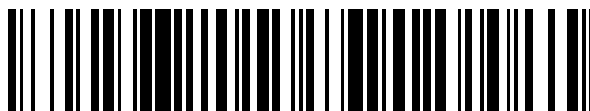


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 361**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2000** **E 00957347 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 1200463**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas de histona H1 y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

11.08.1999 US 372500

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

03.02.2016

73 Titular/es:

**SYMBIOTEC GMBH (50.0%)
IM STADTWALD 6
66123 SAARBRUCKEN, DE y
PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION
CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CLASS, REINER y
ZEPPEZAUER, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 558 361 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

Composiciones antimicrobianas de histona H1 y métodos de uso de las mismas

Campo de la invención

El campo de la invención es composiciones de antibióticos y métodos de uso de las mismas.

5 Antecedentes de la invención

10 Numerosas composiciones de antibióticos son conocidas, algunas que presentan actividad antibiótica contra un espectro amplio de microorganismos, y otras que presentan actividad antibiótica solo contra una o unas pocas clases estrechas de organismos, tales como bacterias gram-positivas. Un inconveniente asociado a todos los antibióticos conocidos es que los microorganismos, especialmente bacterias, pueden llegar a ser resistentes a un antibiótico al que previamente eran susceptibles bajo ciertas condiciones. Los patógenos humanos están entre los microorganismos que son capaces de desarrollar la resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, a pesar de que ciertos antibióticos son altamente eficaces contra una amplia gama de microorganismos, es necesario desarrollar continuamente nuevas composiciones de antibióticos con el fin de permanecer por delante del desarrollo de microorganismos resistentes a los antibióticos o para desarrollar antibióticos que sean, debido a sus características intrínsecas de acción antimicrobiana, menos probables para generar cepas resistentes. Además, la continua identificación de nuevos antibióticos reducirá la probabilidad de que surja una cepa de microorganismo que sea resistente a la mayoría o todos los antibióticos conocidos.

20 La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema creciente de proporciones potencialmente pandémicos, tanto en Estados Unidos como en el extranjero. En una revisión, más del 31% de los 17,000 aislados bacterianos de *Streptococcus pneumoniae* obtenidos de pacientes fueron identificados como resistentes a la penicilina. Por otra parte, en 1997, se reportaron tres casos resistentes a la vancomicina intratables en Camden, Nueva Jersey. (Murray, 1977, Am. J. Med. 102:284-293).

25 La necesidad de productos antimicrobianos se ha incrementado en los últimos años, debido a la aparición de infecciones bacterianas resistentes a múltiples fármacos. Los centros para el control y la prevención de enfermedades en los Estados Unidos estiman que los antibióticos son una de las clases más ampliamente utilizadas de los fármacos, tanto en los Estados Unidos como en todo el mundo. Los esfuerzos de investigación extensos están en marcha para identificar posibles compuestos candidatos a los antibióticos. La presente invención satisface la necesidad continua de nuevas composiciones de antibióticos.

Breve resumen de la invención

30 La presente invención se refiere a la proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso en el tratamiento de una infección en un humano o animal con una bacteria seleccionada entre: *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus megaterium*; *Bacillus cereus*; y *Serratia marcescens*, bacteria que presenta resistencia contra conocidos antibióticos tales como penicilina, estreptomycin, eritromicina y vancomicina, en donde la proteína histona H1 eucariota purificada causa: (i) muerte de la bacteria; o (ii) inhibición del crecimiento de la bacteria. La divulgación se refiere a un método para inducir la muerte de un microorganismo. El método comprende poner en contacto el microorganismo con una composición que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. Por lo tanto, se induce la muerte del microorganismo. El microorganismo es una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, una especie *Shigella*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Staphylococcus albus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, y *Bacillus megaterium*. En otra realización, la proteína histona H1 eucariota se modifica químicamente, tal como una proteína histona H1 eucariota derivada del polietilenglicol.

La divulgación también se refiere a un método para inhibir el crecimiento de un microorganismo. Este método comprende poner en contacto el microorganismo con una composición que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada.

45 La divulgación además se refiere a una composición farmacéutica antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada y un

El apósito para heridas se puede seleccionar del grupo que consiste en una crema, un gel, un material absorbente, y un material degradable fisiológicamente. En una realización, la composición comprende además un antibiótico suplementario, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en histonas H2A, H2B, H3, H4, y H5, penicilina, estreptomycin, vancomicina, bacitracina, polimixina, neomicina, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, tobramicina, eritromicina, gentamicina, gramicidina, oxitetraciclina, norfloxacina, una sal de un antibiótico, y un éster de un antibiótico.

