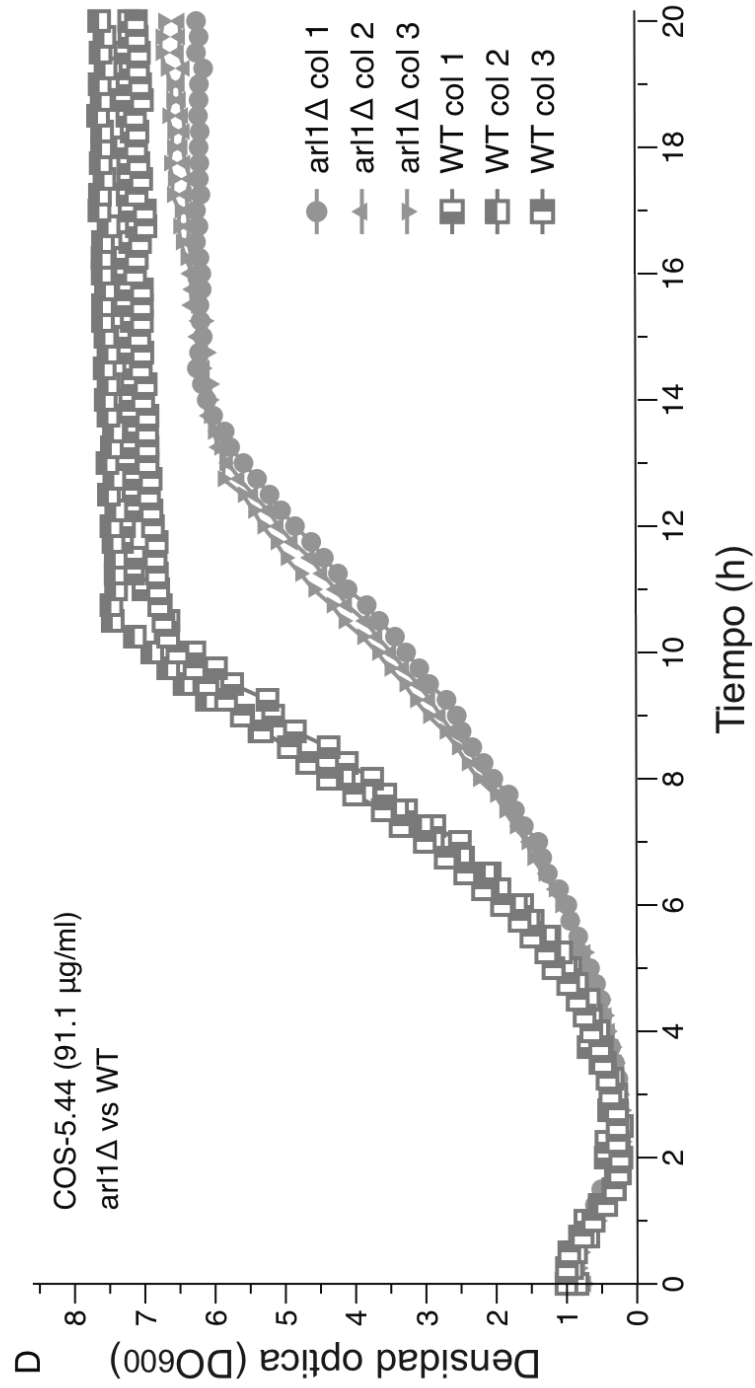




FIG. 2

