

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 766**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 31/6615** (2006.01)

**A01N 57/12** (2006.01)

**A01N 57/16** (2006.01)

**A61L 2/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2002 E 10184218 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2311466**

54 Título: **Compuestos antimicrobianos y métodos para su utilización**

30 Prioridad:

**03.05.2001 US 847654**

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

**02.11.2015**

73 Titular/es:

**LAKEWOOD-AMEDEX, INC (100.0%)  
3030 University Pkwy  
Sarasota, FL 34243, US**

72 Inventor/es:

**DALE, RODERIC M. K.;  
GATTON, STEVEN L.;  
ARROW, AMY y  
THOMPSON, TERRY**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

**ES 2 549 766 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**

Compuestos antimicrobianos y métodos para su utilización

**5 Campo de la invención:**

La invención se refiere en general al campo de los productos químicos protonados y específicamente a compuestos protonados utilizados como estabilizadores de pH y agentes terapéuticos que contienen dichas moléculas.

10

**Antecedentes de la invención:**

Hubo un tiempo en que se pensaba que las bacterias patógenas responsables de enfermedades infecciosas eran controlables a través del uso de una batería de antibióticos tales como la penicilina, la estreptomycin, tetraciclina y otros. Sin embargo, dado que el uso generalizado de antibióticos se inició en la década de 1950, cada vez más bacterias han evolucionado para convertirse en resistentes a uno o más antibióticos. Las cepas resistentes a los fármacos múltiples son cada vez más comunes, sobre todo en los hospitales.

15

20

Actualmente, las infecciones por *Staphylococcal* nosocomiales muestran resistencia a múltiples fármacos. Véase, por ejemplo, Archer et al., 1994, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2231-2237. En este momento, el antibiótico restante que demuestra la capacidad de matar a la mayoría de cepas de estafilococos es la vancomicina. Sin embargo, cepas resistentes a la vancomicina de *Staphylococcus* y *Enterococcus* ya han sido aisladas y documentadas por Zabransky et al., 1995, *J. Clin. Microbiol.* 33(4): 791-793. Además, la transferencia de la resistencia de los *Enterococci* a los *Staphylococci* ha sido previamente documentada por Woodford et al., 1995, *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 179-184. La *Streptococcus pneumoniae* es una causa principal de morbilidad y mortalidad en los Estados Unidos (M.M. W.R., Feb. 16, 1996, Vol. 45, No. RR-1). Cada año estas bacterias causan 3,000 casos de meningitis, 50,000 casos de bacteriemia, 500,000 casos de neumonía y 7,000,000 casos de otitis media. Las tasas de mortalidad son superiores al 40% en la bacteriemia y superiores al 55% en la meningitis, a pesar de la terapia con antibióticos. En el pasado, los *Streptococcus pneumoniae* eran uniformemente susceptibles a los antibióticos; sin embargo, han surgido cepas resistentes a los antibióticos y se están generalizando en algunas comunidades.

25

30

35

Además, existen casos en que la resistencia a los antibióticos no es un problema, aunque una bacteria en particular sigue siendo refractaria al tratamiento usando antibióticos convencionales. Tal es el caso de *Escherichia coli* 0157: H7, un agente causante de intoxicación alimentaria y de muerte debido a la carne poco cocida. El Departamento de Agricultura estima que 10 personas mueren cada día y otras 14,000 enferman debido a esta bacteria. Lamentablemente, los antibióticos convencionales son completamente ineficaces contra este organismo.

40

45

La historia del tratamiento con antibióticos de bacterias patógenas es cíclica. Las bacterias son organismos notablemente adaptativos, y, para cada nuevo antibiótico que se ha desarrollado, surgen cepas bacterianas resistentes a través del uso generalizado de los antibióticos. Por lo tanto, existe una constante necesidad de producir nuevos antibióticos para combatir la próxima generación de bacterias resistentes a los antibióticos. Los métodos tradicionales de desarrollo de nuevos antibióticos han disminuido, y en los últimos dos años, sólo un nuevo antibiótico ha sido aprobado por la FDA. Además, según Kristinsson (*Microb. Drug Resistance* 1(2):121(1995)), "no hay nuevas clases de antimicrobianos con actividad contra positivos de Gram resistentes en el horizonte."

50

La solicitud de patente internacional WO 00/40591 describe monómeros de ácidos de oligonucleótidas modificadas o ácidos nucleicos modificados, en particular compuestos con sustitución de 2'-Ometil en ribosa con "bloques de extremo" de butanol, que tienen actividad antibacteriana.

55

Existe la necesidad de un compuesto que proporcione un entorno de composición que permita un incremento en la eficacia de los agentes antibacterianos conocidos. También existe la necesidad en la técnica de un compuesto que facilite la actividad de un agente antibacteriano activo, permitiendo así el uso de una menor cantidad o dosis de antibiótico al tiempo que reduce el desarrollo de cepas bacterianas resistentes.

60

**Resumen de la invención**

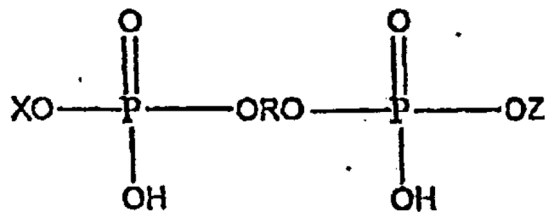
La presente invención proporciona moléculas que tienen actividad antimicrobiana, cuyas moléculas tienen dos bloques de extremo y al menos un sitio aceptor de protones. La invención también proporciona composiciones de la invención que comprenden un compuesto antimicrobiano protonado y un excipiente. Los compuestos protonados de la invención se pueden utilizar como el único agente activo en la composición, o pueden ser utilizados en conjunción con otro agente activo para mejorar la eficacia de composiciones contra las cepas resistentes de bacterias y hongos oportunistas.

65

La estructura de los compuestos de la invención es X-Y-Z, donde X y Z son grupos de bloqueo de extremo alquilo o alcohol, que pueden ser iguales o diferentes, e Y es una molécula que contiene fósforo con sitios de protonación.

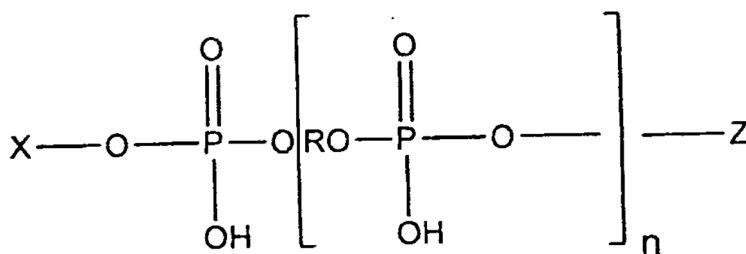
5

Las estructuras ejemplares son



10

donde X y Z son grupos de bloqueo de extremo alquilo o alcohol, que pueden ser iguales o diferentes, y R es por ejemplo, un alquilo, arilo, alqueno, alquilalqueno, arilalqueno o alquilarilalqueno difuncional, (que contiene preferiblemente 1-20 átomos de carbono, y preferiblemente 1-6 átomos de carbono), o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;



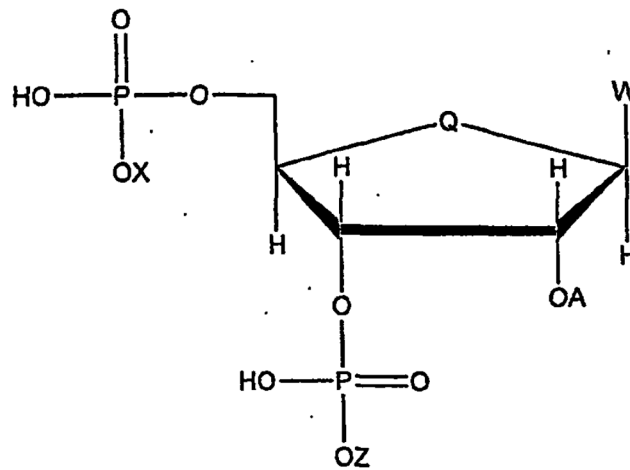
15

en que X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcohol, n es un número entero del 1 al 20 y cada R se selecciona de forma independiente entre un alquilo, un arilo, un alqueno, un alcohol, un fenol, un enol y  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ .

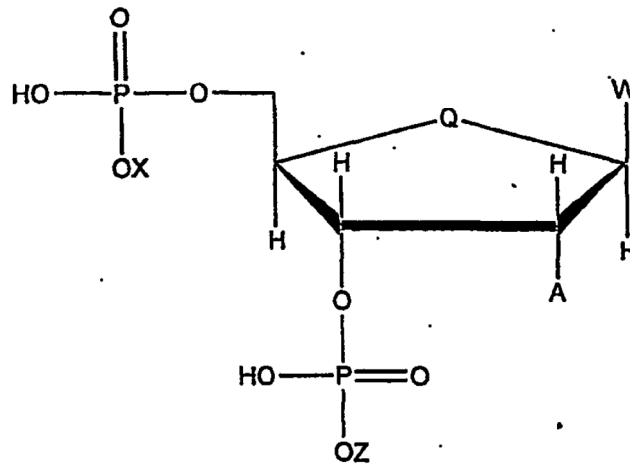
20

En otra realización, Y es una estructura de azúcar, preferiblemente pentosa o hexosa, flanqueada por grupos fosfato sustituidos o no sustituidos. Ejemplos de tales grupos de azúcar se pueden ver en las Estructuras 3A, 3B a continuación:

3A



3B



en que:

5

Q es O,

A es H, alquilo, o alquilo -(O-alquilo), arilo, alquenilo, alcanol, fenol, o enol;

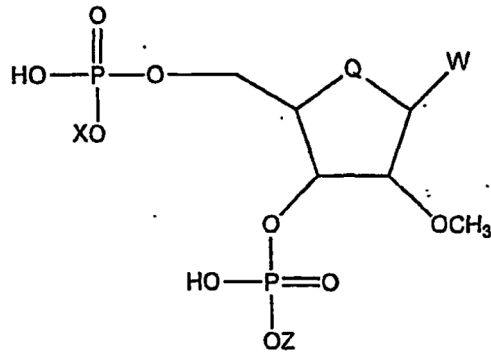
X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcanol que pueden ser iguales o diferentes; y

W es H, o una purina o pirimidina, o un análogo modificado de una purina o pirimidina.

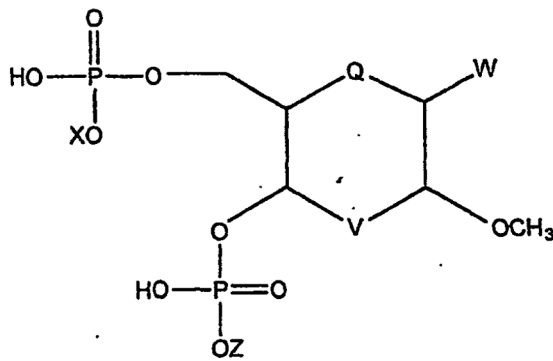
10

Otros ejemplos de dichos grupos de azúcar se pueden ver en las Estructuras 4A y 4B a continuación:

4A



4B

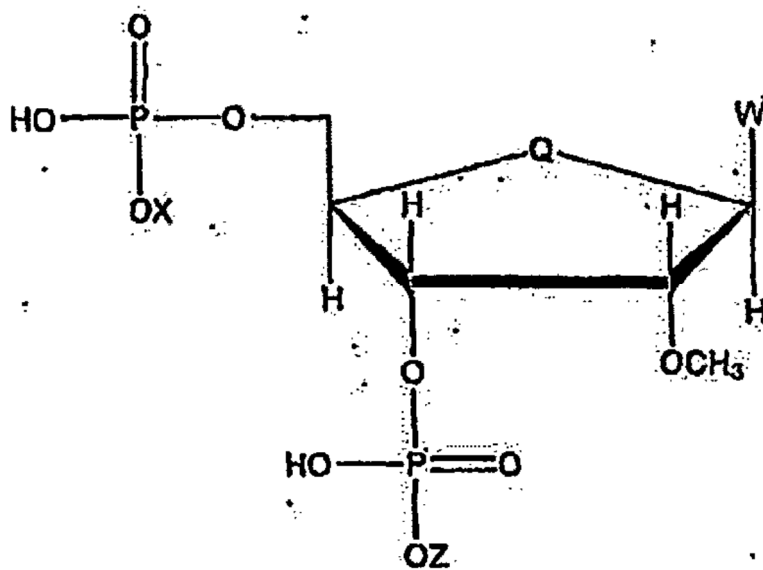


en que:

- 5 V o Q es independientemente O, -CH<sub>2</sub>, -CH(OH)-, -CH<sub>2</sub>- (O-alquilo)-;  
 X y Z son grupos de bloqueo de extremo que pueden ser iguales o diferentes; y  
 W es H, o una purina o pirimidina, o un análogo modificado de una purina o pirimidina.

- 10 En una realización preferente, Q y / o V pueden ser independientemente -CH<sub>2</sub>-, -CH(OH)-, o -CH(-O-alquilo)-.

En una realización preferente, el azúcar es una molécula de pentosa con una sustitución en el sitio 2 de carbono (en lo sucesivo "2-R sustituido" y similares), tal como se ilustra en la Estructura 5:



15

Donde Q es O; y

W, X y Z son tal como se ha indicado anteriormente.

5 Los grupos X y Z son fracciones químicas que proporcionan estabilidad. Los grupos de bloqueo de extremo impiden la degradación de la molécula. Los bloques de extremo son alquilo o alcohol, en que la fracción de alquilo tiene entre 1 y 20 átomos de carbono y puede ser de cadena lineal, ramificada o cíclica, pero preferiblemente es una cadena lineal que contiene 1-4 átomos de carbono. X y Z pueden ser el mismo grupo químico (por ejemplo, grupos butilo) o dos fracciones químicas diferentes (por ejemplo, X es un grupo butilo y Z es un butanol).

10 En una realización específica, el compuesto es una molécula protonada que tiene grupos de bloqueo de extremo para evitar la degradación, y un grupo de azúcar con una modificación de 2-R o 2-OR. Un ejemplo de una molécula de este tipo se muestra como la Estructura 5. Los compuestos protonados que se describen en el presente documento se acidifican para proporcionar un pH cuando se disuelven en agua con un pH de menos de 6 a aproximadamente 1, más preferiblemente un pH de menos de 4.5 a  
15 aproximadamente 1, e incluso más preferiblemente un pH de menos de 3 a alrededor de 2.

También se proporcionan métodos para inhibir o prevenir el crecimiento de bacterias, hongos o virus, poniendo en contacto el microorganismo infeccioso con una composición que comprende un compuesto protonado tal como se describe en el presente documento.