- La divulgación además se refiere a un kit que comprende la composición de la invención y un material instructivo seleccionado del grupo que consiste en un material instructivo que describe el uso de la composición antimicrobiana para matar un microorganismo y un material instructivo que describe el uso de la composición antimicrobiana para detener el crecimiento de un microorganismo. La composición, por ejemplo, puede ser en una forma de dosificación unitaria. En una realización, el kit comprende además un antídoto de la histona H1 tal como la heparina.
- La invención también se refiere a un método para tratar una infección microbiana en un animal. Este método comprende la administración de una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada al animal. El animal puede ser un mamífero tal como un humano. Adicionalmente, la composición, por ejemplo, puede ser administrada al animal mediante una ruta seleccionada del grupo que consiste en una vía oral, una vía intraperitoneal, una vía intravenosa, y una vía tópica.
- La divulgación además se refiere a un método para inhibir el crecimiento microbiano en un sitio. Este método comprende proporcionar una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota en el sitio. La composición se puede proporcionar en el sitio incorporando la composición en el sitio, por ejemplo. En diversas realizaciones, el sitio se localiza en o dentro de un producto alimenticio o sobre o dentro de un tejido de animal. En otras realizaciones, la composición se provee a un tejido de animal durante un procedimiento quirúrgico o a un sitio proporcionando la composición a una superficie que se pone en contacto con el sitio. La superficie, por ejemplo, se puede seleccionar del grupo que consiste en una superficie de una herida de un animal y una superficie de un implemento quirúrgico. En otra realización, el sitio es una porción interna de un animal y en donde la composición se provee en el sitio, proporcionando un implante biodegradable que comprende la composición en el sitio.
- La divulgación además se refiere a un pienso para animales suplementado que comprende un pienso para animales suplementado con una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada.
- Además, la divulgación se refiere a un método para mejorar el crecimiento de un animal no humano. Este método que comprende alimentar al animal el pienso para animales suplementado de la invención. El animal no humano, por ejemplo, puede ser un animal de granja.
- La divulgación también se refiere a un método de preparación de una vacuna para animal. Este método comprende la adición de una proteína histona H1 eucariota a una preparación de un microorganismo. De este modo, muere el microorganismo, y la preparación del microorganismo muerto comprende la vacuna.
- La divulgación además se refiere a un método de vacunación de un animal, el método que comprende la administración al animal de la vacuna de la invención.
- La divulgación además se refiere a otro método de vacunación de un animal. Este método que comprende la administración al animal de una composición que comprende una forma atenuada o muerta de un microorganismo y una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada.
- Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 es un gráfico que indica la dependencia de la concentración de la actividad antibiótica mostrada por la histona H1 con respecto a la cepa de *E. coli* AB1157.
- La figura 2 es un gráfico que indica la dependencia del tiempo de exposición de la actividad antibiótica mostrada por la histona H1 con respecto a la cepa de *E. coli* AB1157.
- La figura 3 es un gráfico de barras que compara la actividad antibiótica mostrada por la histona H1 de la cepa de *E. coli* AB 1157 sensible a la penicilina con la actividad antibiótica con respecto a una cepa de *E. coli* resistente a penicilina derivada de la cepa AB 1157 como se describe en este documento en el Ejemplo 6 a varias concentraciones en la histona H1. La supervivencia de células de *E. coli* sensibles a la penicilina se indica mediante las barras que tienen rayas menos densas. La supervivencia de células de *E. coli* resistentes a la penicilina se indica mediante las barras rayadas más fuertemente.
- La figura 4 es un gráfico que indica la dependencia de la actividad antibiótica mostrada por la histona H1 con respecto a la cepa de *E. coli* AB 1157 de la concentración de heparina en el medio de contacto células-histona.
- La figura 5 es un gráfico que compara la actividad antibiótica mostrada por una preparación de la histona H1 con respecto a la cepa de *E. coli* AB 1157 y la actividad antibiótica mostrada por una preparación análoga de la histona H1 que había sido puesta en contacto previo con células de *E. coli*. La preparación de la histona H1 no-pre-absorbida se representa en el gráfico por una línea marcada con puntos circulares. La histona H1 de contacto previo, se representa en el gráfico por una línea marcada con puntos cuadrados.

La figura 6 es un gráfico que indica que las células de *E. coli* pueden desarrollar resistencia a la actividad antibiótica de la histona H1 a una concentración de 1.9 μ M. Los cuadrados abiertos representan *E.coli* progenitor 1157 en el día 0; círculos rellenos representan el cultivo resistente en el día 1; círculos abiertos representan el cultivo resistente en el día 2; cuadrados rellenos representan el cultivo resistente en el día 3.

- 5 La figura 7 es un gráfico que indica que la interrupción de la integridad de la membrana es responsable de los efectos bactericidas de la histona H1. El gráfico compara el porcentaje de células de la membrana dañada con los tiempos de incubación de varias concentraciones de histona H1. Puntos circulares rellenos marcan una línea que representa histona H1 1.9 μ M, puntos triangulares blancos marcan una línea que representa histona H1 0.4 μ M y puntos cuadrados llenos marcan una línea que representa histona H1 0.95 μ M.
- 10 La figura 8 es un gráfico que compara la actividad antibiótica mostrada por la histona H1, la lisozima, y una preparación de la histona H1 coincubada con lisozima. La preparación de antibióticos de la lisozima solamente está representada por la barra con el punteado. La preparación de histona 0.48 μ M se indica mediante las barras sin relleno. La preparación de histona H1 0.48 μ M con lisozima está indicada por las barras rayadas.

- 15 La figura 9 es un gráfico que indica la dependencia del tiempo de exposición de las diversas actividades antibióticas mostradas por la histona H1 con respecto a diversas cepas de *E. coli* derivadas de infecciones del tracto urinario.

Descripción detallada

- 20 La invención se basa en el descubrimiento de que la proteína histona H1 eucariota presenta actividad antibiótica. Por lo tanto, la invención se refiere a composiciones de antibióticos que comprenden una proteína histona H1 eucariota. La invención también se refiere a métodos para matar un microorganismo y prevenir o reducir el crecimiento de un microorganismo, los métodos que comprenden poner en contacto el microorganismo con una proteína histona H1 eucariota.

Como se utiliza en este documento, un "antibiótico" es una sustancia química que presenta actividad antibiótica.

Como se utiliza en este documento, una sustancia química presenta "actividad antibiótica" si la sustancia conduce lease a la muerte de o inhibe o previene el crecimiento de un microorganismo con el que se pone en contacto.

- 25 Como se utiliza en este documento, una sustancia química "inhibe el crecimiento de un microorganismo" si la sustancia disminuye la velocidad de aumento del número de células o el tamaño del microorganismo, disminuye la velocidad de proliferación del microorganismo, o previene el crecimiento del microorganismo.

- 30 Como se utiliza en este documento, un "microorganismo" significa un organismo de dimensiones microscópicas, incluyendo tanto organismos unicelulares como multicelulares. En términos generales, los microorganismos no son mayores de aproximadamente 250 micrómetros a lo largo de su dimensión más larga, siendo entendido que existen algunos microorganismos en los complejos multicelulares extendidos que tienen dimensiones significativamente más grandes. Los complejos multicelulares de microorganismos no comprenden los tejidos que tienen tipos de células especializadas, y por lo tanto tales complejos se pueden diferenciar a partir de organismos de tamaño similar que no son microorganismos y que comprenden los tejidos que tienen tipos de células especializadas. Por lo tanto, los
- 35 microorganismos incluyen, pero no se limitan a, protozoos, algas, hongos, mohos, bacterias y arqueas.

- 40 Las concentraciones tóxicas de histona H1 eucariota dependen del tipo de célula que está siendo tratada. La concentración tóxica de la histona H1 para la mayoría de las células eucariotas no cancerosas es más de aproximadamente 200 o 250 microgramos por mililitro. La concentración tóxica de la histona H1 para las células tumorales eucariotas es de aproximadamente 150 a 200 microgramos por mililitro. La concentración tóxica de la histona H1 para las células bacterianas es menor de aproximadamente 80 microgramos por mililitro.