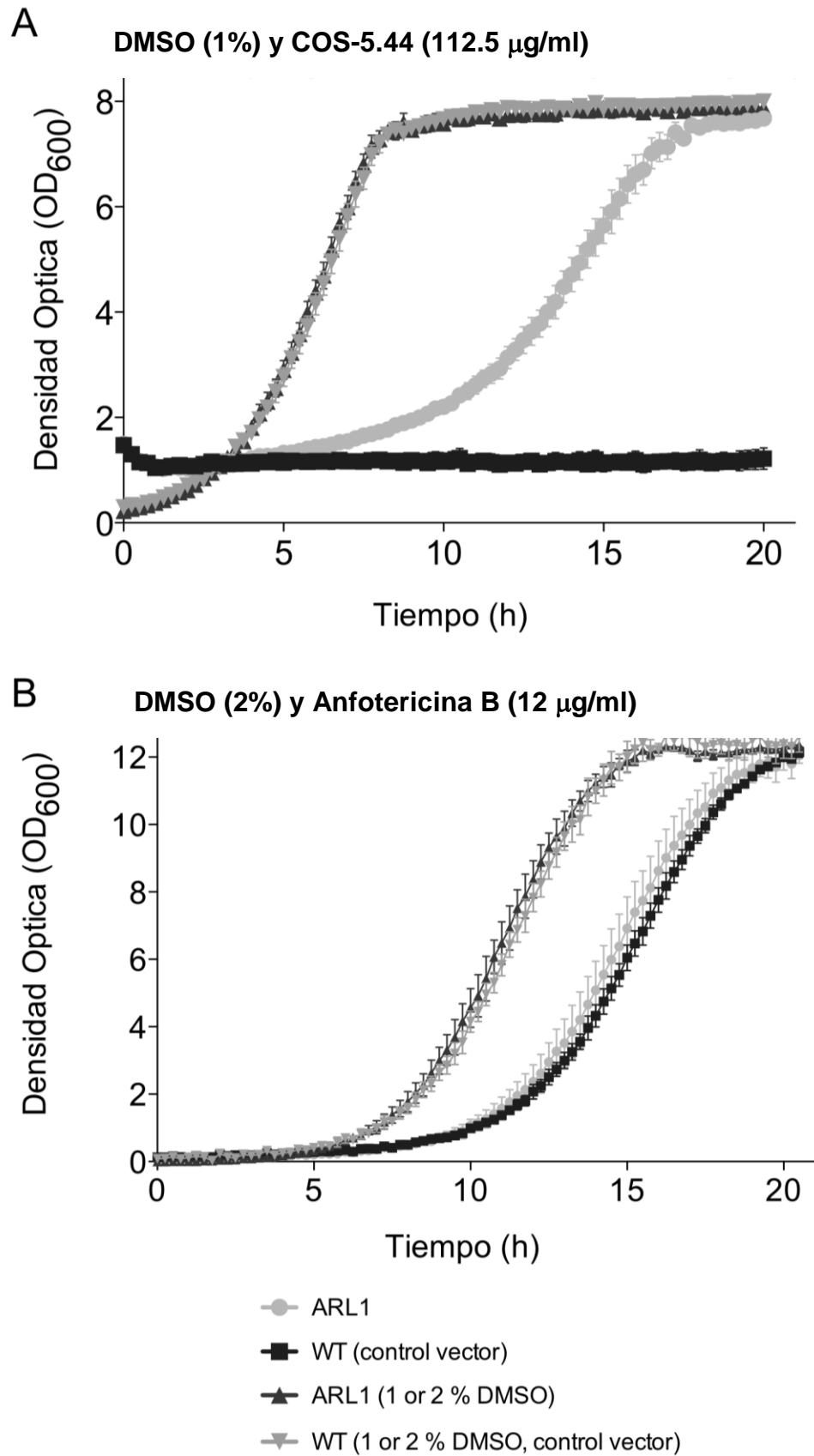


FIG. 2 (Cont.)