20 Se proporcionan específicamente métodos terapéuticos de la utilización de compuestos protonados como ingredientes inactivos en las composiciones tópicas que contienen un ingrediente activo, por ejemplo, un antibiótico antifúngico o antiviral. El método preferido de tratamiento comprende la administración de los compuestos protonados con un excipiente apropiado a un animal. Por ejemplo, los compuestos  
25 protonados se administran para aliviar el síntoma del crecimiento bacteriano, o en una cantidad eficaz para el tratamiento de una infección bacteriana.

También se describe el uso de los compuestos protonados como un conservante biostático o biocida inactivo en composiciones, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, con el fin de preparar composiciones medicinales para el tratamiento de infecciones bacterianas en animales, y más preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos.

30 Se describe el uso de los compuestos protonados como un ingrediente activo que tiene propiedades antifúngicas contra agentes infecciosos tales como *Candida albicans* y *Trichophyton*.

35 Se describe el uso de los compuestos protonados como un ingrediente activo que tiene propiedades antivirales contra agentes infecciosos, tales como herpes simplex que se encuentra en el herpes labial.

40 Se describe el uso de los compuestos protonados descritos como ingredientes activos en una crema tópica para la piel con un excipiente cosmético aceptable. Dichas cremas tópicas para la piel pueden contener aditivos tales como emolientes, humectantes, fragancias, y similares.

45 Se describen soluciones desinfectantes que comprenden los compuestos protonados descritos. El desinfectante puede ser adecuado para su uso en la piel, debido a la no toxicidad de los compuestos protonados, o puede ser utilizado para la desinfección de una superficie, como por ejemplo dispositivos médicos, por ejemplo, un instrumento quirúrgico.

50 Uno de los objetos es el uso de compuestos protonados en conjunción con uno o más agentes antibacterianos para inhibir el crecimiento de cualquier bacteria, incluyendo bacterias patógenas clínicamente relevantes.

55 Es una ventaja de la invención que el mecanismo de acción de la actividad de los compuestos protonados sea eficaz contra cualquier bacteria incluyendo bacterias patógenas clínicamente relevantes, tanto Gram positivas como Gram negativas.

Es otra ventaja de la invención que los compuestos protonados no sean tóxicos para un sujeto tratado con la composición que contiene los compuestos protonados

60 Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica al leer los detalles de los compuestos protonados y los usos de los mismos, tal como se describe más detalladamente a continuación.

#### Breve descripción de los dibujos

65 La Figura 1 ilustra la estructura química de las moléculas ejemplares de una forma de realización preferente.

La Figura 2 ilustra las estructuras de fosfato de alquilo que se pueden utilizar como el grupo central (Y) en los compuestos que se describen en el presente documento; X y Z son grupos de bloqueo de extremo que pueden ser iguales o diferentes.

5 La Figura 3 ilustra estructuras de azúcar ejemplares del grupo central (Y) de las moléculas que se describen en el presente documento.

La Figura 4 ilustra fracciones químicas de un solo anillo (W) ejemplares que pueden asociarse a un grupo de azúcar en el grupo central (Y) tal como se describe en el presente documento.

10 Las Figuras 5 y 6 ilustran fracciones químicas de anillos dobles y múltiples (W) ejemplares que pueden asociarse a un grupo de azúcar en el grupo central (Y) tal como se describe en el presente documento.

La Figura 7 ilustra fracciones químicas ejemplares parcial o totalmente hidrogenadas (W) que pueden estar unidas a un grupo de azúcar en el grupo central (Y) en la presente invención.

La Figura 8 ilustra una estructura de anillo oxidado (W) ejemplar que puede estar unida a un grupo de azúcar en el grupo central (Y) tal como se describe en el presente documento.

15 La Figura 9 ilustra un sustituyente aceptor de protones ejemplar (W) que puede estar unido a un grupo azúcar en el grupo central (Y) tal como se describe en el presente documento.

### Descripción de las Realizaciones Preferentes

20 Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos, ya que éstos, lógicamente, varían. Debe entenderse también que la terminología utilizada en este documento es con el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención, que quedará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

25 Debe tenerse en cuenta que, tal como se utilizan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares un, y, y el/la incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a bacteria incluye una pluralidad de especies de bacterias y un compuesto protonado puede abarcar una pluralidad de dichos compuestos y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por parte de un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier procedimiento, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.

40 Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento describen y revelan, por ejemplo, los agentes activos de antibióticos, los excipientes de la composición, y las metodologías que podrían ser utilizados en relación con la invención que se está describiendo. Las publicaciones descritas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo aquí se indica debe ser interpretado como una admisión de que los inventores no tienen derecho a preceder a dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

### Definiciones

45 El término "antimicrobiano" se refiere a la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de microorganismos (incluyendo, sin limitación, virus, bacterias, levaduras, hongos, protozoos, etc.), o de atenuar la gravedad de una infección microbiana. Los compuestos antimicrobianos de la presente invención son compuestos que se pueden usar en el tratamiento de enfermedades e infecciones.

50 El término "protonación" y "acidificación" tal como se utiliza indistintamente en este documento se refiere al proceso por el cual los protones (o iones de hidrógeno con carga positiva) se añaden a los sitios aceptores de protones en un compuesto de la invención. Los sitios aceptores de protones incluyen los fosfatos sustituidos o no sustituidos del grupo central, así como cualquier sitio aceptor de protones adicional ya sea en el grupo central o en grupos de bloqueo de extremo. A medida que se reduce el pH de la solución, el número de estos sitios aceptores que son protonados aumenta, dando como resultado un compuesto más altamente protonado.

60 El término "compuesto protonado" se refiere a una molécula de la invención que, cuando se disuelve en agua que tiene un pH de 7 hace que el pH de la solución disminuya. Generalmente, los compuestos se protonan mediante la adición de protones a los sitios reactivos en la molécula, aunque son posibles otras modificaciones de la molécula, y se pretende que queden abarcados por este término. Dicha protonización se puede conseguir, por ejemplo, incubando el compuesto en presencia de un ácido fuerte, lo más preferiblemente uno con una base conjugada volátil.

65 Los términos "grupo de extremo" y "grupo de bloqueo de extremo", tal como se utilizan aquí se refieren a cualquier fracción de alquilo o alcohol que evita la degradación sustancial de la nucleasa, y en particular la

degradación de la exonucleasa, de un compuesto protonado. En una realización específica, la modificación química se posiciona de tal manera que protege el grupo central de la molécula, es decir, el grupo de bloqueo es el X o Z que protege el grupo central Y de la estructura X-Y-Z. El / los grupo(s) de extremo (s) y / o grupo (s) de extremo de bloqueo de una molécula de X-Y-Z pueden ser iguales o diferentes.

El término "agente activo" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a compuestos con actividad conocida para el tratamiento de enfermedades causadas por microbios, y en particular los agentes que son eficaces en aplicación sublingual, intraocular, intraaural, y en particular, tópica.

Los grupos centrales o de extremo pueden contener fracciones químicas tales como fosfodiésteres, metilfosfonatos, etilfosfotriesteres, metilfosforotioatos, grupos metil-p-etoxi, metilos, alquilos, O-alquilos, O-alquil-N (O-alquilo), átomos de flúor, desoxi-eritropentofuranosiles, ribonucleósidos metilo, carbamatos metílicos, carbonatos metilo, bases invertidas (por ejemplo, T invertidas), etc. En una realización preferente, estas fracciones químicas contienen grupos de enlaces de oxígeno, por ejemplo, O-metilo o O-alquilo-n (O-alquilo).

El término "alquilo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una cadena de hidrocarburo de cadena lineal, cíclica, ramificada o no ramificada, saturada o insaturada que contiene 1-20 átomos de carbono (preferiblemente 1-6), como por ejemplo, metilo, etilo, propilo, terc-butilo, n-hexilo y similares.

El término "alcohol" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una cadena de hidrocarburo ramificado o no ramificado que contiene 1-6 átomos de carbono y al menos un grupo -OH, tales como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, y similares.

Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se utilizan en este documento para significar generalmente la obtención de un efecto farmacológico y / o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y / o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad (o infección), y / o efecto adverso atribuible a la enfermedad (o infección). "Los términos" tratamiento ", " tratar "y similares tal como se utilizan en el presente documento incluyen:

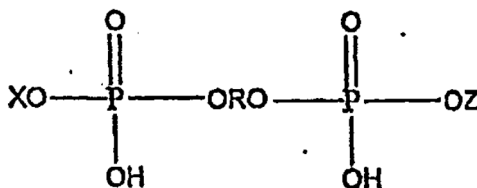
- (a) prevenir que una enfermedad y / o infección microbiana se produzca en un sujeto que puede estar predispuesto a la misma, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga;
- (b) inhibir el progreso o la transmisión de una enfermedad y / o infección microbiana, es decir, detener su desarrollo o mantenimiento; o
- (c) aliviar una enfermedad y / o infección bacteriana (es decir, provocar la regresión y / o mejora de la enfermedad). La invención se dirige particularmente hacia el tratamiento de pacientes con cualquier bacteria u hongos infecciosos;

en un mamífero, y en particular en un mamífero humano.

La presente invención utiliza compuestos protonados como agentes antimicrobianos y, en particular como agentes antimicrobianos que tienen actividad contra bacterias, hongos, protozoos y virus. Estos compuestos son especialmente útiles en aplicaciones médicas, tanto alopáticas como homeopáticas. El efecto bactericida / bacteriostático también permite el uso de estas composiciones en composiciones para la esterilización (por ejemplo, la esterilización de la piel o de una superficie o un objeto como por ejemplo un instrumento quirúrgico, etc.), o de desinfección (por ejemplo, la limpieza de una superficie, instrumento, etc., así como para que quede libre de concentraciones indeseables de microorganismos causantes de enfermedades (incluyendo virus). Además, los propios compuestos protonados en concentraciones específicas tienen un efecto conservante antimicrobiano, y por lo tanto también son útiles en la prevención de crecimiento microbiano no deseado en las composiciones.

Los compuestos protonados tal como se describen en el presente documento tienen la estructura X-Y-Z, donde X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcohol, que pueden ser iguales o diferentes, e Y es una molécula que contiene fósforo con sitios de protonación.

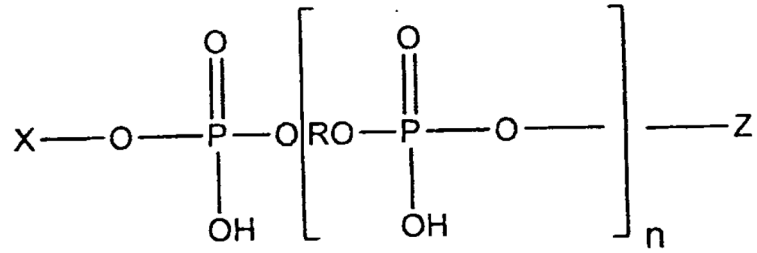
Las estructuras ejemplares son:





donde X y Z son grupos de bloqueo de extremo alquilo o alcohol, que pueden ser iguales o diferentes, y R es un por ejemplo, un alquilo, arilo, alquenilo, alquilalquenilo, arilalquenilo o alquilarilalquenilo difuncional, (que contiene preferiblemente 1-20 átomos de carbono, y preferiblemente 1-6 átomos de carbono), o  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ; o

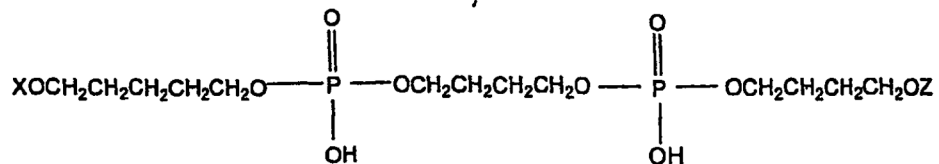
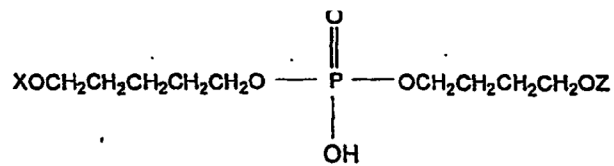
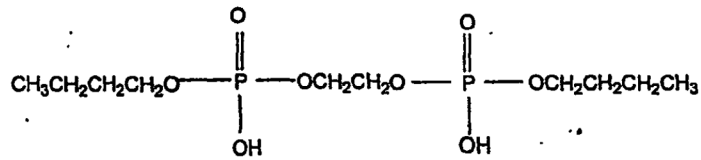
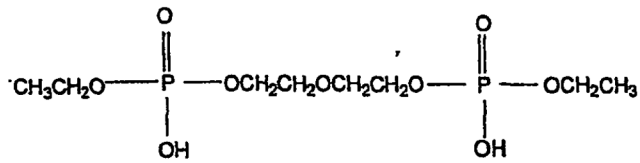
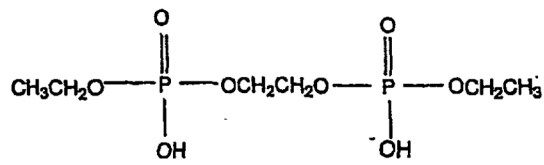
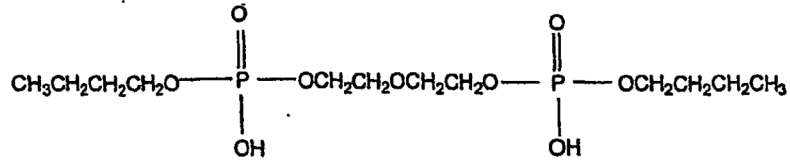
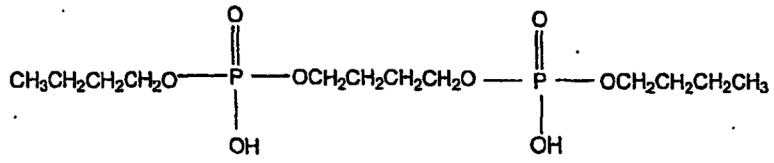
5



en que X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcohol, n es un número entero del 1 al 20 y cada R se selecciona de forma independiente entre un alquilo, un arilo, un alquenilo, un alcohol, un fenol, un enol y  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$