Como se utiliza en este documento, un agente "bactericida" es una sustancia química que conduce a la muerte de una bacteria con la que se pone en contacto.

Como se utiliza en este documento, un agente "bacteriostático" es una sustancia química que inhibe el crecimiento de una bacteria con la que se pone en contacto.

- 45 Como se utiliza en este documento, un microorganismo presenta "resistencia a los antibióticos" si una sustancia química que presenta actividad antibiótica con respecto a una de origen natural del microorganismo es ineficaz contra el microorganismo.

Composiciones que comprenden histona H1 eucariota

- 50 La histona H1 es una proteína que tiene un tamaño y una secuencia de aminoácidos que está altamente conservada entre organismos eucarióticos. Varios organismos eucarióticos, incluyendo los seres humanos, por ejemplo,

comprenden una pluralidad de subtipos de la histona H1 que comparten un alto grado de homología. La histona H1 comprende aproximadamente 210 aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 21 kilodalton, dependiendo de las especies y subtipo. La secuencia de aminoácidos y otra información física y química para la histona H1 se han descrito (Isenberg, 1979, Annu. Rev. Biochem. 48:159-191).

5 La presente divulgación también proporciona los análogos de la histona H1. Los análogos pueden diferir de proteínas o péptidos de origen natural por diferencias conservadoras en la secuencia de aminoácidos o por modificaciones que no afectan a la secuencia, o por ambas.

10 Por ejemplo, se pueden hacer cambios conservadores de aminoácidos, que a pesar de que alteran la secuencia primaria de la proteína o péptido, normalmente no altera su función. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen por lo general sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; fenilalanina, tirosina.

15 Las modificaciones que normalmente no alteran la secuencia primaria incluyen derivación química in vivo, o in vitro de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glicosilación, por ejemplo, las realizadas por modificación de los patrones de glicosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan la glicosilación, por ejemplo, glicosilación de mamífero o desglucosilación de enzimas. También se abarcan las secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, o fosfotreonina.

20 También se incluyen los polipéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular normales con el fin de mejorar su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más apropiados como un agente terapéutico. Los análogos de tales polipéptidos incluyen los que contienen residuos distintos de los L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos de origen no natural. Los péptidos de la invención no se limitan a productos de cualquiera de los procesos ejemplares específicos enumerados en este documento.

25 H1 es una proteína nativa en los seres humanos y otros eucariotas. Se sabe que la histona H1 está asociada con la superestructura de ADN. La mayoría de los antibióticos que se utilizan actualmente en los seres humanos y los animales son o se derivan de sustancias producidas por hongos, y por lo tanto son sustancias extrañas con respecto a los seres humanos. Algunas de las ventajas del uso de la histona H1, respecto a otros antibióticos, incluyen el hecho de que la histona H1 es compatible con los tejidos, en que la histona H1 presenta inmunogenicidad extremadamente baja. Sin estar limitado por ninguna teoría particular, se cree que la histona H1 presenta baja inmunogenicidad debido a que la histona H1 es reconocido como una proteína "auto" por el sistema inmunológico de los seres humanos y animales. Adicionalmente, el alto grado de identidad de secuencia y la relación entre las proteínas histona H1 de diversos eucariotas aumenta la probabilidad de que una proteína histona H1 obtenida a partir de un animal será reconocida como una proteína "auto" cuando se administra a otro animal.

35 Cuando se utiliza el término "histona H1" en la presente divulgación, el término abarca cualquier subtipo de proteína histona H1 expresada en cualquier eucariota. Preferiblemente, la histona H1 es la histona H1 humana, subtipo cero, en este documento denominada "histona H1". Las composiciones, kits, y métodos de la invención, no obstante, abarcan el uso de cualquier histona H1 eucariota.

40 La histona H1 se puede extraer de muchos tejidos de eucariotas multicelulares, y se puede aislar a una pureza mayor que el 99% en peso, utilizando procedimientos bioquímicos estándar tales como cromatografía de afinidad/exclusión y/o HPLC, como se ha descrito (véase, por ejemplo, Pehrson et al., 1981, Biochemistry 20:2298-2301). La histona H1 se puede preparar a partir de timo de ternera, por ejemplo, por extracción, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,182,257. La histona H1 también se puede expresar utilizando un sistema de expresión recombinante, tal como un sistema de expresión que utiliza *E. coli* o una levadura (Linder et al., 1994, Mol. Cell. Biol. 4:2822-2835; Gerchman et al., 1994, Prot. Express. Purif. 5:242-251). La proteína histona H1 utilizada en las composiciones, kits y métodos de la invención está preferiblemente en la forma de proteína histona H1 sustancialmente purificada. Como se utiliza en este documento, una proteína histona H1 "sustancialmente purificada" es una que se ha separado de los componentes que la acompañan de forma natural. Por lo general, la histona H1 es sustancialmente pura cuando al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 70% a 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente al menos 99% del material total (según la evaluación, ya sea en peso seco o húmedo, o por la fracción molar) en una muestra es la histona H1. La pureza se puede medir por cualquier método apropiado tal como, en el caso de polipéptidos, por cromatografía en columna, electroforesis en gel, o análisis por HPLC. Preferiblemente, la proteína histona H1 sustancialmente purificada se separa a partir de más del 90% en peso, y más preferiblemente más del 99% en peso, de las proteínas que normalmente la acompañan en una célula.

55 La presente divulgación incluye el descubrimiento de que la histona H1 presenta actividad antibiótica potente con respecto a numerosas cepas bacterianas, incluyendo, pero no limitando a, las cepas que son patógenos en humanos y cepas que presentan resistencia a los antibióticos conocidos, tales como penicilina, estreptomicina, eritromicina y vancomicina. Incluso las preparaciones relativamente impuras (i.e., 70 a 80% en peso de histona H1) de esta proteína presentan el efecto antibiótico. Los experimentos descritos en este documento se realizaron utilizando histona H1

altamente purificada (pureza > 99% en peso, según lo confirmado por HPLC) o histona H1 recombinante altamente purificada expresada en *E. coli*). Un experto en la técnica apreciará que el efecto antibiótico descrito en este documento se atribuye a la histona H1.