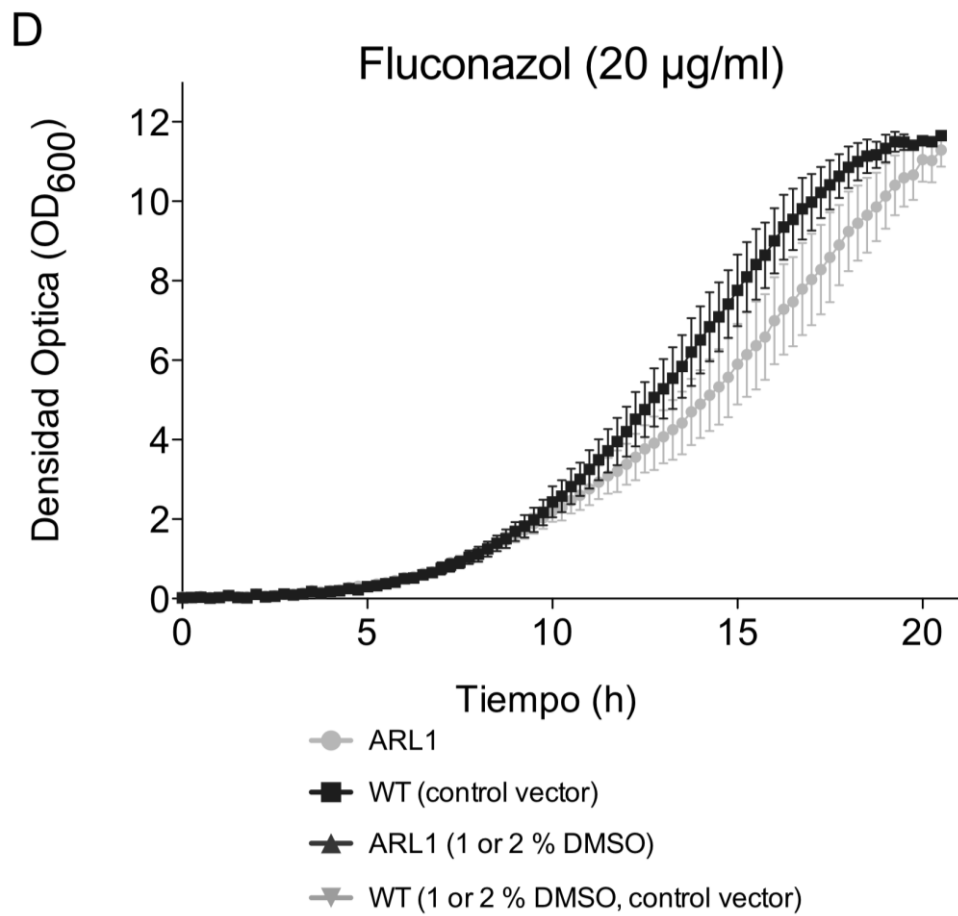
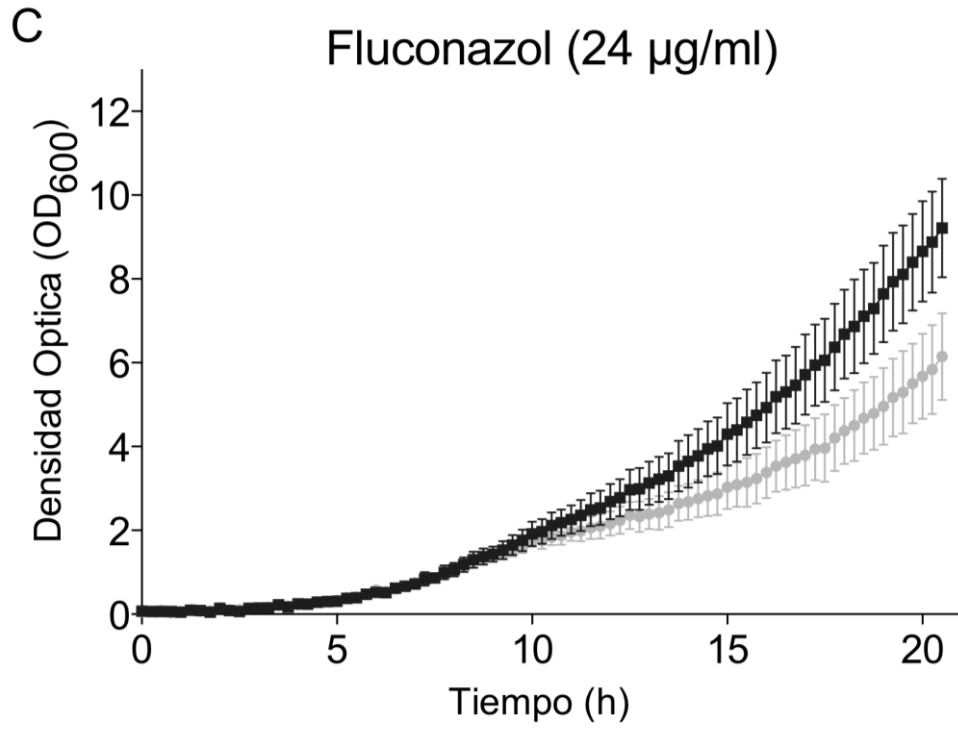


FIG. 2 (Cont.)