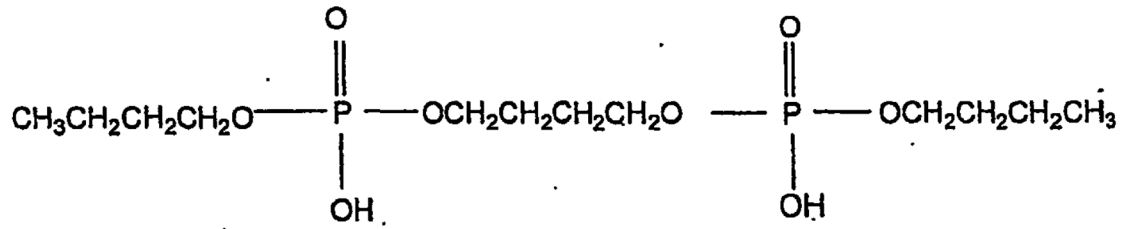
10

Los ejemplos de moléculas que se pretende que queden incluidas por las estructuras descritas más arriba incluyen:



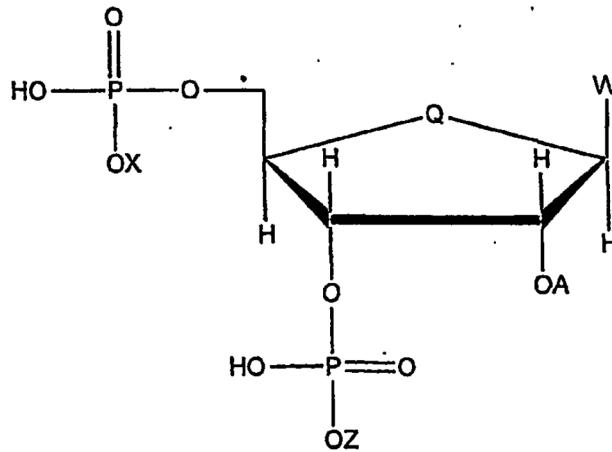
5

Un ejemplo particularmente preferido de dichos compuestos es Nu-5:



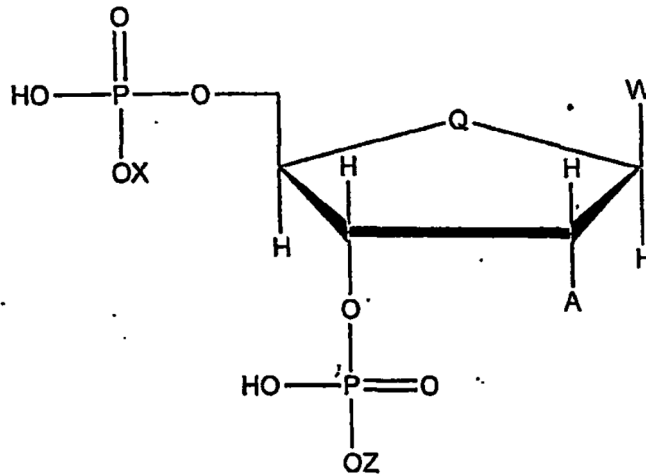
En otra realización, Y es una estructura de azúcar, preferiblemente pentosa o hexosa, flanqueada por grupos fosfato sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de compuestos X-Y-Z que contienen dichos grupos de azúcar Y se ilustran a continuación:

5



y

10



En que

15

Q es O; alquilo

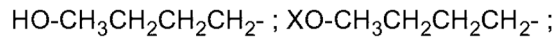
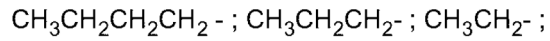
A es H alquilo, alcoxi, o alquilo (O-alquilo), arilo, alqueno, alcano, fenol, o enol;

X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcano que pueden ser iguales o diferentes; y

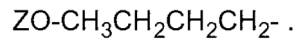
W es H, o una purina o pirimidina, o un análogo modificado de una purina o pirimidina.

20

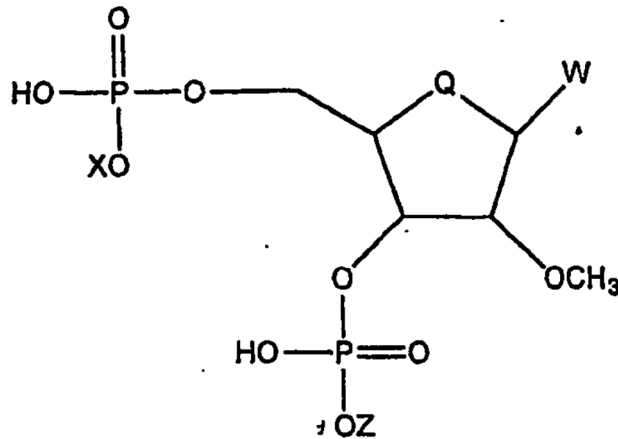
Los ejemplos preferentes de dichos compuestos tienen grupos de bloqueo X o Z, que comprenden de forma independiente una estructura seleccionada del grupo que consta de:



y

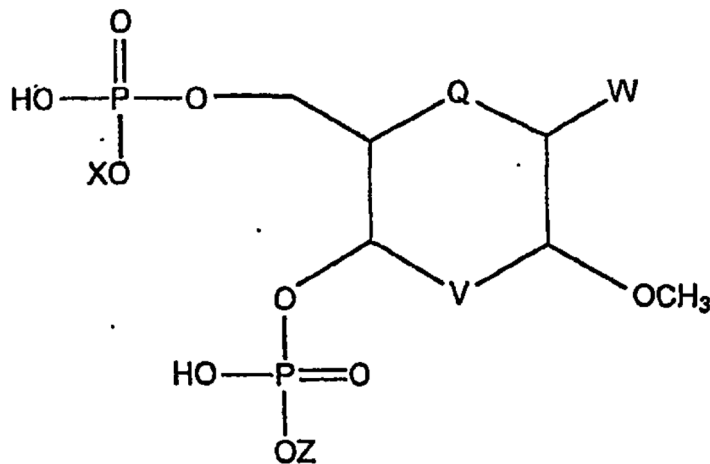


- 5 Los ejemplos preferentes de dichos compuestos tienen un grupo A, que comprende una estructura seleccionada del grupo que consta de: - H; - CH<sub>3</sub>; - OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; y - OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Otros ejemplos de compuestos X-Y-Z que contienen dichos grupos de azúcar Y se ilustran a continuación.



10

y



15

En que:

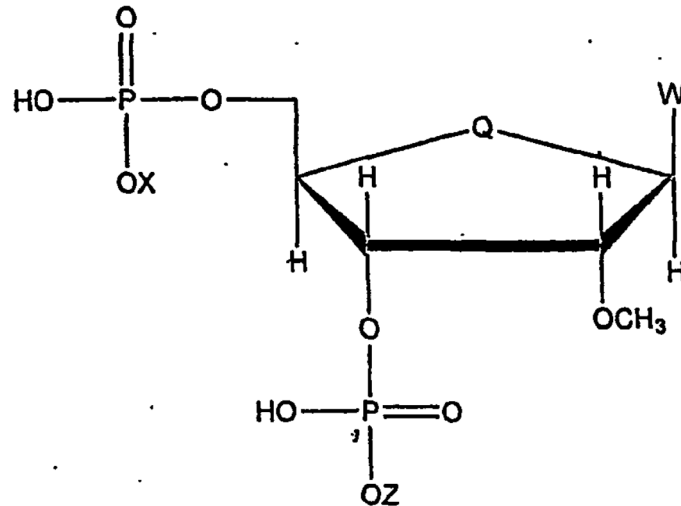
V o Q es independientemente O, -CH<sub>2</sub>-, -CH(OH)-, -CH(O-alquilo);

20

X y Z son grupos de bloqueo de extremo de alquilo o alcohol que pueden ser iguales o diferentes; y

W es H, o una purina o pirimidina, o un análogo modificado de una purina o pirimidina.

En una realización preferente, el azúcar es una molécula de pentosa con una sustitución en el sitio 2 de carbono (en lo sucesivo "2-R sustituido" y similares), tal como se ilustra en la Estructura 5:

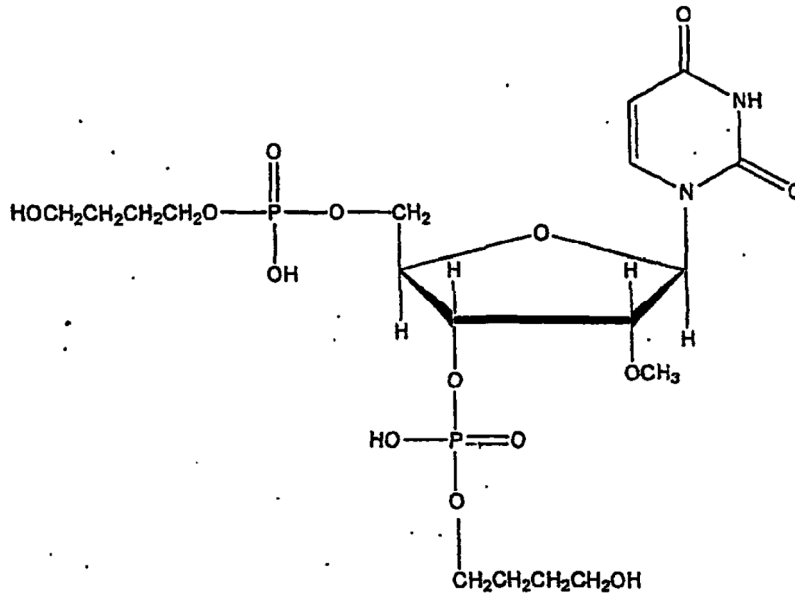


Q es O;  
W, X y Z son tal como se ha indicado anteriormente.

5

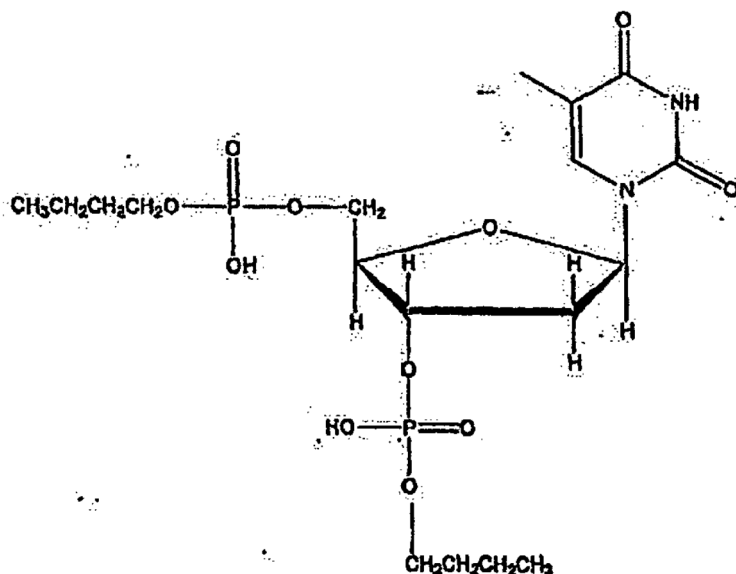
Los grupos X y Z son fracciones químicas que proporcionan estabilidad y previenen la degradación de la molécula. Los bloques de extremos son alquilo o alcanol, en que la fracción de alquilo puede ser de cadena lineal, ramificada o cíclica, pero preferiblemente es una cadena lineal que contiene 1-4 átomos de carbono. X y Z pueden ser el mismo grupo químico (por ejemplo, grupos butilo) o dos fracciones químicas diferentes (por ejemplo, Z es un grupo butilo y X es un butanol). Un ejemplo particularmente preferido de tales compuestos es el compuesto **Nu-2** ((4-hidroxi-butil)-fosfato-5'-uridina-2'-metoxi-3'-fosfato-(4-hidroxi-butil)):

10



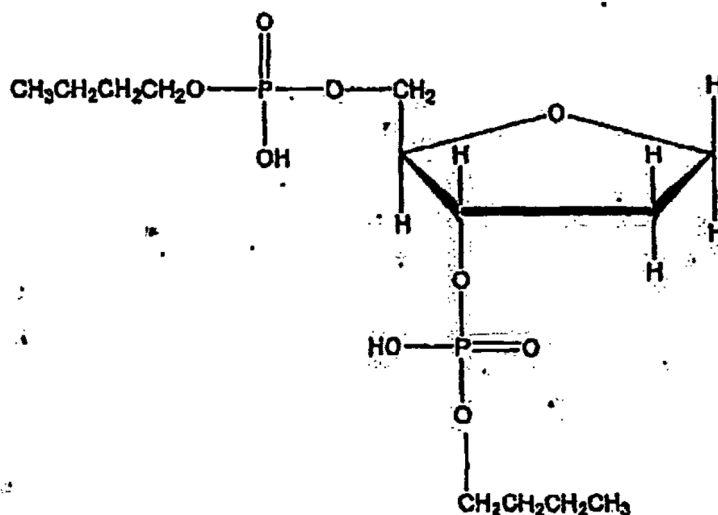
15

Otro ejemplo particularmente preferido de dichos compuestos es el compuesto **Nu-3** (butil-5'-fosfato-timidina-3'-fosfato-butil):



Otro ejemplo particularmente preferido de tales compuestos es el compuesto **Nu-4** (butil-5'-fosfato-ribose-3'-fosfato-butil):

5



La protonación de los compuestos tal como se describe en el presente documento es el proceso por el cual los protones (o iones de hidrógeno positivos) se añaden a los sitios de los reactivos en la molécula. A medida que aumenta el número de sitios reactivos que son protonados, el pH obtenido cuando los compuestos se disuelven en agua que tiene un pH de 7 disminuye, y por lo tanto la cantidad de protonación de los compuestos se puede determinar midiendo el pH de las soluciones de agua después de la adición de los compuestos tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, los compuestos de la presente invención están protonados de manera que cuando se disuelven en agua (pH 7), forman una solución acuosa que tiene un pH de entre menos de pH 7 a aproximadamente 1, preferentemente un pH de entre menos de aproximadamente 6 a aproximadamente 1, y más preferentemente un pH de entre menos de aproximadamente 5 a aproximadamente 1. En una realización más preferida, los compuestos que se describen en el presente documento están protonados de manera que cuando se disuelven en agua (pH 7), forman una solución acuosa que tiene un pH de entre menos de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 1, preferentemente un pH de entre menos de aproximadamente 4 a aproximadamente 1, más preferiblemente un pH de entre menos de aproximadamente 3 a aproximadamente 1, y aún más preferiblemente un pH de entre menos de aproximadamente 2 a aproximadamente 1. Específicamente, el pH puede ajustarse para que resulte óptimo para cualquier agente activo dado mediante el control de la cantidad de protonación del compuesto.