5 La proteína histona H1 eucariota útil en las composiciones, kits y métodos de la divulgación puede ser una histona H1 modificada químicamente. La histona H1 también se puede modificar para aumentar el tiempo de vida media en suero o para reducir el potencial de antigenicidad. A modo de ejemplo, la proteína puede ser una proteína histona H1 eucariota derivada del polietilenglicol. A modo de ejemplo, la histona H1 puede formar covalentemente un complejo con el polietilenglicol utilizando métodos conocidos. Estos métodos se denominan coloquialmente en la técnica como "PEGilación". Además, se pueden retirar hasta unos veinte residuos de aminoácidos de cualquiera o ambos de los extremos terminal amino- o carboxi- de la proteína histona H1 sin afectar significativamente la actividad antibiótica mostrada por la proteína. Las modificaciones de este tipo han sido descritas en la técnica (por ejemplo, Isenberg et al., supra).

15 Como se utiliza en este documento, una proteína histona H1 "modificada químicamente" es una que ha sido tratada de manera que comprende al menos un sustituyente químico que reduce la antigenicidad o inmunogenicidad de la proteína cuando se administra al flujo sanguíneo de un paciente humano, con relación a la forma de origen natural de la proteína. Un ejemplo de un tratamiento de reducción de la antigenicidad de una proteína histona H1 es la unión covalente del polietilenglicol a la proteína histona H1.

20 Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la histona H1 están disponibles al público, y se pueden utilizar para monitorear la concentración de la histona H1 en el suero y otros tejidos o fluidos. Tales anticuerpos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Biogenex, San Ramon, CA.

25 La divulgación también incluye una composición farmacéutica antimicrobiana, como se describe en este documento, que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición es preferiblemente una que sea apropiada para inyección o infusión en un tejido animal, tal como sangre o una que se apropiada para aplicación tópica a un animal, como con una composición en forma de un apósito para heridas. Tal apósito para heridas puede, por ejemplo, ser seleccionado del grupo que consiste en una crema, un gel, un material absorbente, y un material fisiológicamente degradable.

30 La actividad antibacteriana se ha descrito para las histonas ricas en arginina, pero se informó que las histonas ricas en lisina, como la histona H1, no presentan actividad antibiótica (Hirsch, 1958, J. Exp. Med. 108:925-944). La composición farmacéutica antimicrobiana de la invención puede comprender además un antibiótico suplementario, tal como uno seleccionado del grupo que consiste en las histonas H2A de, H2B, H3, H4, y H5. Alternativamente, la composición farmacéutica antimicrobiana de la invención puede comprender además un antibiótico suplementario tal como uno seleccionado del grupo que consiste de bacitracina, polimixina, neomicina, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, penicilina, estreptomycin, vancomicina, tobramicina, eritromicina, gentamicina, gramicidina, oxitetraciclina, norfloxacina, y sales y ésteres de estos antibióticos.

35 La invención abarca la preparación y uso de composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína histona H1 eucariota como un ingrediente activo. Dicha composición farmacéutica puede consistir en la proteína histona H1 sola, en una forma apropiada para la administración a un sujeto. Alternativamente, la composición farmacéutica puede comprender la proteína histona H1 y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, uno o más ingredientes adicionales, o alguna combinación de estos. La administración de una de estas composiciones farmacéuticas a un sujeto es útil para matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo en el sujeto, como se describe en otra parte de la presente divulgación. La proteína histona H1 puede estar presente en la composición farmacéutica en forma de un éster o sal fisiológicamente aceptable, tal como en combinación con un catión o anión fisiológicamente aceptable, como es bien conocido en la técnica.

45 La divulgación abarca además el uso de un vector de ácido nucleico que comprende una histona H1 que codifica el ácido nucleico. El vector de ácido nucleico también puede comprender los conocidos promotor, represor, operador, u otras secuencias reguladoras mediante las cuales la expresión de la histona H1 se puede controlar en la entrega del vector de ácido nucleico a un paciente. La invención también abarca células que comprenden un vector del ácido nucleico que codifica la histona H1 y que expresa la histona H1 a partir de ese vector.

50 Como se utiliza en este documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" significa una composición química con la que la proteína histona H1 se puede combinar y que, tras la combinación, se puede utilizar para administrar la proteína histona H1 a un sujeto.

Como se utiliza en este documento, el término éster o sal "fisiológicamente aceptable" significa una forma de sal éster o de la proteína histona H1 que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica y que no es perjudicial para el sujeto al cual la composición se va a administrar.

55 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se pueden preparar por cualquier método conocido o desarrollado más adelante en el arte de la farmacología. En general, dichos métodos de preparación

incluyen la etapa de poner la proteína histona H1 en asociación con un portador o uno o más de otros ingredientes accesorios y, a continuación, si es necesario o deseable, dar forma o envasar el producto en una unidad deseada única o multi-dosis.

5 Aunque las descripciones de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en este documento están dirigidas principalmente a composiciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración ética a los seres humanos, se entenderá por el experto en el arte que tales composiciones son generalmente apropiadas para la administración a animales de todo tipo. La modificación de composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración a seres humanos con el fin de hacer que las composiciones apropiadas para la administración a diversos animales se entienden bien, y el farmacólogo veterinario normalmente experto puede diseñar y realizar tal modificación con, si existe, una experimentación usual simplemente. Los sujetos para los que la administración de las composiciones farmacéuticas de la invención se contempla incluyen, pero no se limitan a, seres humanos y otros primates, mamíferos incluyendo mamíferos comercialmente pertinentes, tales como ganado vacuno, cerdos, caballos, ovejas, gatos y perros, aves, incluyendo aves comercialmente relevantes como gallinas, patos, gansos y pavos, peces incluyendo peces de criadero y peces de acuario y crustáceos tales como los mariscos criados en granjas.

15 Las composiciones farmacéuticas que son útiles en los métodos de la invención se pueden preparar, envasar o comercializar en formulaciones apropiadas para administración oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica u otra vía de administración. Otras formulaciones contempladas incluyen nanopartículas proyectadas, preparaciones de liposomas, eritrocitos cerrados nuevamente que contienen la proteína histona H1 y formulaciones basadas inmunológicamente.