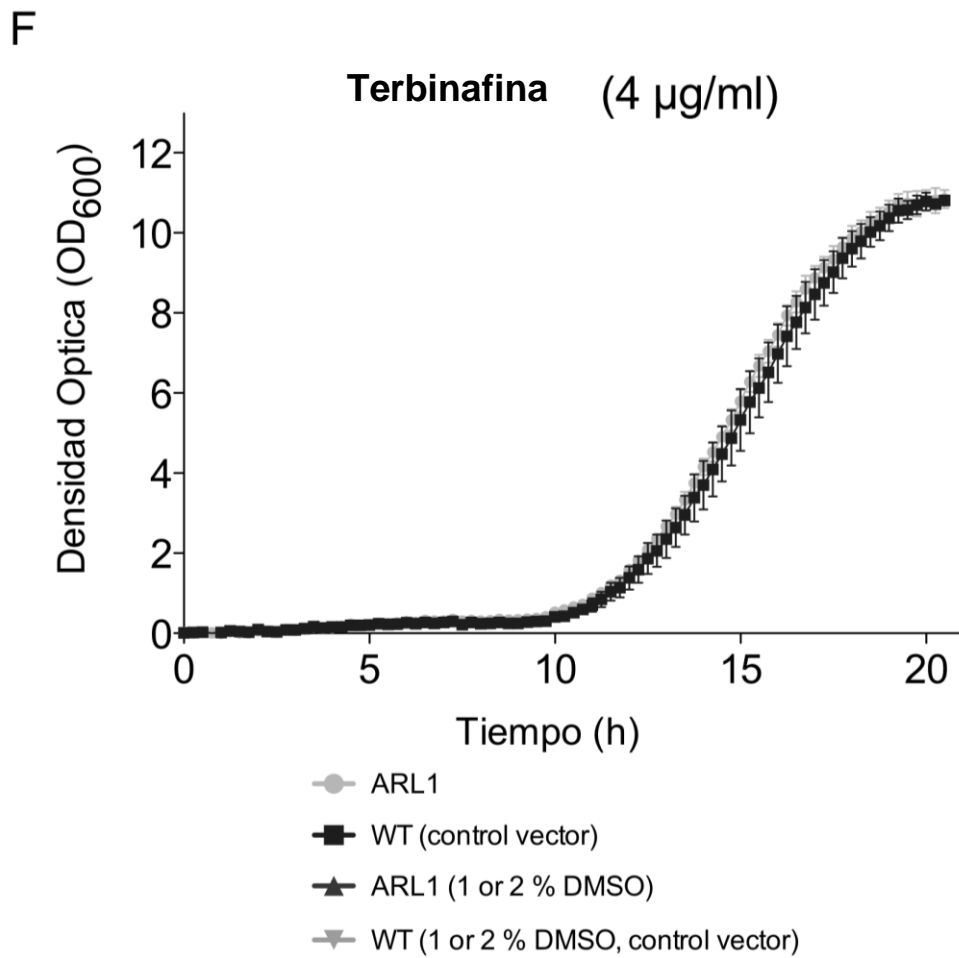
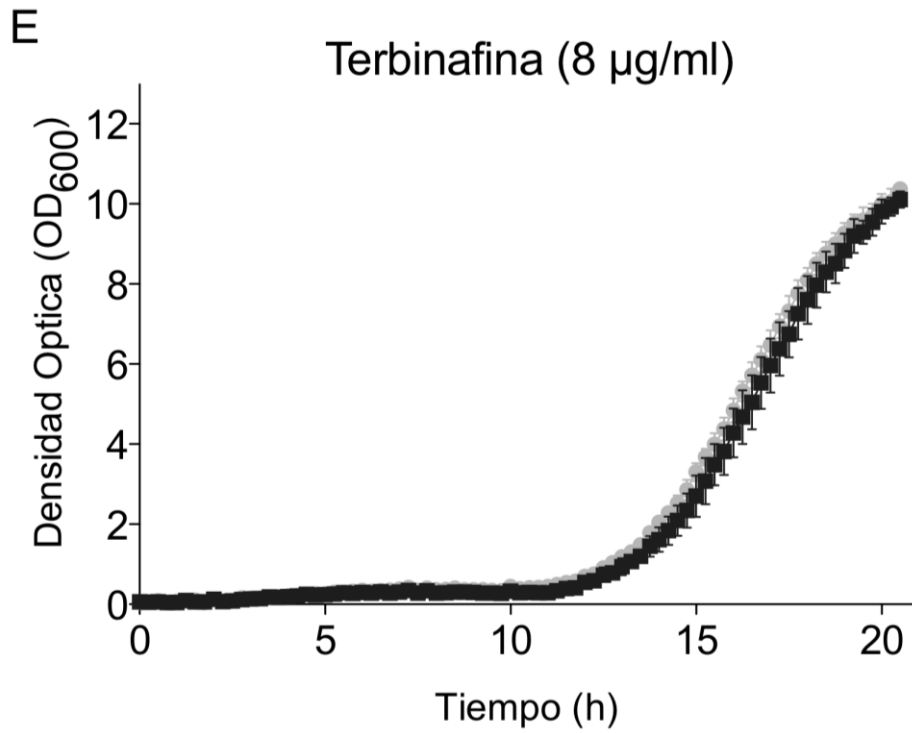