10

15

20

25

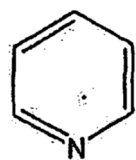
El porcentaje de degradación por ácido se puede determinar usando HPLC analítica para evaluar la pérdida de moléculas funcionales, o mediante otros métodos adecuados. La degradación por el ácido se

5 mide generalmente como una función del tiempo. Preferiblemente, los compuestos protonados tal como se describe en el presente documento también son resistentes a la nucleasa, lo que permite a estas moléculas mantener la actividad (por ejemplo, la estabilidad del pH) en un entorno in vivo. El porcentaje de degradación de las moléculas en un entorno que contiene nucleasa puede ser determinado por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como por ejemplo la espectroscopia de masa. La degradación por nucleasa generalmente se mide como una función de tiempo. Preferiblemente, se utiliza un compuesto de referencia para determinar el grado o tasa de degradación por ácido o nucleasa.

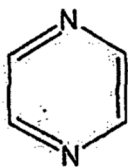
10 La actividad bactericida y / o bacteriostática de las composiciones que incluyen compuestos descritos en el presente documento se puede medir usando cualquier número de métodos disponibles para los expertos en la técnica. Un ejemplo de dicho método es la medición de la actividad antibacteriana a través del uso de una prueba de MIC (concentración inhibitoria mínima) que es reconocida como predictiva de la eficacia in vivo para el tratamiento de una infección bacteriana con antibióticos. Las composiciones descritas en el presente documento muestran la actividad antibacteriana en esta prueba, incluso sin tratamiento previo de las bacterias para permeabilizar la membrana.

15 En una realización, el compuesto protonado tiene un grupo de azúcar, preferiblemente un grupo de ribosa o de glucosa. La estructura de azúcar de las moléculas tal como se describe en el presente documento puede ser modificada a partir desde la de un azúcar que se produce de forma natural, es decir, la estructura global del grupo de azúcar se mantiene, pero uno o más residuos de azúcar es sustituido y / o la estructura de azúcar contiene un residuo adicional en comparación con la forma no sustituida. Ver T.W. Graham Solomons, Organic Chemistry, J. Wiley and Sons, sexta edición (julio de 1998), pp. 937-971 para ejemplos de estructuras de azúcar que pueden utilizarse en los compuestos protonados que se describen en el presente documento.

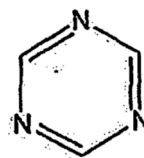
20 "W" tal como se utiliza en las estructuras y los dibujos que se describen en el presente documento es una purina o pirimidina, o un análogo modificado de una purina o pirimidina. Las figuras 4-8 ilustran grupos sustituyentes ejemplares (W) que pueden añadirse a la estructura natural del grupo de azúcar para su uso en compuestos protonados que se describen en el presente documento. Dichos compuestos (W) incluyen, pero no se limitan a, análogos modificados de purinas y pirimidinas que no forman emparejamiento de bases Watson-Crick con las bases de origen natural, tales como 2-aminoadenosina, teobromina, cafeína, teofilina, y ácido úrico; estructuras basadas en estructuras de un solo anillo tales como piridina, pirazina o triazina (Figura 4):



piridina

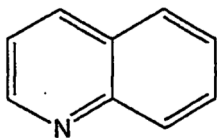


pirazina

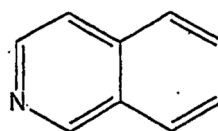


triazina

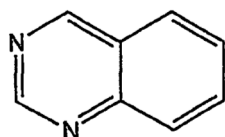
35 estructuras basadas en estructuras de anillos múltiples tales como indol, acridina, indazol, fenoxazina, fenazina, fenotiazina, quinolina, isoquinolina, quinazolina y pteridina (Figura 5):



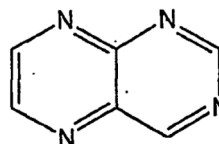
quinolina



isoquinolina

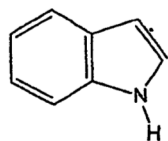


quinazolina

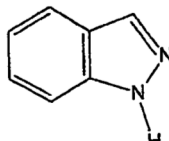


pteridina

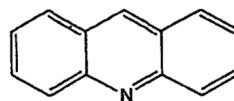
estructuras de anillo individual y múltiple parcial o totalmente hidrogenadas (Figura 6):



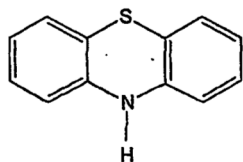
**indol**



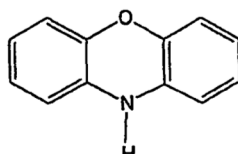
**indazol**



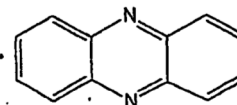
**acridina**



**fenotiazina**



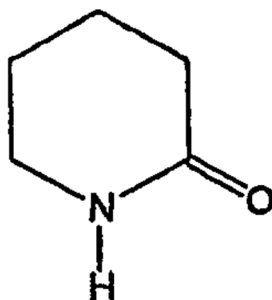
**fenoxazina**



**fenazina**

5

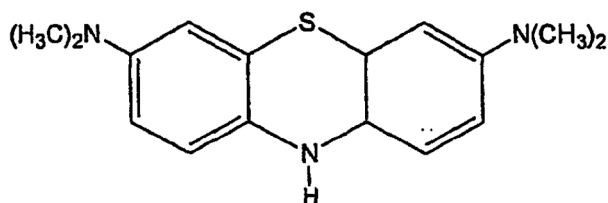
estructuras de anillos individuales y múltiples parcialmente oxidados, por ejemplo, caprolactam (Figura 7):



**caprolactam**

10

estructuras con sustituyentes aceptores de protones, por ejemplo, heterociclos, tales como azul de leucometileno que contiene nitrógeno (Figura 8):



**azul de leucometileno**

15

y otras estructuras que tienen configuraciones de electrones similares a purinas y pirimidinas.

20

Cada uno de estos sustituyentes se puede modificar adicionalmente con grupos donantes o aceptores de electrones, halógenos, alcoholes, dioles, amidas de fósforo, y ácidos fosfónicos y similares para ajustar la capacidad de aceptación de protones y / u otra característica del compuesto. Aunque la estructura W se ilustra como sustituida en el sitio 1 de carbono de la molécula de azúcar, la estructura W puede estar vinculada a un sitio diferente, por ejemplo, el sitio 2 o 3 de carbono del grupo de azúcar.

25

Los sustituyentes se seleccionan, en general, para mejorar uno o más efectos del compuesto, por ejemplo para aumentar el pH, disminuir la toxicidad y similares. Las fracciones químicas particulares que se seleccionan como grupos centrales en los compuestos protonados son fácilmente identificables por un experto en la técnica al leer la presente descripción, y dichas fracciones se pueden encontrar en



referencias como por ejemplo TW Graham Solomons, *Organic Chemistry*, J. Wiley and Sons, sexta edición (julio de 1998); SF Sun, *Physical Chemistry of Macromolecules: Basic Principles and Issues* (1994); J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure*, cuarta edición (agosto de 1992); y L. Stryer, *Biochemistry*, cuarta edición (marzo de 1995).

5

En el presente documento se describen métodos para inhibir el crecimiento de microorganismos poniendo en contacto los microorganismos con composiciones de la invención en las que el agente activo es un compuesto protonado. Estos métodos son eficaces contra las infecciones in vivo, y particularmente infecciones tópicas. Esto se demuestra por los datos de prueba que muestran las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y las concentraciones de biocidas mínimas (CBM) de composiciones contra diversos organismos patógenos cultivadas in vitro en condiciones estándar. Estas pruebas in vitro se correlacionan fuertemente con la actividad in vivo, tal como se evidencia por el uso generalizado de las determinaciones de CIM y CBM para predecir la utilidad de las composiciones antimicrobianas en el tratamiento de infecciones en animales, incluidos seres humanos.

15

Es particularmente sorprendente la capacidad de las presentes composiciones que comprenden un compuesto protonado tal como se describe en el presente documento para extender el rango de efectividad antimicrobiana contra bacterias que antes se consideraban no reactivas a ciertos antibióticos convencionales. Por ejemplo, los compuestos protonados que se describen en el presente documento pueden ser especialmente útiles en composiciones para el tratamiento del acné.

20

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento, además de tener actividad antibacteriana, tienen actividad como antifúngicos. Los compuestos protonados son útiles como agentes activos para las infecciones por hongos como la tinea pedea y la candidiasis.

25

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento, además de tener actividad antibacteriana, tienen actividad como antivirales. Los compuestos protonados son por tanto útiles como agentes activos para las infecciones virales, como el herpes simplex.

30

Las composiciones que se describen en el presente documento pueden proporcionarse como desinfectantes tópicos para la esterilización de superficies tales como mostradores, instrumentos quirúrgicos, vendas, y la piel; como composiciones farmacéuticas, incluyendo a modo de ejemplo, cremas, lociones, ungüentos, o soluciones para aplicación externa sobre la piel y las mucosas, incluyendo superficies de la córnea, cortes y abrasiones dérmicas, quemaduras y zonas de infección bacteriana o fúngica; como composiciones farmacéuticas, incluyendo a modo de ejemplo, cremas, lociones, pomadas, emulsiones, dispersiones de liposomas o formulaciones, supositorios o soluciones, para la administración sobre las superficies mucosas internas, tales como la cavidad oral o la vagina para inhibir el crecimiento de bacterias u hongos, incluyendo levaduras; y como composiciones farmacéuticas tales como cremas, geles o ungüentos para revestir catéteres permanentes e implantes similares que son susceptibles de albergar infección bacteriana o micótica.

40

#### Aditivos Adicionales en Composiciones Tópicas que se describen en el presente documento

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento se pueden utilizar en combinación con agentes activos en productos tales como lociones, cremas y soluciones tópicas. También pueden añadirse otros compuestos para tener efectos humectantes adicionales y para mejorar la consistencia de la composición. Los ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a: cera de ésteres cetílicos, alcohol estearílico, alcohol cetílico, glicerina, metil parabeno, propil parabeno, quaternium-15, humectantes, fluidos de metilsiloxano volátiles y polidiorganosiloxano-polioxilquileno. Véanse, por ejemplo, las patentes n° US 5,153,230 y 4,421,769, ambas incorporadas al presente documento como referencia. Si es deseable que la composición tenga efectos adicionales de limpieza, se pueden añadir productos químicos tales como lauril sulfato de sodio o una sal metálica de un ácido carboxílico.

50

Una amplia variedad de emolientes no volátiles resultan útiles en el presente documento, los ejemplos no limitativos de los cuales se enumeran en, Vol. 2 *Functional Materials*, North American Edition, (1992), de McCutcheon, pp. 137-168, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad, y CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), que enumera agentes acondicionadores de la piel en las págs. 572-575 y protectores de la piel en la pág. 580, que también se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

60

Entre los emolientes no volátiles útiles en materiales especialmente preferentes en este documento se encuentran las siliconas, los hidrocarburos, los ésteres y mezclas de los mismos.

65

Los ejemplos de emolientes de silicona incluyen polialquilsiloxanos, polialquilsiloxanos cíclicos y polialquilarilsiloxanos. Los polialquilsiloxanos adecuados disponibles comercialmente incluyen los polidimetilsiloxanos, que también son conocidos como dimeticonas, ejemplos no limitativos de los cuales

incluyen la serie Vicasil™ vendida por General Electric Company y Dow Corning™ la serie 200 vendida por Dow Corning Corporation. Los polialquilsiloxanos disponibles comercialmente incluyen ciclometiconas (Dow Corning™ 244 fluido), Dow Corning™ 344 fluido, Dow Corning™ 245 fluido y Dow Corning™ 345), etc. Un trimetilsiloxisilicato adecuado disponible comercialmente se vende como una mezcla con dimeticona como Dow Corning™ 593 fluido. Aquí también resultan útiles los dimeticonoles, que son dimetil siliconas terminadas en hidroxilo. Los dimeticonoles adecuados comercialmente disponibles se venden habitualmente como mezclas con dimeticona o ciclometicona (por ejemplo, Dow Corning™ 1401, 1402, y 1403 fluidos). Los polialquilarilsiloxanos adecuados disponibles comercialmente son el metilfenilo SF 1075 fluido (comercializado por General Electric Company) y la feniltrimeticona fluida 556 de calidad cosmética (vendida por Dow Corning Corporation).

Aquí los hidrocarburos útiles incluyen hidrocarburos de cadena lineal y ramificada que tienen aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 átomos de carbono, más preferiblemente de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 átomos de carbono, y más preferiblemente de aproximadamente 16 a aproximadamente 22 átomos de carbono. Los ejemplos no limitativos de estos materiales hidrocarbonados incluyen dodecano, escualano, colesterol, 5 poliisobutileno hidrogenado, docosano (es decir, un hidrocarburo C<sub>22</sub>), hexadecano, isohexadecano (un hidrocarburo disponible en el mercado que se vende como Permethyl™ 101 A en Presperse, South Plainsfield, NJ). Aquí otros materiales hidrocarbonados útiles incluyen parafinas y aceites minerales tales como aceite mineral ligero USP (por ejemplo, Klearol™ disponible en Witco Corp., Melrose Park, Ill.) y aceite mineral pesado USP (por ejemplo, Klearol™ disponible en Witco Corp., Melrose Park, Ill.).

También resultan útiles como emolientes no volátiles los ésteres, incluyendo ésteres de ácidos grasos monofuncionales y difuncionales que han sido esterificados con alcoholes y polioles (es decir, alcoholes que tienen dos o más grupos hidroxilo). Una amplia variedad de ésteres son útiles en el presente documento, en que son preferentes los ésteres de cadena larga de ácidos grasos de cadena larga, (es decir, ácidos grasos C<sub>10-40</sub> esterificados con alcoholes grasos C<sub>10-40</sub>). Ejemplos no limitativos de ésteres que resultan útiles en el presente documento incluyen los seleccionados entre el grupo que consiste en adipato de diisopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, propionato de miristilo, diestearato de etilenglicol, palmitato de 2-etilhexilo, alcoholes de neopentanoato de isodecilo C<sub>12-15</sub> benzoato, maleato de di-2-etilhexilo, palmitato de cetilo, miristato de miristilo, estearato de estearilo, estearato de cetilo, behenil behenrato, y mezclas de los mismos.

Ciertos aditivos, como por ejemplo los alcoholes alifáticos, tienen solubilidades limitadas en solución acuosa. Las composiciones que comprenden cualquiera de estos compuestos, opcionalmente, se pueden formular con una fase lipófila, como en emulsiones y dispersiones y formulaciones de liposomas.

Para la aplicación externa a la piel intacta o para la desinfección de superficies inertes, se puede emplear un disolvente orgánico o un co-disolvente como por ejemplo etanol o propanol. La evaporación del disolvente deja un residuo del compuesto antibiótico y protonado sobre la superficie tratada para inhibir la reinfeción.