20 Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar a granel, como una unidad de dosis única, o como una pluralidad de dosis unitarias individuales. Como se utiliza en este documento, una "dosis unitaria" es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada de la proteína histona H1. La cantidad de la proteína histona H1 es generalmente igual a la dosificación de la proteína histona H1 que se administra a un sujeto o una fracción conveniente de tal dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosificación.

25 Las cantidades relativas de la proteína histona H1, el portador farmacéuticamente aceptable, y cualesquiera ingredientes adicionales en una composición farmacéutica de la invención variarán, dependiendo de la identidad, tamaño y condición del sujeto tratado y dependiendo además de la vía por la cual la composición se va a administrar. A modo de ejemplo, la composición puede comprender entre 0.1% y 100% (peso/peso) de proteína histona H1. Una dosis unitaria de una composición farmacéutica de la invención se comprenderá generalmente de aproximadamente 0.1 miligramos a aproximadamente 100 miligramos de la proteína histona H1, y comprende preferiblemente de aproximadamente 1 miligramo a aproximadamente 10 miligramos de la proteína histona H1.

30 Además de la proteína histona H1, una composición farmacéutica de la divulgación puede comprender además uno o más agentes adicionales farmacéuticamente activos. Agentes adicionales particularmente contemplados incluyen antibióticos distintos de histona H1. Tales antibióticos incluyen, pero no se limitan a, las histonas H2A, H2B, H3, H4, y H5, bacitracina, polimixina, neomicina, cloranfenicol, clortetraciclina, ciprofloxacina, penicilina, estreptomicina, vancomicina, tobramicina, eritromicina, gentamicina, gramicidina, oxitetraciclina, norfloxacina, y sales y ésteres de estos antibióticos.

35 Las formulaciones de liberación controlada o sostenida de una composición farmacéutica de la invención se pueden preparar utilizando tecnología convencional.

40 Una formulación de una composición farmacéutica de la divulgación apropiada para la administración oral se puede preparar, envasar o comercializar en la forma de una unidad de dosis sólida discreta incluyendo, pero no limitando a, un comprimido, una cápsula dura o blanda, un sello, un trocisco o un comprimido para deshacer en la boca, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de la proteína histona H1. Otras formulaciones apropiadas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, una formulación en polvo o granular, una suspensión acuosa u oleosa, una solución acuosa u oleosa, o una emulsión.

45 Como se utiliza en este documento, un líquido "oleoso" es uno que comprende una molécula líquida que contiene carbono y que presenta un carácter menos polar que el agua.

50 Un comprimido que comprende la proteína histona H1, por ejemplo, se puede fabricar por compresión o moldeo de la proteína histona H1, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos se pueden preparar por compresión, en un dispositivo apropiado, la proteína histona H1 en una forma de flujo libre tal como una preparación en polvo o granular, opcionalmente mezclada con uno o más de un aglutinante, un lubricante, un excipiente, un agente surfactante, y un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden hacerse por moldeo, en un dispositivo apropiado, una mezcla de la proteína histona H1, un portador farmacéuticamente aceptable, y al menos suficiente líquido para humedecer la mezcla. Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados en la fabricación de comprimidos incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregantes, agentes aglutinantes, y agentes lubricantes. Los agentes dispersantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de

- patata y almidón glicolato sódico. Los agentes surfactantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio. Los diluyentes conocidos incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio, fosfato de hidrógeno de calcio, y fosfato de sodio. Los agentes de granulación y disgregantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz y ácido algínico. Los agentes aglutinantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, gelatina, acacia, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, e hidroxipropil metilcelulosa. Los agentes lubricantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, estearato de magnesio, ácido esteárico, sílica y talco.
- Los comprimidos pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertos utilizando métodos conocidos para lograr la desintegración retardada en el tracto gastrointestinal de un sujeto, proporcionando de este modo una liberación sostenida y la absorción de la proteína histona H1. A modo de ejemplo, se puede utilizar un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para recubrir los comprimidos. Además, a modo de ejemplo, los comprimidos se pueden recubrir utilizando los métodos descritos las Patentes de los Estados Unidos números 4,256,108; 4,160,452; y 4,265,874 para formar comprimidos de liberación controlada osmóticamente. Los comprimidos pueden comprender además un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente colorante, un conservante, o alguna combinación de éstos con el fin de proporcionar la preparación farmacéuticamente elegante y agradable al paladar.
- Las cápsulas duras que comprenden la proteína histona H1 se pueden hacer utilizando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas duras comprenden la proteína histona H1, y pueden comprender además ingredientes adicionales incluyendo, por ejemplo, un diluyente sólido inerte tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio, o caolín.
- Las cápsulas de gelatina blanda que comprenden la proteína histona H1 se pueden hacer utilizando una composición fisiológicamente degradable, tal como gelatina. Tales cápsulas duras comprenden la proteína histona H1, que puede estar mezclada con agua o un medio oleoso, tales como aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.
- Las formulaciones líquidas de una composición farmacéutica de la divulgación que son apropiadas para administración oral se pueden preparar, envasar y comercializar ya sea en forma líquida o en forma de un producto seco destinado a la reconstitución con agua u otro vehículo apropiado antes de su uso.
- Las suspensiones líquidas se pueden preparar utilizando métodos convencionales para conseguir la suspensión de la proteína histona H1 en un vehículo acuoso u oleoso. Los vehículos acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los vehículos oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo, o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales tales como parafina líquida. Las suspensiones líquidas pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes, agentes emulsionantes, demulcentes, conservantes, soluciones reguladoras, sales, aromatizantes, agentes colorantes, y agentes edulcorantes. Las suspensiones oleosas pueden comprender además un agente espesante. Los agentes de suspensión conocidos incluyen, pero no se limitan a, jarabe de sorbitol, grasas comestibles hidrogenadas, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto, goma de acacia, y derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa. Los agentes humectantes o dispersantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, fosfátidos de origen natural tales como lecitina, productos de condensación de un óxido de alquileño con un ácido graso, con un alcohol alifático de cadena larga, con un éster parcial derivado de un ácido graso y una hexitol, o con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, estearato de polioxietileno, heptadecaetilenoxietanol, monooleato de sorbitol de polioxietileno, y monooleato de sorbitán polioxietileno, respectivamente). Los agentes emulsionantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, lecitina y acacia. Los conservantes conocidos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, o n-propil-para-hidroxibenzoatos, ácido ascórbico y ácido sórbico. Los agentes edulcorantes conocidos incluyen, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol, sacarosa y sacarina. Los agentes espesantes conocidos para suspensiones oleosas incluyen, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura y alcohol cetílico.
- Las soluciones líquidas de la proteína histona H1 en solventes acuosos u oleosos se pueden preparar sustancialmente de la misma manera que las suspensiones líquidas, siendo la diferencia principal que la proteína histona H1 se disuelve, en lugar de suspenderse en el solvente. Las soluciones líquidas de la composición farmacéutica de la divulgación pueden comprender cada uno de los componentes descritos con respecto a las suspensiones líquidas, siendo entendido que los agentes de suspensión no necesariamente ayudarán a la disolución de la proteína histona H1 en el solvente. Los solventes acuosos incluyen, por ejemplo, agua y solución salina isotónica. Los solventes oleosos incluyen, por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, oliva, sésamo, o coco, aceites vegetales fraccionados y aceites minerales tales como parafina líquida.
- Las formulaciones en polvo y en gránulos de una preparación farmacéutica de la divulgación se pueden preparar utilizando métodos conocidos. Tales formulaciones se pueden administrar directamente a un sujeto, utilizadas, por ejemplo, para formar comprimidos, para llenar cápsulas o para preparar una suspensión acuosa u oleosa o solución mediante la adición de un vehículo acuoso u oleoso a la misma. Cada una de estas formulaciones puede comprender