FIG. 2 (Cont.)

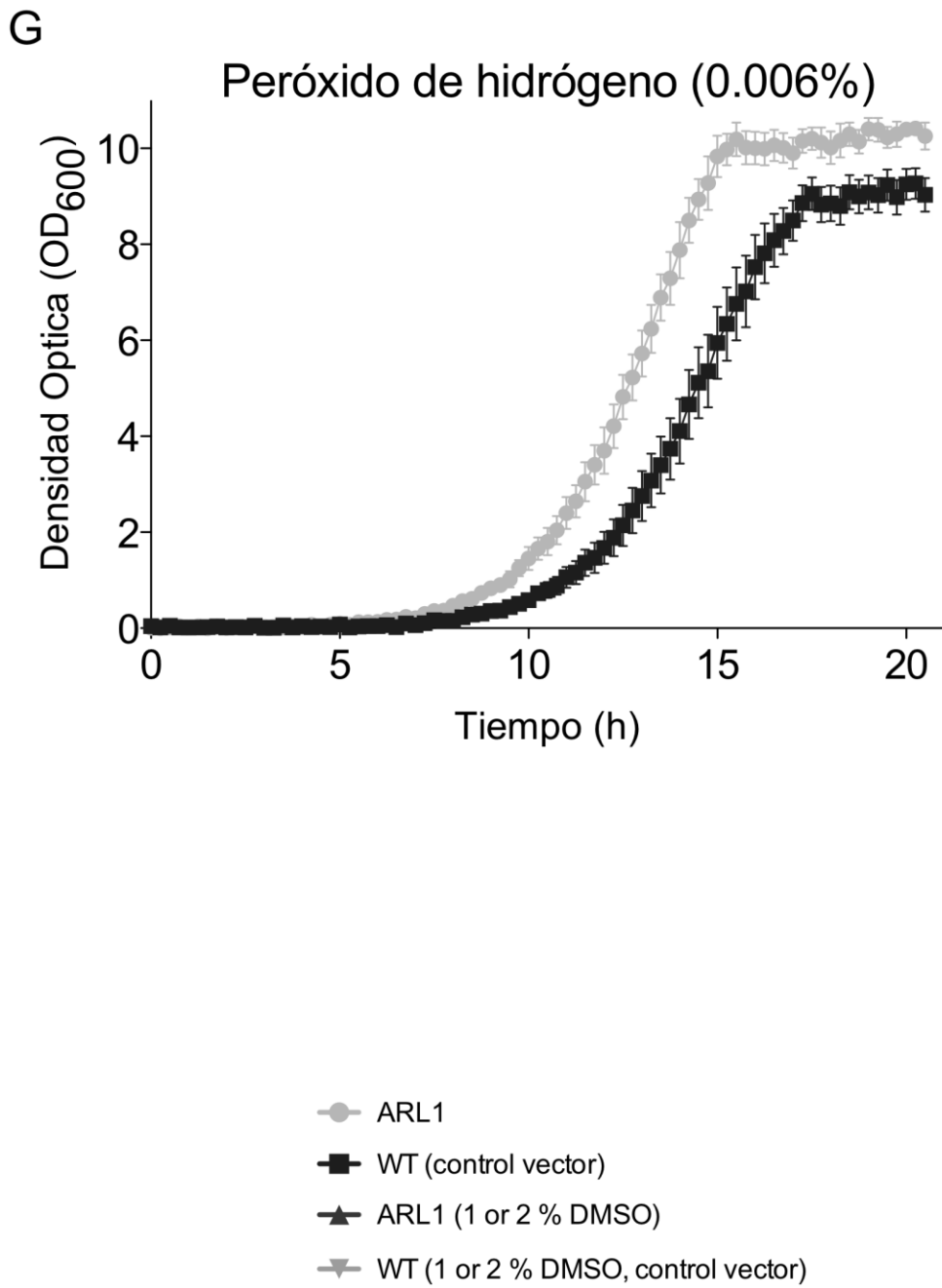