Se pueden fabricar formulaciones particulares de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Las formulaciones se proporcionan en, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington y obras de referencia similares.

#### **Utilización Terapéutica de las Composiciones que Contienen Compuestos Protonados**

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento son útiles como compuestos estabilizantes y / o conservantes en composiciones antibióticas tópicas, tanto de prescripción (por ejemplo, cremas de benzomicina) como de venta sin receta (por ejemplo, medicamentos anti-acné que contienen ácido salicílico, peróxido de benzoilo y similares). Cuando se utiliza en el tratamiento terapéutico de la enfermedad, se puede determinar una dosis adecuada de una composición que contiene los compuestos protonados que se describen en el presente documento y un ingrediente activo mediante cualquiera de varias metodologías bien establecidas. Por ejemplo, los estudios en animales se usan comúnmente para determinar la dosis máxima tolerable, o MTD, de agente bioactivo por kilogramo de peso. En general, al menos una de las especies animales ensayadas es un mamífero. Los expertos en la materia extrapolan regularmente las dosis para conseguir una mayor eficacia, evitando la toxicidad a otras especies, incluyendo los seres humanos. Además, las dosis terapéuticas también pueden alterarse dependiendo de factores tales como la gravedad de la infección, y el tamaño o especie del huésped.

Cuando se contempla el uso terapéutico de las composiciones antimicrobianas descritas en el presente documento, las composiciones se administran preferiblemente en un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable. Habitualmente, pero no necesariamente, la formulación preferente para una composición antimicrobiana determinada depende de la localización en un huésped donde se esperaría que un organismo infeccioso determinado invadiera inicialmente, o donde se esperaría que un organismo infeccioso determinado colonizase o se concentrase. Por ejemplo, las infecciones tópicas se tratan o

previenen preferiblemente mediante formulaciones diseñadas para su aplicación sobre superficies específicas del cuerpo, por ejemplo, la piel, las membranas mucosas, etc. En dicha realización, la composición que contiene el ingrediente activo y el compuesto protonado se formula en una base de agua, etanol, y propilenglicol para administración tópica. Alternativamente, cuando el patógeno objetivo coloniza pasajes nasales, se pueden formular composiciones adecuadas para la administración intranasal.

Preferiblemente, los huéspedes animales que pueden tratarse usando las composiciones que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, invertebrados, vertebrados, aves, mamíferos tales como cerdos, cabras, ovejas, vacas, perros, gatos y particularmente seres humanos. Las composiciones que se describen en el presente documento también contemplan que sean eficaces en la lucha contra la contaminación bacteriana de los cultivos de laboratorio, consumibles (preparaciones de alimentos o bebidas), dispositivos médicos, aparatos de hospital, o procesos industriales.

Teniendo en cuenta que las infecciones bacterianas y fúngicas son particularmente problemáticas en individuos inmunocomprometidos, como los pacientes que sufren de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), las personas infectadas por el VIH, los pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia, o a trasplante de médula ósea, etc., una realización adicional es el uso de los compuestos protonados antimicrobianos actualmente descritos como agentes profilácticos para prevenir y / o tratar la infección en pacientes inmuno-comprometidos.

Algunos ejemplos de organismos bacterianos contra los que los métodos y composiciones que se describen en el presente documento son eficaces incluyen bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, y bacterias resistentes al ácido, y en particular, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium* y *Escherichia coli*. Los métodos y composiciones que se describen en el presente documento son eficaces contra la infección de todos los organismos bacterianos, incluidos los miembros de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Listeria*, *Streptomyces*, *Clamidia*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Arachnia*, *Mycobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Dermatophilus*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Peptococcus*, *Pneumococcus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Klebsiella*, *Kurthia*, *Nocardia*, *Serratia*, *Rothia*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Helicobacter*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Yersinia*, y *Haemophilus*.

Una gama de hongos o mohos, llamados dermatofitos, provoca infecciones micóticas de la piel. Estos hongos son parásitos en la piel y causan síntomas diferentes en diferentes partes del cuerpo. Son muy contagiosos y se transmiten de persona a persona. Aunque por lo general estas infecciones son tópicas, en algunos casos (por ejemplo, pacientes inmunosuprimidos) pueden aparecer sistémicamente o internamente.

Las infecciones fúngicas que pueden ser tratadas con las composiciones de la presente invención incluyen dermatofitosis (*Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*), candidiasis (*Candida albicans* y otras especies de *Candida*), tinea versicolor (*Pityrosporum orbiculare*), tinea pedea (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y *Epidermophyton floccosum*), tinea capitis y la tiña (*Trichophyton tonsurans*).

Las infecciones vaginales por hongos son causadas generalmente por *Candida albicans*, que, junto con algunos tipos de bacterias, normalmente están presentes en un número relativamente pequeño en la zona vaginal. A veces el hongo se multiplica rápidamente y se hace predominante, causando la candidiasis o monilia. Esto es a menudo debido a un cambio en el entorno vaginal, lesiones, transmisión sexual, infección por VIH, etc. Las perturbaciones ambientales comunes que favorecen el hongo incluyen el aumento de pH, aumento de calor y humedad, reacciones alérgicas, niveles de azúcar elevados, flujos hormonales, y la reducción de las poblaciones de bacterias que normalmente se encuentran presentes.

#### Terapias conjuntas

Los compuestos protonados se pueden utilizar también en combinación con agentes antimicrobianos convencionales en composiciones que se describen en el presente documento. La actividad agregada de los ingredientes activos puede proporcionar una composición más eficaz, y puede proporcionar múltiples mecanismos a través de los cuales tratar los microbios.

Por ejemplo, las composiciones para el tratamiento del acné pueden comprender los compuestos protonados que se describen en el presente documento con ácido salicílico, peróxido de benzoilo, y / o azufre. Estas cantidades de estos compuestos en composiciones de la invención pueden ser determinadas por un experto en la técnica, las cantidades eficaces están bien documentadas. Véase, C. Zouboulis (Editor) *Sebaceous Glands, Acne and Related Disorders: Basic and Clinical Research, Clinical Entities and Treatment* (1998). Dicha terapia conjunta utilizando los compuestos protonados de la

invención puede aumentar la eficacia de las composiciones sin tener que aumentar las cantidades de los agentes actualmente disponibles para los consumidores, por ejemplo, la cantidad encontrada en productos de venta sin receta. Dichas composiciones son preferentemente acuosas, ya que las composiciones a base de aceite pueden exacerbar la condición de acné.

5

Los compuestos protonados son también útiles en cremas antibióticas generales para uso externo, por ejemplo, para aplicación sobre la piel o los ojos. Una vez más, los compuestos protonados se pueden utilizar como el único agente activo, o se pueden utilizar en terapia conjunta con otros agentes, incluyendo, pero sin limitación, triclosan, eritromicina, sulfato de neomicina y gramicidina, polimixina, gentamicina, clindamicina, y otros antibióticos tópicos. Véase, por ejemplo, Yoshihito Honda (Editor), *Topical Application of Antibiotics: Recent Advances in Ophthalmology* (1998), y el *Physicians Desk Reference* (1999).

10

Los medicamentos antifúngicos de venta sin receta que pueden ser ingredientes activos adicionales en las composiciones que se describen en el presente documento incluyen: miconazol, nitrato de miconazol, polinoxilina, clotrimazol, sulconazol nitrato, econazol nitrato, tolnaftato, sulfuro de selenio, tioconazol. Los antifúngicos recetados incluyen fármacos tales como alilaminas, azoles, macrólidos polienos, flucitosina, pseudomicinas y griseofulvina. Los antifúngicos ejemplares incluyen Anfotericina B, Fluconazol / Diflucan, Flucitosina, Foscamet, Itraconazol / Sporonex, Ketoconazol / Nitoral y Nistatina 1. Ver también Elewski, *Cutaneous Fungal Infections*, segunda edición (1998) y Segal, *Pathogenic Yeasts and Yeast infections* (1994), que se incorporan como referencia.

15

20

Las composiciones tópicas que se describen en el presente documento contienen compuestos protonados como los descritos, y pueden contener cualquiera de una serie de aditivos que son en sí mismos ingredientes activos, tales como ácido retinoico, ácido glicólico, ácido láctico, ácidos alfa-hidroxi, ácidos ceto hidroxí, ácido cítrico, ácido glucurónico, ácido galacturónico, glucuronolactona, gluconolactona, ácido  $\alpha$  hidroxí-butírico, ácido  $\alpha$  hidroxíisobutírico, ácido málico, ácido pirúvico, ácido  $\beta$  feniláctico, ácido  $\beta$  fenilpirúvico, ácido sacárico, ácido mandélico, ácido tartárico, ácido tartrónico, ácido  $\beta$ -hidroxibutírico, palmitato de vitamina A (palmitato de retinol) y / o acetato de vitamina E (acetato de tocoferol). Cada uno de éstos está preferiblemente presente en una cantidad de aproximadamente un 0.5 % en peso a aproximadamente un 20% en peso. Además, se puede utilizar un material de absorción o de bloqueo de UV, como por ejemplo PABA.

25

30

Las composiciones adicionales en que el compuesto descrito en el presente documento es eficaz incluyen los que se encuentran en la patente n° US 5,652,266, dirigida a la combinación de ácido alfa-hidroxi, retinoides y ácido salicílico; la patente n° US 5,843,998, dirigida a una composición que contiene ácidos alfa hidroxí y peróxido de carbamida, ya sea con o sin ácido salicílico; la patente n° US 5,153,230, que se dirige a una formulación en la que el ingrediente principal activo es el ácido glicólico; 4.464.392, que se dirige a una formulación antimicrobiana que contiene derivados del ácido glicólico; y la patente n° US 4,105,782, que describe numerosos otros agentes activos similares que se pueden utilizar en la composición de la invención.

35

40

Las composiciones que se describen en el presente documento pueden incluir glicol de propileno. El glicol de propileno actúa como un agente tensioactivo y ayuda a la penetración, contacto, y absorción de los ingredientes activos. El glicol de propileno también sirve como conservante. Las composiciones que se describen en el presente documento pueden incluir también un agente tensioactivo no iónico, como por ejemplo polisorbato. Un tensioactivo de este tipo proporciona una mejor superficie de contacto de la composición con la mucosa vaginal al reducir aún más la tensión superficial.

45

Las composiciones que se describen en el presente documento también se pueden usar como un material de soporte para y / o en combinación con otros medicamentos, como por ejemplo agentes espermicidas, agentes anti-virales y agentes anti-fúngicos, ampliando por lo tanto aún más la eficacia médica de las composiciones. La composición que se describe en el presente documento también puede incluir un anestésico tópico como por ejemplo hidrocloreuro de lidocaína y esteroides tópicos, tales como corticosteroides, para proporcionar alivio del dolor o picazón durante el tratamiento.

50

55

#### Uso Cosmético de Compuestos Protonados tal como se describen en el presente documento

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento pueden ser utilizados en productos cosméticos tales como lociones, cremas y soluciones tópicas como un conservante antimicrobiano. Los compuestos protonados retardan y / o previenen el crecimiento de numerosas especies de bacterias en una formulación cosmética, como por ejemplo en una loción, y por lo tanto se pueden usar como un conservante para prevenir y / o retardar el crecimiento de bacterias en la preparación cosmética. Los compuestos protonados se pueden utilizar con esta capacidad con cualquier preparación cosmética conocida, siempre que la composición de la preparación sea de un pH suficientemente bajo para retener la protonación del compuesto, es decir, 7,0 o inferior. Los compuestos protonados están presentes en una cantidad suficiente para tener un efecto antimicrobiano, y

60

65

preferentemente entre un 0.25% en peso y un 10.0% en peso, más preferiblemente entre un 0.5% en peso y un 5.0% en peso.

5 La composición cosmética que se describe en el presente documento también puede contener cualquiera de una serie de aditivos que son ingredientes activos, tales como un ácido glicólico o alfa-hidroxi, palmitato de vitamina A (palmitato de retinol) y / o acetato de vitamina E (acetato de tocoferol). Cada uno de éstos está preferiblemente presente en una cantidad de entre aproximadamente un 0.5% en peso a aproximadamente un 5% en peso. Además, se puede utilizar un material de absorción o bloqueo de UV, como por ejemplo PABA.

10 También pueden añadirse otros compuestos para tener efectos humectantes adicionales y para mejorar la consistencia de la composición. Ejemplos de dichos compuestos incluyen, pero no se limitan a: cera de ésteres cetílicos, alcohol estearílico, alcohol cetílico, glicerina, metil parabeno, propil parabeno, quaternium-15, humectantes, fluidos de metilsiloxano volátiles y polidiorganosiloxano-polioxialquileno. Véase, por ejemplo, las patentes nº 5,153,230 y 4,421,769, ambas se incorporan aquí como referencia. Si se desea que la composición tenga efectos adicionales de limpieza, se pueden añadir productos químicos tales como lauril sulfato de sodio o una sal metálica de un ácido carboxílico.

#### 20 Utilización de Compuestos Protonados en Desinfectantes

Los compuestos protonados que se describen en el presente documento también pueden encontrar una utilización como desinfectantes, y en particular en forma de preparaciones líquidas desinfectantes que tienen propiedades biostáticas o preferiblemente biocidas. La solución desinfectante contiene al menos una cantidad suficiente de compuestos protonados que se describen en el presente documento, y también puede contener otros ingredientes activos con propiedades biostáticas y / o biocidas. Por ejemplo, el desinfectante puede contener compuestos protonados tal como se describen en el presente documento con una concentración adecuada de un compuesto de amonio cuaternario tal como: cloruro de dimetilbenzildodecilamonio, cloruro de decilamonio dimetilbencilo, bromuro de dimetilbencilo decilamonio, y cloruro de dimetilbenziloctilamonio.

30 En otro ejemplo, se pueden utilizar compuestos de biguanidina microbiciada adecuados, tales como sales de biguanida de oligohexametileno y bisbiguanidas. Véase, por ejemplo, la patente nº US 5,030,659, que se incorpora aquí como referencia. Los ingredientes biocidas adicionales incluyen aldehídos, derivados de fenol y derivados de fenilo halógeno. Véase, por ejemplo, la patente nº US 5,767,054, que se incorpora aquí como referencia. Otros compuestos con dicha actividad, como podrán reconocer los expertos en la técnica, también pueden ser utilizados en conjunción con los compuestos protonados que se describen en el presente documento.

40 Además de los componentes activos descritos, las preparaciones desinfectantes que se describen en el presente documento pueden contener otros componentes típicos dependiendo del uso deseado de la formulación. En particular, un acidificante puede ser usado para mantener el intervalo de pH de la solución de desinfección por debajo de 6. Se pueden emplear disolventes adecuados para los compuestos protonados y / o los otros ingredientes activos, y preferiblemente son agua o disolventes orgánicos miscibles en agua. Soluciones como éstas pueden pulverizarse fácilmente usando aire comprimido o cualquier otro propelente conocido por los expertos en la técnica.