además uno o más de agente dispersante o humectante, un agente de suspensión, y un conservante. Excipientes adicionales, tales como agentes de carga y edulcorantes, aromatizantes o colorantes, también pueden incluirse en estas formulaciones.

5 Una composición farmacéutica de la divulgación también se puede preparar, envasar o comercializar en la forma de emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva o de cacahuete, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una combinación de éstos. Tales composiciones pueden comprender además uno o más agentes emulsionantes, tales como gomas de origen natural tales como goma arábica o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural tales como soja o fosfátido lecitina, ésteres o ésteres parciales derivados de combinaciones de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como sorbitán monooleato, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno tales como monooleato de polioxietileno sorbitán. Estas emulsiones pueden contener también ingredientes adicionales incluyendo, por ejemplo, edulcorantes o agentes aromatizantes.

15 Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar en una formulación apropiada para la administración rectal. Dicha composición puede estar en la forma de, por ejemplo, un supositorio, una preparación de enema de retención, y una solución para irrigación rectal o colónica.

20 Las formulaciones de supositorios se pueden hacer mediante la combinación de la proteína histona H1 con un excipiente farmacéuticamente aceptable no irritante que es sólido a temperatura ambiente normal (i.e., aproximadamente 20 °C) y que es líquido a la temperatura rectal del sujeto (i.e., aproximadamente 37 °C en un ser humano sano). Los excipientes farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen, pero no se limitan a, manteca de cacao, polietilenglicoles y diversos glicéridos. Las formulaciones de supositorios pueden comprender además diversos ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, antioxidantes y conservantes.

25 Las preparaciones de enema de retención o soluciones para irrigación rectal o colónica se pueden hacer mediante la combinación de la proteína histona H1 con un portador líquido farmacéuticamente aceptable. Como es bien conocido en la técnica, las preparaciones de enema se pueden administrar utilizando, y se pueden envasar dentro de, un dispositivo de administración adaptado a la anatomía rectal del sujeto. Las preparaciones de enema pueden comprender además diversos ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, antioxidantes y conservantes.

30 Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar en una formulación apropiada para la administración vaginal. Dicha composición puede estar en la forma de, por ejemplo, un supositorio, un material de impregnación o recubrimiento insertable por vía vaginal tal como un tampón, una preparación de ducha, o una solución para irrigación vaginal.

35 Los métodos para impregnar o revestir un material con una composición química son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a los métodos de depositar o unir una composición química sobre una superficie, métodos de incorporación de una composición química en la estructura de un material durante la síntesis del material (i.e., tal como con un material fisiológicamente degradable) y métodos de absorción de una solución o suspensión acuosa u oleosa en un material absorbente, con o sin secado posterior.

40 Las preparaciones o soluciones de duchas para la irrigación vaginal se pueden hacer mediante la combinación de la proteína histona H1 con un portador líquido farmacéuticamente aceptable. Como es bien conocido en la técnica, las preparaciones de ducha se pueden administrar utilizando, y se pueden envasar dentro de, un dispositivo de administración adaptado a la anatomía vaginal del sujeto. Las preparaciones de ducha pueden comprender además diversos ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, antioxidantes, antibióticos, agentes antifúngicos y conservantes.

45 Como se utiliza en este documento, la "administración parenteral" de una composición farmacéutica incluye cualquier vía de administración caracterizada mediante el rompimiento físico de un tejido de un sujeto y la administración de la composición farmacéutica a través de la brecha en el tejido. Por lo tanto, la administración parenteral incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica mediante inyección de la composición, aplicando la composición a través de una incisión quirúrgica, aplicando la composición a través de una herida no quirúrgica de penetración en tejido, y similares. En particular, la administración parenteral se contempla para incluir, pero no se limita a, inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravenosa y intraesternal, intraarterial, o técnicas de infusión de diálisis renal.