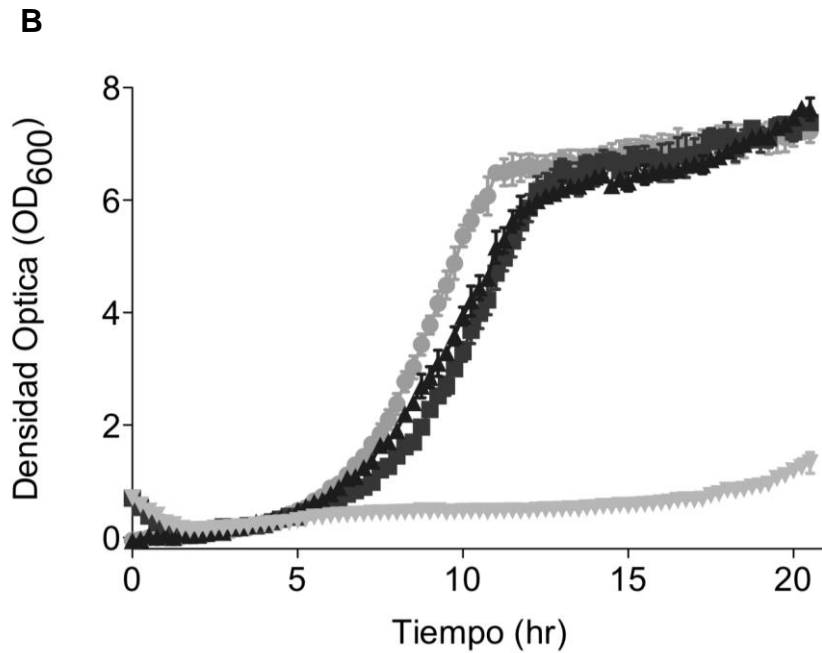
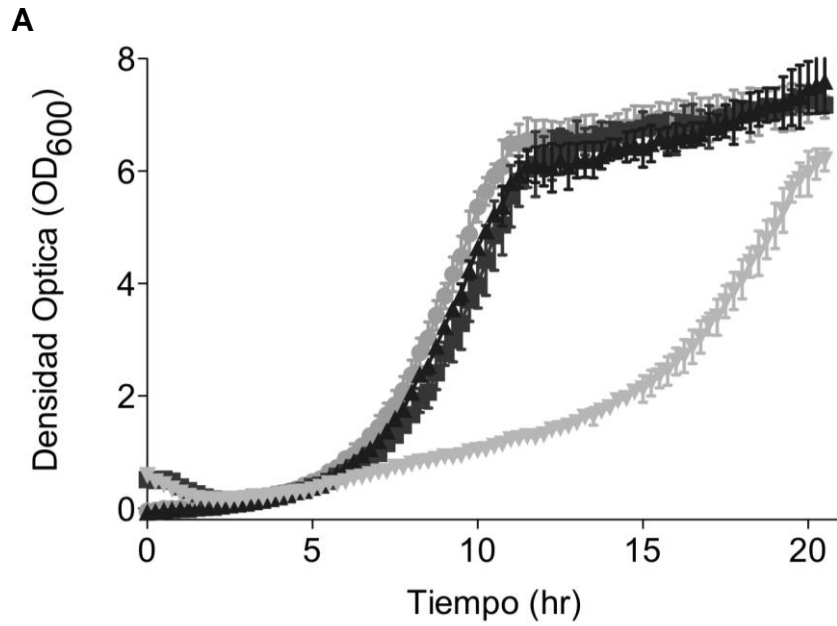