50 Estas preparaciones tal como se describen en el presente documento son especialmente adecuadas para la desinfección de superficies en ambientes relacionados con el punto de vista médico, tales como hospitales, clínicas veterinarias, consultorios dentales y médicos y similares. El uso de soluciones de la invención en la esterilización de instrumentos quirúrgicos es especialmente preferente. Estas preparaciones también son útiles en áreas públicas tales como escuelas, transporte público, restaurantes, hoteles y lavanderías. Los desinfectantes también encuentran su uso en casa como desinfectantes para inodoros, lavabos y áreas de cocina.

55 Los compuestos protonados que se describen en el presente documento también pueden ser utilizados en soluciones de desinfección para la piel. Dichas composiciones contienen el compuesto protonado que se describe en el presente documento en una solución que se encuentra en un vehículo adecuado para uso tópico. El desinfectante puede ser de la variedad de secado rápido, en cuyo caso es deseable que los compuestos protonados se encuentren en una base de etanol. Estas soluciones también contienen preferiblemente un emoliente para la piel, ya que el alcohol tiende a reseca extremadamente la piel. Ejemplos de emolientes adecuados incluyen, pero no se limitan a: un alcohol polihídrico como por ejemplo polietilenglicol, glicerina, diglicerina, propilenglicol, butilenglicol, eritritol, dipropilenglicol y sorbitol. La cantidad de emoliente puede estar en el intervalo de 0.1 a 3.0 de concentración porcentual en peso, y más preferiblemente en el intervalo de 0.2 a 1.5 de concentración porcentual en peso. En el caso en que el contenido del emoliente sea menor del 0.1% (en peso) es posible que no sea muy eficaz, y si es superior al 3.0%, la solución puede ser demasiado pegajosa.

5 Las soluciones desinfectantes para la piel son especialmente útiles en la desinfección de las manos después de un tratamiento médico o de gestión de residuos. La desinfección también puede ser útil en entornos quirúrgicos, tanto para el personal médico como para esterilizar el área de la cirugía en el paciente. Por ejemplo, los instrumentos quirúrgicos pueden estar recubiertos con los compuestos protonados tal como se describen en el presente documento para proporcionar un recubrimiento estéril para antes de la cirugía.

#### Aplicación y Suministro de las Composiciones

10 Los compuestos protonados descritos en el presente documento formularse con una variedad de ingredientes activos y una variedad de moléculas de excipientes fisiológicos. Los agentes activos antimicrobianos actualmente descritos pueden opcionalmente formar complejos con moléculas que  
15 aumentan su capacidad para penetrar en las células objetivo. Ejemplos de tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono, poliaminas, aminoácidos, péptidos, lípidos y moléculas vitales para el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, el agente activo puede combinarse con un lípido, lípido catiónico, o  
20 lípido aniónico (que puede ser preferible para los compuestos protonados y / o agentes activos ácidos, por ejemplo, ácido salicílico). La emulsión o suspensión liposomal resultante en conjunción con las cualidades estabilizadoras del pH del compuesto que se describen en el presente documento pueden aumentar de manera efectiva la vida media in vivo de la actividad de la composición. Ejemplos de lípidos aniónicos  
25 adecuados para uso con composiciones que se describen en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cardiolipina, dimiristoil, dipalmitoil, o fosfatidil colina dioleoil o fosfatidil glicerol, fosfatidil colina palmitoiloleoil o fosfatidil glicerol, ácido fosfatídico, ácido lisofosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidil inositol, y formas aniónicas de colesterol. El uso de tensioactivos catiónicos, aniónicos, o composiciones de lípidos y / o liposomas neutros se describe generalmente en las publicaciones internacionales nº WO 90/14074,  
30 WO 91/16024, WO 91/17424 y en la patente nº US 4,897,355, que se incorporan aquí como referencia. Mediante el montaje de los agentes inactivos (por ejemplo, los compuestos de la invención) y / o activos (por ejemplo, antibióticos) en las estructuras asociadas a lípidos, las composiciones que se describen en el presente documento pueden ser dirigidas a tipos específicos de células bacterianas mediante la incorporación de agentes objetivo adecuados (es decir, anticuerpos o receptores específicos) en el complejo lipídico.

35 Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos que se describen en el presente documento en mezcla con un agente activo y un vehículo farmacéutico pueden prepararse de acuerdo con técnicas de composición farmacéutica convencionales.

40 Se pueden preparar aerosoles (por ejemplo, para la administración intranasal o mucosa) disolviendo o suspendiendo los compuestos protonados y un agente activo en un propelente como el alcohol etílico o en fases de propelente y disolvente. Las composiciones farmacéuticas para forma tópica o de aerosol contendrán generalmente desde aproximadamente 0.01% en peso (de los compuestos protonados) hasta aproximadamente 40% en peso, preferiblemente desde aproximadamente un 0.02% a aproximadamente un 10% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente un 0.05% a aproximadamente un 5% en peso dependiendo de la forma particular empleada.

45 Los supositorios se preparan mezclando los compuestos protonados con un excipiente lipídico como por ejemplo aceite de teobroma, manteca de cacao, glicerina, gelatina, o glicoles de polioxietileno.

50 Las composiciones antimicrobianas descritas en el presente documento pueden ser administradas al cuerpo por prácticamente cualquier medio utilizado para administrar antibióticos y antifúngicos convencionales. Una variedad de sistemas de administración tópica son bien conocidos en la técnica para la administración de compuestos bioactivos a las bacterias en un animal. Estos sistemas incluyen, pero no se limitan a, cremas tópicas, soluciones, suspensiones, emulsiones, spray nasal, aerosoles para inhalación, y administración de supositorios. El sistema de administración tópica específico utilizado depende de la localización de las bacterias, y entra dentro de la experiencia de un experto en la técnica el  
55 determinar la ubicación de las bacterias y seleccionar un sistema de administración apropiado.

#### Generación de los compuestos protonados

60 Pueden generarse formas protonadas de los compuestos descritos sometiendo los compuestos purificados, parcialmente purificados, o brutos, a un entorno de pH bajo (por ejemplo, ácido). Los compuestos purificados o brutos se protonaron con ácido, incluyendo ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido clorhídrico, y ácido acético.

65 Las preparaciones de compuestos liofilizados o secados para ser utilizados en experimentos bacterianas se disolvieron en agua Sigma estéril, solución salina fisiológica estéril (es decir, 0.85% de solución salina), libre de pirógenos, y se filtraron a través de un filtro Gelman de 0.45 micrómetros (o un filtro libre de pirógenos de 0.2 micras estéril).

Cuando se suspenden en agua o en solución salina, los compuestos habitualmente muestran un pH de entre 1 y 4.5 dependiendo del nivel de protonación / acidificación, que se determina por la cantidad de ácido que se utiliza en el proceso de acidificación.

5 Otros procedimientos para preparar los compuestos protonados conocidos por el experto en la técnica se contemplan igualmente para entrar dentro del alcance de la invención. Una vez que los compuestos que se describen en el presente documento han sido protonados, pueden ser separados de los componentes no deseados como, por ejemplo, el exceso de ácido. El experto en la técnica conocería muchas maneras de separar los compuestos de los componentes no deseados, incluyendo sin limitación el uso de un intercambiador de cationes H<sup>+</sup> (por ejemplo, H<sup>+</sup> - SCX). Por ejemplo, el compuesto puede ser sometido a cromatografía a continuación de la protonación. En una realización, el compuesto se ejecuta sobre una resina basada en poli(estireno-divinilbenceno) (por ejemplo, PRP-1 o 3 y Polymer Lab de PLRP de Hamilton) después de la protonación.

15 Los compuestos protonados se pueden utilizar directamente o, en una forma de realización preferente, procesarse adicionalmente para eliminar cualquier exceso de ácido y sal, por ejemplo, a través de precipitación, cromatografía de fase inversa, diafiltración o filtración en gel. Los compuestos protonados se pueden concentrar por liofilización, evaporación del disolvente, etc. Cuando se encuentran suspendidos en agua o solución salina, los compuestos acidificados de la invención presentan habitualmente un pH de entre 1 y 4.5 dependiendo del nivel de protonación / acidificación, lo que puede determinarse por la cantidad de ácido que se utiliza en el proceso de acidificación. Alternativamente, los compuestos pueden ser protonados mediante el paso sobre una columna de intercambio catiónico cargada con iones de hidrógeno.

## 25 EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una exposición y descripción completas de cómo hacer y utilizar la invención en cuestión, y no están destinados a limitar el alcance de lo que se considera como la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.), pero deben permitirse algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados centígrados, y la presión es la atmosférica o casi atmosférica.

### 35 EJEMPLO 1 ESTUDIOS DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN UN MODELO DE QUEMADURA

La infección de herida por quemadura en ratones puede ser establecida mediante la administración subcutánea o tópica de las bacterias a los sitios de la quemadura. Con el fin de demostrar la actividad anti-microbiana de los compuestos de la presente invención, se estudió la capacidad de dichos compuestos para prevenir la infección de la quemadura.

Se obtuvieron hembras de ratones BALB/c de seis semanas de edad de la colonia de cría de ratón en DRES, con pares de cría adquiridos en Charles River Canada Ltd. (St. Constant, Quebec, Canadá). El uso de animales descrito en este estudio fue aprobado por el Comité de Cuidado de Animales DRES. El cuidado y la manipulación de los animales descritos en este estudio siguieron las directrices establecidas el Consejo Canadiense de los Animales.

Se cultivó inicialmente *Pseudomonas aeruginosa* (Cepa Utah 4) en caldo de soja de tripticasa, se dividió en alícuotas y se congeló a -70°C. Antes de su uso, las alícuotas se descongelaron y se diluyeron en serie en PBS estéril justo antes de su administración en animales. Para garantizar la viabilidad y la virulencia, las alícuotas de las bacterias fueron periódicamente re-amplificadas en caldo de soja de tripticasa y las colonias fueron determinadas en placas de agar de tripticasa de soja.

55 Se determinaron los valores de LD<sub>50</sub> utilizando el método de Reed y Muench (*Amer. J. Hyg.* (1938) 27: 493-497), y resultaron ser de aproximadamente de 4 x 10<sup>8</sup> y 2 x 10<sup>9</sup> UFC, respectivamente, por las vías subcutánea y tópica de la infección. Para el establecimiento de las dosis letales de las bacterias para la infección sistémica de la herida por quemadura, los grupos de ratones fueron anestesiados con mezcla de ketamina / xilazina (50 mg/kg cada una, administrada por vía intramuscular), a continuación se les afeitó la espalda con una cortadora de pelo, maquinilla de afeitado y crema de afeitado. Para inducir la quemadura en la parte posterior de estos animales, se calentó una barra de latón (10 x 10 x 100 mm) en agua hirviendo durante 15 min. A continuación, el extremo de la barra calentada se aplicó sobre el lomo afeitado de los ratones durante 45 sec. Después de un período de espera de 30 min, se aplicaron 50 µl de inóculo bacteriano (que contenía aprox. 1 x 10<sup>8-11</sup> CFU de bacterias totales) por vía subcutánea en los sitios de la quemadura en la espalda del animal. Se dejó recuperar a los ratones, y se controlaron diariamente los síntomas y las muertes. Tres días más tarde, se afeitó a los ratones y se indujeron las quemaduras tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, el inóculo que contenía el mismo

número de bacterias se aplicó por vía tópica (100 µl) de manera uniforme en los sitios de la quemadura, y a continuación se colocó una "chaqueta de ratón" hecha a medida en el sitio de la infección, durante por lo menos 2 horas. Posteriormente, se controlaron diariamente los síntomas y las muertes de estos ratones. Se encontró que estas dosis letales de la cepa *P. aeruginosa* utilizada cambiaban durante el curso de este estudio, debido a posibles disminuciones en la viabilidad bacteriana y en la virulencia durante el almacenamiento. Como resultado, estos valores fueron re-comprobados y se ajustaron con regularidad. Para todos los estudios de tratamiento, se utilizaron 5 LD<sub>50</sub> de las bacterias. El patrón de supervivencia de los ratones infectados con 5 LD<sub>50</sub> de las bacterias administradas por estas dos vías de infección fue similar. Ambas vías de administración dieron como resultado la muerte eventual de todos los ratones en los grupos de ensayo después del día 3 posterior a la infección. Todos los animales de control no quemados que recibieron dosis equivalentes de bacterias por la administración, ya sea subcutánea o tópica sin la quemadura fueron asintomáticos y se encontró que eran completamente resistentes a la infección. En los ratones que recibieron la quemadura y la infección, el LD<sub>50</sub> de las bacterias administradas por vía tópica fue aproximadamente 5 veces más alto que en la vía subcutánea. A menos que se indique lo contrario, todos los estudios de tratamiento descritos se llevaron a cabo utilizando la vía subcutánea de infección. Esta vía de administración fue elegida para estudios posteriores, ya que no requiere tratamiento previo de los ratones con ciclofosfamida a los 3 días antes de la infección, y dado que causa una infección más sistémica.

A los ratones tratados tal como se describe anteriormente se les proporcionó Nu-2, Nu-3, Nu-4 y Nu-5 mediante administración subcutánea (200 µl de solución de aproximadamente 12 mg/ml), y se comparó su supervivencia con los ratones de control, no tratados. Los resultados de este estudio se muestran en la Tabla 1. Los resultados indican que los compuestos que se describen en el presente documento fueron eficaces en la atenuación de la incidencia de la infección de las heridas por quemaduras.

**Tabla 1**  
**Eficacia de los Compuestos de la Presente Invención en el Tratamiento de la Infección de Heridas por Quemadura**

Compuesto	Nº de animales supervivientes total experimentado	% de supervivencia	Valor p (experimento vs. control)
<b>Nu-2</b>	<b>3/5</b>	<b>60%</b>	<b>0.0184</b>
<b>Nu-3</b>	<b>4/5</b>	<b>80%</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Nu-4</b>	<b>5/5</b>	<b>100%</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Nu-5</b>	<b>4/5</b>	<b>80%</b>	<b>&lt;0.01</b>
<b>Control</b>	<b>1/45</b>	<b>2%</b>	<b>-</b>

**EJEMPLO 2**  
**TRATAMIENTO SUBCUTÁNEO CON UN MONÓMERO PROTONADO**

Para determinar la eficacia de los compuestos protonados en el tratamiento de la infección por herida por quemadura, los ratones fueron infectados por vía subcutánea con 5 LD<sub>50</sub> de *P. aeruginosa* tal como se describe anteriormente. A continuación, los ratones se trataron de la siguiente manera. Para el tratamiento de la infección sistémica (infección por inyección subcutánea de las bacterias), los ratones se trataron a las 2 y 8 horas después de la infección. Tres grupos de ratones fueron tratados con Nu-3 protonado. El grupo 1 recibió una inyección subcutánea de 100 µl 3 mg/ml de monómero protonado; el grupo 2 recibió una inyección subcutánea de 17.5 mg/ml de inyección protonada; y el grupo tres no recibió ningún monómero. Todos (5 de 5) los animales tratados del grupo 1 sobrevivieron, 2/5 animales del grupo 2 sobrevivieron, y ninguno de los animales de control sobrevivió a la infección por quemadura.