50 Las formulaciones de una composición farmacéutica apropiada para administración parenteral comprenden la proteína histona H1 combinada con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o solución salina isotónica estéril. Tales formulaciones se pueden preparar, envasar o comercializar en una forma apropiada para la administración en bolo o para la administración continua. Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o comercializar en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en envases multidosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no se limitan a, suspensiones, soluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, y de liberación sostenida implantable o formulaciones biodegradables. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, agentes

de suspensión, estabilizantes, o dispersantes. En una realización de una formulación para administración parenteral, la proteína histona H1 se provee en forma seca (i.e., polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo apropiado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o comercializar en forma de una solución o suspensión oleosa o acuosa inyectable estéril. Esta suspensión o solución se puede formular de acuerdo con la técnica conocida, y pueden comprender, además de la proteína histona H1, ingredientes adicionales tales como los agentes dispersantes, agentes humectantes, o agentes de suspensión descritos en este documento. Tales formulaciones inyectables estériles se pueden preparar utilizando un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como agua o 1,3-butanodiol, por ejemplo. Otros diluyentes y solventes aceptables incluyen, pero no se limitan a, solución de Ringer, 10 solución isotónica de cloruro sódico, y aceites fijos tales como mono o diglicéridos sintéticos. Otras formulaciones administrables por vía parenteral que son útiles incluyen aquellos que comprenden la proteína histona H1 en forma microcristalina, en una preparación liposomal, o como un componente de un sistema de polímeros biodegradables. Las composiciones para liberación sostenida o implante pueden comprender materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables tales como una emulsión, una resina de intercambio iónico, un polímero moderadamente 15 soluble, o una sal moderadamente soluble.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar, envasar o comercializar en una forma apropiada para la administración tópica. Las formulaciones apropiadas para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, preparaciones líquidas o semi-líquidas tales como linimentos, lociones, emulsiones de aceite-en-agua o agua en aceite 20 tales como cremas, ungüentos o pastas, y soluciones o suspensiones. Formulaciones administrables por vía tópica pueden, por ejemplo, comprender de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (peso/peso) de proteína histona H1, aunque la concentración de la proteína histona H1 puede ser tan alta como el límite de solubilidad de la proteína histona H1 en el solvente. Las formulaciones para administración tópica pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento. Las formulaciones para la administración tópica incluyen, pero no se limitan a, los destinados al uso externo (i.e., dérmico), los destinados a la administración transdérmica de la proteína 25 histona H1, y los destinados a la administración por vía transmucosa de la proteína histona H1.

Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar en una formulación apropiada para la administración pulmonar a través de la cavidad bucal. Dicha formulación puede comprender partículas secas que comprenden la proteína histona H1 y que tienen un diámetro en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 7 nanómetros, y preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 nanómetros. Tales 30 composiciones están convenientemente en forma de polvos secos para la administración utilizando un dispositivo que comprende un depósito de polvo seco al que una corriente de propulsor puede ser dirigida para dispersar el polvo o utilizando un recipiente de dispensación de polvo/solvente auto propulsor tal como un dispositivo que comprende la proteína histona H1 disuelta o suspendida en un propulsor de bajo punto de ebullición en un recipiente sellado. Preferiblemente, tales polvos comprenden partículas en donde al menos 98% de las partículas en peso tienen un 35 diámetro mayor de 0.5 nanómetros y al menos 95% de las partículas en número tienen un diámetro de menos de 7 nanómetros. Más preferiblemente, al menos 95% de las partículas en peso tienen un diámetro mayor que 1 nanómetro y al menos 90% de las partículas en número tienen un diámetro de menos de 6 nanómetros. Las composiciones en polvo seco incluyen preferiblemente un diluyente sólido en polvo fino tal como azúcar y se proveen convenientemente en una forma de dosis unitaria.

40 Los propulsores de bajo punto de ebullición generalmente incluyen propulsores líquidos que tienen un punto de ebullición por debajo de 65 °F a presión atmosférica. Generalmente, el propulsor puede constituir el 50 a 99.9% (peso/peso) de la composición, y la proteína histona H1 puede constituir 0.1 a 20% (peso/peso) de la composición. El propulsor puede comprender además ingredientes adicionales tales como un surfactante aniónico sólido o no iónico líquido o un diluyente sólido (que tiene preferiblemente un tamaño de partícula del mismo orden que las partículas que 45 comprenden la proteína histona H1).

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación formuladas para la administración pulmonar también pueden proporcionar la proteína histona H1 en forma de gotitas de una solución o suspensión. Tales formulaciones se pueden preparar, envasar o comercializar como soluciones acuosas o alcohólicas diluidas o suspensiones, opcionalmente estériles, que comprenden la proteína histona H1, y se pueden administrar convenientemente utilizando cualquier 50 dispositivo de nebulización o atomización. Tales formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitando a, un agente saborizante tal como sacarina sódica, un aceite volátil, un agente regulador, un agente surfactante, o un conservante tal como hidroxibenzoato de metilo. Las gotitas proporcionadas por esta vía de administración tienen preferiblemente un diámetro medio en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 200 nanómetros.

55 Las formulaciones descritas en este documento como útiles para la administración pulmonar también son útiles para la administración intranasal de una composición farmacéutica de la invención.

Otra formulación apropiada para administración intranasal es un polvo grueso que comprende la proteína histona H1 y que tiene una partícula promedio de aproximadamente 0.2 a 500 micrómetros. Dicha formulación se administra de

manera en la cual se toma por inhalación i.e., por inhalación rápida a través del conducto nasal desde un recipiente del polvo mantenido cerca de los orificios nasales.

Las formulaciones apropiadas para administración nasal pueden, por ejemplo, comprender desde aproximadamente tan poco como 0.1% (peso/peso) y tanto como 100% (peso/peso) de la proteína histona H1, y pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento.

Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar en una formulación apropiada para la administración bucal. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, estar en forma de comprimidos o comprimidos para deshacerse en la boca formulados utilizando métodos convencionales, y pueden, por ejemplo, tener de 0.1 a 20% (peso/peso) de proteína histona H1, el equilibrio que comprende una composición degradable o soluble por vía oral y, opcionalmente, uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento. Alternativamente, las formulaciones apropiadas para administración bucal pueden comprender un polvo o una solución en aerosol o atomizadas o suspensión que comprende la proteína histona H1. Tales formulaciones en polvo, aerosol, o en aerosol, cuando se dispersan, tienen preferiblemente un tamaño medio de partícula o de las gotitas en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 200 nanómetros, y pueden comprender además uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento.

Una composición farmacéutica de la divulgación se puede preparar, envasar o comercializar en una formulación apropiada para la administración oftálmica. Dichas formulaciones pueden, por ejemplo, estar en la forma de gotas oculares, incluyendo, por ejemplo, un 0.1 a 1.0% (peso/vol.) de solución o suspensión de la proteína histona H1 en un portador líquido acuoso u oleoso. Tales gotas pueden comprender además agentes reguladores, sales, o uno o más de los ingredientes adicionales descritos en este documento. Otras formulaciones oftálmicamente-administrables que son útiles incluyen aquellos que comprenden la proteína histona H1 en forma microcristalina o en una preparación liposomal.