FIG. 3





- ②① N.º solicitud: 201230823  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.05.2012  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/722** (2006.01)  
**A61P31/10** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	O'HERLIHY E. A. et al. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. Folia Geobotanica. 2003, Vol. 38, páginas 201-207, todo el documento.	1-16
A	TIKHONOV V. E. et al. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl)succinoyl/-derivatives. Carbohydrate Polymers. 15.12.2005, Vol. 64, páginas 66-72, todo el documento.	1-16
A	OHASHI Y. et al. AMF-26, a Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy. The Journal of Biological Chemistry. 03.02.2012, Vol. 287, Nº. 6, páginas 3885-3897, todo el documento.	1-16
A	SURVILADZE Z. et al. Identification of a small GTPase Inhibitor using a high-throughput flow cytometry bead-based multiplex assay. J Biomol Screen. 01.2010, Vol. 15, Nº 1, páginas 10-20, todo el documento.	1-16

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:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 27.05.2013</p>	<p><b>Examinador</b> M. Cumbreño Galindo</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	--	------------------------------

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, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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	O'HERLIHY E. A. et al. Folia Geobotanica. Vol. 38, páginas 201-207.	2003
D02	TIKHONOV V. E. et al. Carbohydrate Polymers. Vol. 64, páginas 66-72.	15.12.2005
D03	OHASHI Y. et al. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 287, Nº. 6, páginas 3885-3897.	03.02.2012
D04	SURVILADZE Z. et al. J Biomol Screen. Vol. 15, Nº 1, páginas 10-20.	01.2010

**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 tiene por objeto una composición que comprende quitosano, o un oligosacárido de quitosano, y un inhibidor del gen ARL1 y su uso como antifúngico (reivindicaciones 1 a 16).

D01 compara el efecto del fungicida Ridomil con su aplicación secuencial junto con quitosano o con quitosano solo y, así mismo, con estrategias de control biológico empleando la inoculación con micorrizas arbusculares y quitosano.

D02 demuestra que el quitosano presenta una elevada actividad frente a todas las bacterias, levaduras y hongos.

D03 identifica un compuesto inhibidor de Arf1 denominado AMF-26 con actividad anticancerígena.

D04 identifica el inhibidor de GTPasas MLS000532223.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

En el estado de la técnica es sobradamente conocido el uso de quitosano y de oligosacáridos de quitosano como antifúngicos, así como los compuestos inhibidores del gen ARL1. Sin embargo, en la documentación y bases de datos que han sido consultadas no se ha encontrado una composición que comprenda quitosano y un inhibidor del gen ARL1 tal como los reivindicados por lo que las reivindicaciones 1 a 16 se pueden considerar nuevas a la vista del estado de la técnica y presentan actividad inventiva.