La carga bacteriana se determinó utilizando la sangre y los órganos de los animales del experimento. Se extrajo de forma aséptica la sangre, el bazo, el hígado y las pieles quemadas. La sangre (100 µl) se diluyó en serie en PBS estéril y 100 µl de la sangre diluida se colocó en placas para el crecimiento en placas de agar de soja de tripticasa. Para los órganos, se homogeneizaron en 2 (bazos y pieles) o 5 ml (hígados) de PBS estéril usando triturador de tejidos de mano. Los homogeneizados de tejido se diluyeron en serie en PBS estéril, y a continuación se colocaron en placas para el crecimiento en TSA, y las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante toda una noche. A continuación, se determinó el número de UFC.

Los animales que recibieron una dosis de 35 mg / ml no tenían carga bacteriana detectable en el bazo, el hígado o la sangre. Los animales que recibieron la dosis de 17.5 mg / ml tenían una carga bacteriana más baja que la de control, los animales no tratados en un orden de magnitud: 1.6 x 10<sup>4</sup> en comparación con 9 x 10<sup>2</sup> en el bazo y 1.2 x 10<sup>4</sup> en comparación con 1.9 x 10<sup>3</sup> en el hígado (tratados en relación con sin tratar).

Las tasas de supervivencia de los ratones de control y los ratones tratados se compararon mediante la prueba unilateral no paramétrica no apareada de Mann-Whitney. Estas pruebas se realizaron utilizando el



programa de software GraphPad Prism (versión 2.0; Graph PAD Software, Inc., San Diego, CA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en  $p < 0.05$ .

5 Los resultados de este experimento indican que los compuestos tal como se describen en el presente documento eran eficaces para el tratamiento de las infecciones por quemadura.

**EJEMPLO 3  
TRATAMIENTO DE TINEA PEDIS**

10 Un varón de 75 años con diabetes presenta con un caso agudo de tinea pedis. Esta infección había sido tratada con antifúngicos convencionales durante un período de más de un mes con pocos progresos conseguidos en la limpieza de esta infección fúngica. El tratamiento del sitio de la tinea pedis se inició utilizando una solución tópica de Nu-3 a una concentración de 31  $A_{260}$  / ml. El tratamiento de la zona continuó una vez al día durante tres días. Al final del período de tres días, la infección parecía estar  
15 completamente erradicada.

Los resultados de este experimento indican que los compuestos que se describen en el presente documento eran eficaces para el tratamiento de la tinea pedis.

20 **EJEMPLO 4  
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL COMPUESTO Nu-4**

25 La actividad antimicrobiana de los compuestos tal como se describe en el presente documento se demostró adicionalmente mediante la incubación de diversos microorganismos en presencia del Compuesto Nu-4 que se describen en el presente documento. Para dichas incubaciones, se diluyó una solución de caldo de Nu-4 (12.7 mM) con 5 diluciones secuenciales de 2 veces (0.5 ml de sustancia de ensayo en 0.5 ml de caldo de Mueller-Hinto ("MHB") al 10%. A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos se añadieron 150  $\mu$ l de MHB, 30  $\mu$ l de dilución del compuesto, 20  $\mu$ l de 10X bacterias para dar un equivalente de alrededor de  $10^6$  unidades formadoras de colonias ("ufc") / ml. Las  
30 placas se incubaron durante 24 horas a la temperatura adecuada, y a continuación se anotó el crecimiento (NG = sin crecimiento; +, un cierto crecimiento; ++, buena cantidad de crecimiento; +++, crecimiento denso). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2 Actividad Antimicrobiana del Compuesto Nu-4							
Cepa	Crecimiento Microbiano en la Dilución del Compuesto						
	Caldo	1	2	3	4	5	Control
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC#6538	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC#9027	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC#6539	NO	NG	NG	NG	NG	++	+++
<i>Escherichia coli</i> ATCC#6539	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Salmonella typhimurium hisG46</i>	NG	NG	NG	++	+++	+++	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC#9372	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Serratia marcescens</i> ATCC#13880	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC#33592 (resistente a la metilina y la gentamicina)	NG	NO	NG	NO	NG	+++	+++
<i>Candida albicans</i> ATCC#10231	NO	NG	++	+++	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51575 (resistente a la vancomicina de alto nivel)	NO	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (resistente a la vancomicina de bajo nivel)	NO	NO	NG	NO	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> SU (resistente a la metilina)	NG	NG	NG	+++	+++	+++	+++

35 Los resultados de este experimento indican que los compuestos de la presente invención poseen una amplia actividad antimicrobiana.

**EJEMPLO 5****ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL COMPUESTO Nu-5**

5 La actividad antimicrobiana de los compuestos tal como se describe en el presente documento se demostró adicionalmente mediante la incubación de diversos microorganismos en presencia del  
 10 Compuesto Nu-5. Dichas incubaciones se llevaron a cabo tal como se describe en el Ejemplo 4, excepto que se utilizó una solución de caldo de Nu-5 (12.7 mM). Las placas se incubaron durante 24 horas a la temperatura adecuada, y a continuación se anotó el crecimiento (NG = sin crecimiento; +, un cierto crecimiento; ++, buena cantidad de crecimiento; +++, el crecimiento denso). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3 Actividad Antimicrobiana del Compuesto Nu-5							
Cepa	Crecimiento Microbiano en la Dilución del Compuesto						
	Caldo	1	2	3	4	5	Control
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC#6538	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC#9027	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC#6539	NG	NG	NG	NG	NG	+++	+++
<i>Escherichia coli</i> ATCC#6539	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Salmonella typhimurium</i> hlsG46	NG	NG	NG	+++	+++	+++	+++
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC#9372	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Serratia marcescens</i> ATCC#13880	NG	NG	NG	+++	+++	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC#33592 (resistente a la meticilina y la gentamicina)	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Candida albicans</i> ATCC#10231	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51575 (resistente a la vancomicina de alto nivel)	NG	NG	NG	NG	++	+++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (resistente a la vancomicina de bajo nivel)	NG	NG	NG	NG	NG	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i> SU (resistente a la meticilina)	NG	NG	NG	NG	+++	+++	+++

15 Los resultados de este experimento indican también que los compuestos que se describen en el presente documento poseen una amplia actividad antimicrobiana.

**EJEMPLO 6****EXPERIMENTOS MIC CON ORGANISMOS DE 3 HONGOS: ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS Nu-3 Y Nu-5**

20 La actividad antimicrobiana de los compuestos descritos en el presente documento se demostró adicionalmente mediante la incubación de tres organismos de hongos en presencia de los compuestos Nu-3 y Nu-5. Para estas incubaciones, se diluyeron soluciones de caldo de Nu-3 (54 A<sub>260</sub>/ml) y Nu-5 (12.7 mM) con 5 diluciones de 2 veces consecutivas (30 µl de sustancia de ensayo en 30 µl de agua estéril)  
 25 para cada organismo. En cada pocillo de una placa de microtitulación de 24 pocillos se añadieron 30 µl de cada compuesto (las diluciones se prepararon directamente en cada pocillo), 20 µl de 10X células de hongo para dar un equivalente de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias de aproximadamente ("ufc") / ml, y 150 µl de caldo de dextrosa de Sabouraud al 10%. Las placas se incubaron durante 24 horas a 25°C con agitación (200 RPM) con incubación adicional a temperatura ambiente durante 24 horas, y a  
 30 continuación se anotó el crecimiento (NG = sin crecimiento; +, un cierto crecimiento; ++, buena cantidad de crecimiento; +++, el crecimiento denso, ND = no se realiza). Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 4 más abajo, e indican que los compuestos descritos en el presente documento poseen amplia actividad antimicrobiana tanto contra procariotas como contra eucariotas.

35

Tabla 4 Actividad Anti-Hongos de los Compuestos Nu-3 y Nu-5							
Crecimiento Microbiano en la Dilución del Compuesto							
Cepa	Caldo	1	2	3	4	5	Control
Compuesto NU-3							
<i>Candida Albicans</i> ATCC#44374	ND	NO	+	+++	+++	+++	+++
<i>Candida Albicans</i> ATCC##44373	ND	NO	+	+++	+++	+++	+++
<i>Saccharomyces pastorianus</i> ATCC#2366	ND	NG	NG	NG	NG	+	+++
Compuesto NU-5							
<i>Candida Albicans</i> ATCC#44374	ND	NG	+	++	+++	+++	+++
<i>Candida Albicans</i> ATCC#44373	ND	NG	+	+++		+++	+++
<i>Saccharomyces pastorianus</i> ATCC#2366	ND	NG	NG	NG	NG	+7	+++

El alcance de la invención se define a través de las reivindicaciones adjuntas

**Reivindicaciones**

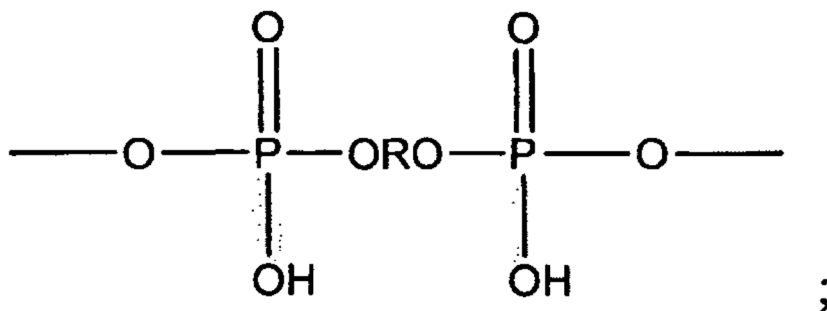
1. Una composición antimicrobiana o de desinfección que comprende:

(a) un compuesto protonado, en que dicho compuesto comprende la estructura:

5

X-Y-Z

en que (1) X y Z son agentes de bloqueo de extremo e Y tiene una estructura que comprende:



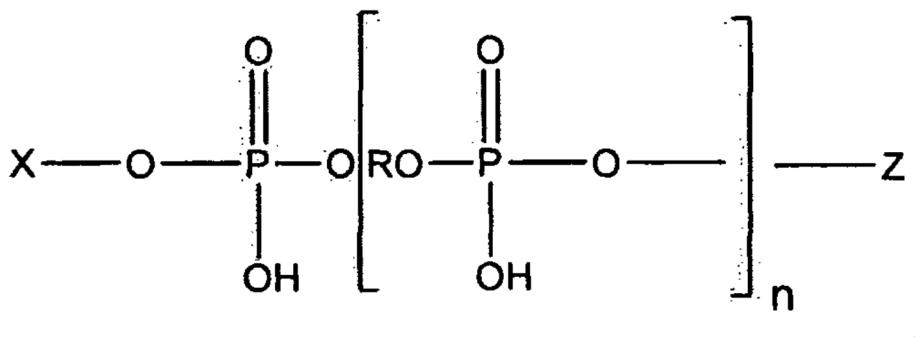
10

en que R comprende un grupo alquilo, arilo, alquenilo, alquilarilo, alquilalquenilo, arilalquenilo o alquilarilalquenilo difuncional de entre 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono o

15

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, en que X y Z comprenden un grupo alquilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono; en que el compuesto comprende uno o más protones exógenos introducidos en sitios reactivos en dicha molécula; o

(2) X y Z son agentes de bloqueo de extremo e Y tiene una estructura que comprende:



20

en que X y Z comprenden independientemente un grupo alquilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono y n es un número entero de 1 a 20 y cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en: un grupo alquilo, un grupo arilo, un alquenilo, un alcohol, un fenol, un enol, y

25

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, en que el compuesto comprende uno o más protones exógenos introducidos en sitios reactivos en dicha molécula; y

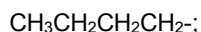
(b) un excipiente.

30

2. La composición de la reivindicación 1, en que X y Z comprenden un grupo de alcohol.

3. La composición de la reivindicación 1, en que X y Z son iguales o son diferentes.

4. La composición de la reivindicación 1, en que X o Z comprenden una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-;  
 y  
 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-;

5 5. La composición de la reivindicación 1, en que

(1) R comprende una estructura seleccionada de entre el grupo que consiste en:

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-;

10 y

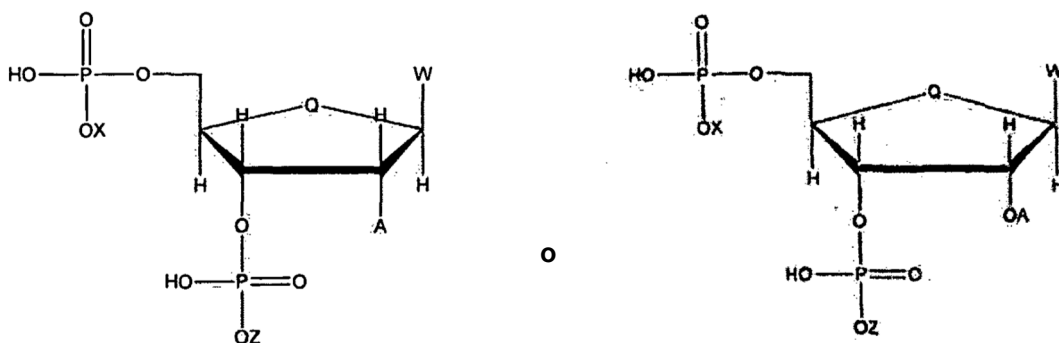
-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-; o

(2) R comprende: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

15 6. La composición de la reivindicación 1, en que el excipiente comprende uno o más compuesto(s) seleccionado del grupo que consiste en: emolientes, lubricantes, agentes emulsionantes, agentes espesantes, y humectantes.

7. Una composición antimicrobiana o de desinfección que comprende,

(a) un compuesto protonado que comprende la estructura:



20

en que:

25

X y Z son grupos de extremo que pueden ser iguales o diferentes y comprenden un grupo alquilo de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono o un grupo de alcohol:

Q es O,

A es H alquilo, alquilo-(O-alquilo), arilo, alqueno, alcohol, fenol, o enol; y

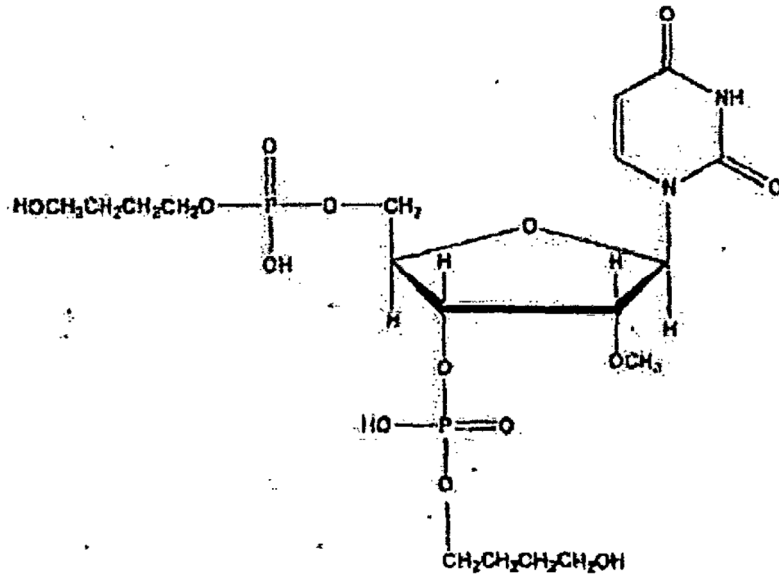
30

W se selecciona del grupo que consiste en H, una purina, una pirimidina, un análogo modificado de una purina o pirimidina, una piridina, pirazina, triazinc, 2-aminoadenosina, teobromina, cafeína, teofilina, ácido úrico, indol, acridina, indazol, fenoxazina, fenazina, fenotiazina, quinolina, isoquinolina, quinazolina, pteridina, caprolactama, y un heterocíclico que contiene nitrógeno;

35

en que el compuesto comprende uno o más protones exógenos introducidos en el / los sitio(s) del / de los reactivo(s) en dicha molécula;

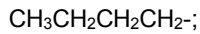
o



5 en que el compuesto comprende uno o más protones exógenos introducidos en el / los sitio(s) del / de los reactivo(s) en dicha molécula; y  
 (b) un excipiente.

8. La composición de la reivindicación 7, en que X y Z son grupos de bloqueo de extremo que pueden ser iguales o diferentes y comprenden un grupo de alcohol.

10 9. La composición de la reivindicación 7, en que X o Z comprende una estructura seleccionada del grupo que consiste en:



15 y CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-;  
 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-.

10. La composición de la reivindicación 7, en que W es un H.

11. La composición de la reivindicación 7, en que A comprende una estructura seleccionada de entre el grupo que consiste en:

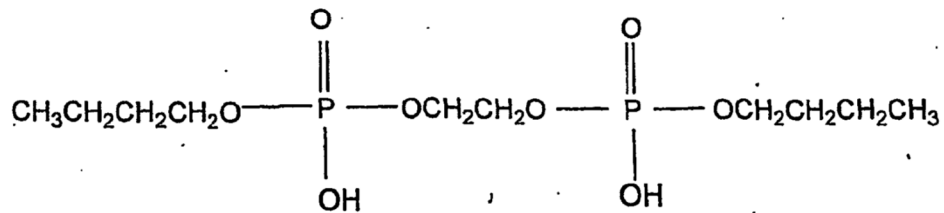
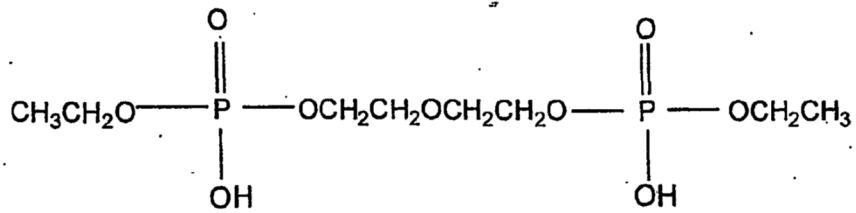
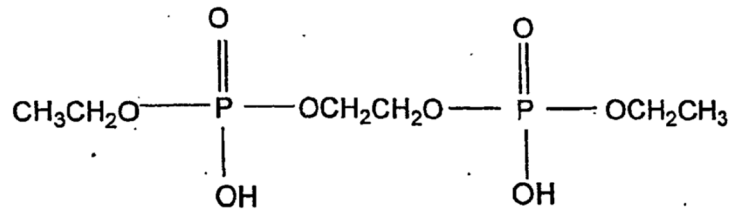
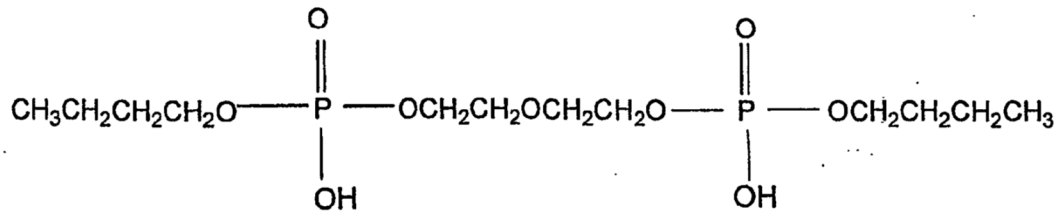
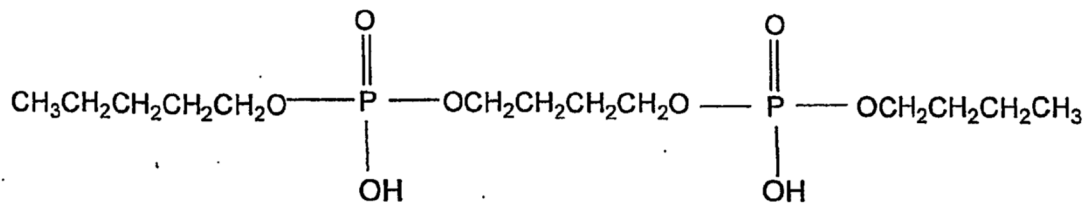
20 -CH<sub>3</sub>;

-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>;

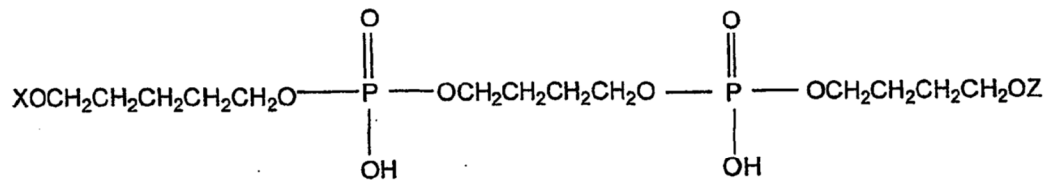
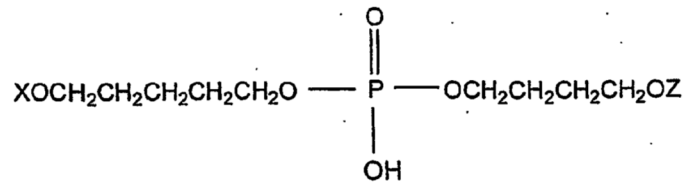
y -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

25 12. La composición de la reivindicación 1 o 7, que comprende además una sal metálica de un ácido carboxílico.

13. La composición de la reivindicación 1 o 7 para el tratamiento de una infección microbiana.

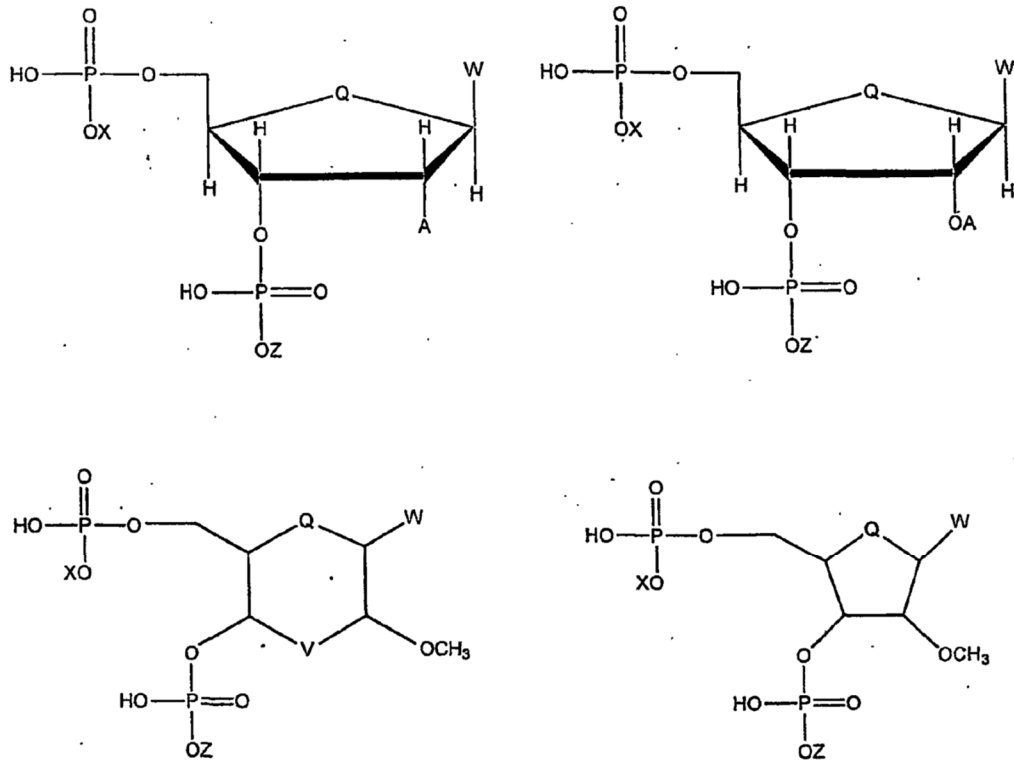


**Figura 1**

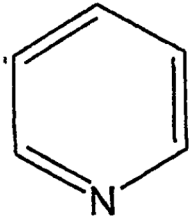


**Figura 2**

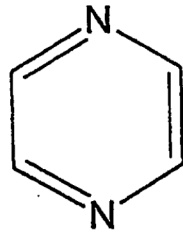




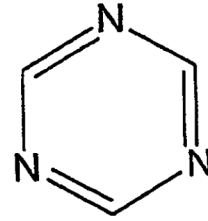
**Figura 3**



piridina

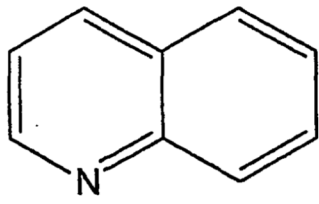


pirazina

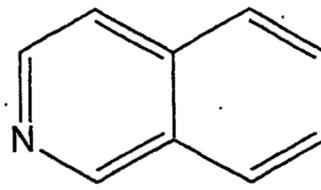


triazina

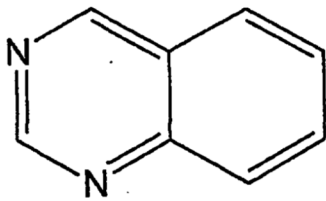
**Figura 4**



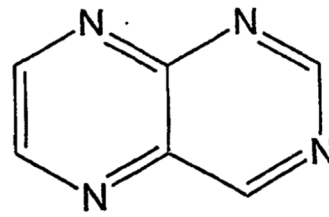
quinolina



isoquinolina

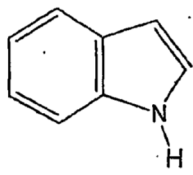


quinazolina

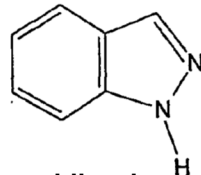


pteridina

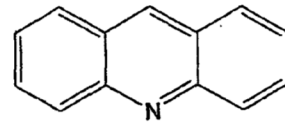
**Figura 5**



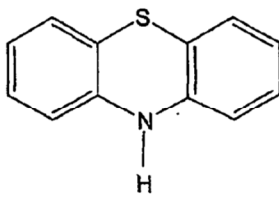
**indol**



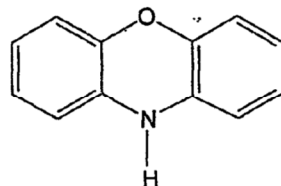
**idiazol**



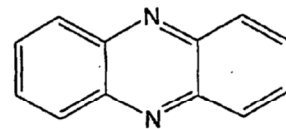
**acridina**



**fenotiazina**

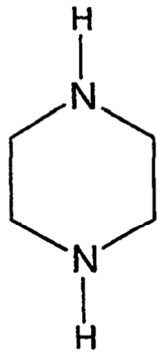


**fenoxazina**

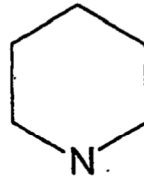


**fenazina**

**Figura 6**

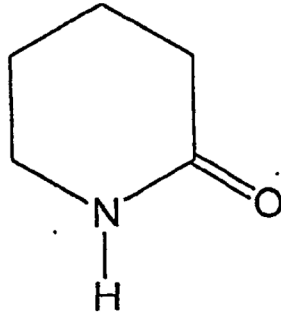


**piperazina**  
**pirazina hidrogenada**



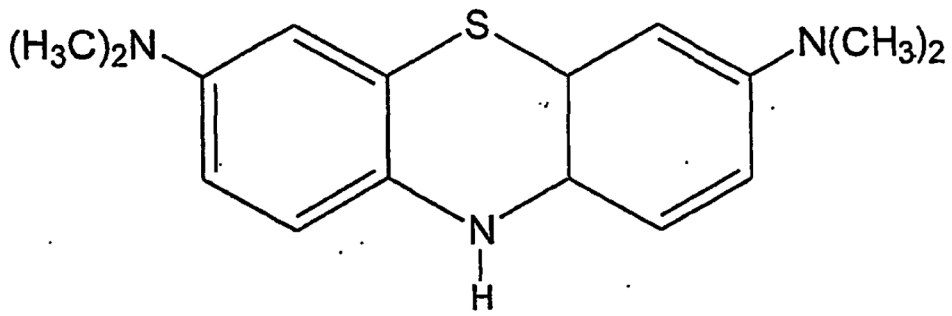
**piperidina**  
**(piridina hidrogenada)**

**Figura 7**



caprolactam

### Figura 8



azul de leucometileno

### Figura 9