Como se utiliza en este documento, "ingredientes adicionales" incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: excipientes; agentes surfactantes; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y disgregantes; agentes aglutinantes; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes saborizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos y solventes acuosos; vehículos y solventes oleosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; agentes reguladores; sales; agentes espesantes; agentes de carga; agentes emulsionantes; antioxidantes; antibióticos; agentes antifúngicos; agentes estabilizantes; y materiales hidrófobos o poliméricos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA. Una composición farmacéutica de la divulgación se puede administrar para suministrar una dosis entre 1 ng/kg/día y 100 mg/kg/día, y preferiblemente para suministrar una dosis entre 0.1 mg/kg/día y 10 mg/kg/día a un sujeto.

Se entiende que el médico o veterinario experto determinará fácilmente y prescribirán una cantidad eficaz del compuesto para matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo en el sujeto. Al proceder así, el médico o veterinario puede, por ejemplo, prescribir una dosis relativamente baja al principio, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtiene una respuesta apropiada. Sin embargo, se entiende, además, que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del sujeto, el tiempo de administración, la vía de administración, la tasa de excreción, cualquier combinación de fármacos y la gravedad de la infección por microorganismo o parasitismo que se está tratando.

Inducción de la muerte de un microorganismo utilizando la histona H1

La histona H1 presenta amplios efectos citotóxicos y citostáticos, siendo los efectos dependientes del tipo de célula diana y la concentración de la histona. La concentración de la histona H1 que es útil para la citotoxicidad o citostasis de un tipo de célula particular se puede determinar por el experto en el arte sin experimentación innecesaria. A modo de ejemplo, las concentraciones citotóxicas y citostáticas de la histona H1 se pueden determinar mediante el cultivo de las células en presencia y en ausencia de una variedad de concentraciones seleccionadas de la histona H1 en un medio apropiado. Al observar el efecto de la concentración de histona H1 en el número de células, las concentraciones citotóxicas y citostáticas serán evidentes para el experto en el arte.

Debido a que la histona H1 presenta amplios efectos citostáticos y citotóxicos, esta se puede utilizar para matar o detener el crecimiento de microorganismos que no son susceptibles a otros agentes antibióticos. A modo de ejemplo, las bacterias resistentes a los antibióticos son un problema de magnitud creciente en el campo de la salud humana. La capacidad de un patógeno humano para sobrevivir la administración de uno o más antibióticos a un paciente humano infectado con el patógeno puede aumentar la longitud o la gravedad de la infección. Se han aislado los patógenos humanos resistentes a una variedad de agentes antibióticos conocidos. Como se describe en este documento, por lo menos algunos de estos patógenos resistentes a los antibióticos son susceptibles al efecto antibiótico de la histona H1. Por ejemplo, como se describe en este documento, *Escherichia coli* resistente a la penicilina muere en la presencia de la histona H1 a aproximadamente la misma concentración de la histona en la que muere la *E. coli* de tipo salvaje.

Adicionalmente, la histona H1 tiene una mayor actividad antibiótica, sobre una base molar, que los agentes antibióticos conocidos, tales como penicilina y kanamicina.

Se incluye dentro de la divulgación un método para inducir la muerte de un microorganismo. Este método comprende poner en contacto el microorganismo con una composición que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. Preferiblemente, el microorganismo es un patógeno humano. A modo de ejemplo, la célula también puede ser de una cepa de una bacteria que es un patógeno humano y que es resistente a los antibióticos conocidos, tales como la penicilina o la kanamicina. El microorganismo puede ser también un microorganismo que está presente en un sitio en el que se desea la esterilidad, tal como la superficie de un instrumento quirúrgico o un implante, por ejemplo. El microorganismo puede ser también un microorganismo en una célula humana, tal como una célula Chlamydia, por ejemplo.

De acuerdo con este método, el microorganismo se pone en contacto con una cantidad de proteína histona H1 que es suficiente para matar al microorganismo. Se entiende que la cantidad precisa de la proteína histona H1 suficiente para matar a un microorganismo seleccionado depende de la identidad del microorganismo, las condiciones bajo las cuales la proteína histona H1 ha sido almacenada, la densidad celular del microorganismo y otros factores, incluyendo las características físicas y químicas del entorno en el que se encuentra el microorganismo, los cuales serán evidentes para un experto en el arte en vista de la presente divulgación. Se contempla que las concentraciones de proteína histona H1 en el intervalo de aproximadamente 0.2 micromolar hasta el límite de solubilidad de la proteína histona H1 serán útiles en este método que induce la muerte celular. Como se describe en este documento, las concentraciones de proteína histona H1 al menos tan baja como aproximadamente 0.2 micromolar y al menos tan alta como aproximadamente 4 micromolar son eficaces para inducir la muerte de al menos ciertos tipos de bacterias. El experto en la materia puede determinar un rango de concentraciones de la histona H1 citotóxicas para cualquier microorganismo particular, siguiendo la orientación proporcionada en la presente divulgación sin una experimentación significativa.

Se reconoce que concentraciones muy altas (i.e., del orden de 10-100 micromolar) de la histona H1 pueden inducir la muerte de las células animales. Por lo tanto, en casos en los que la proteína histona H1 es para ser utilizada como un antibiótico en un animal tal como un ser humano, es importante que se puedan seleccionar la ruta y la dosis de la proteína histona H1 administrada al animal, para mantener la concentración in vivo de la histona H1 por debajo de una concentración a la que la histona H1 es citotóxica para las células animales. Utilizando nada más que los métodos estándar de pruebas farmacológicas, las vías de administración y los niveles de dosificación para la proteína histona H1 se puede determinar lo que minimizará la citotoxicidad mediada la histona H1 en un animal. Dado que la muerte de las células bacterianas puede ser inducida utilizando concentraciones relativamente bajas de la histona H1 (por ejemplo, 0.2-4 μM), como se describe en este documento, el experto en el arte entenderá que las concentraciones in vivo de la histona H1 se pueden lograr en un animal que será eficaz para inducir la muerte de las células bacterianas sin inducir citotoxicidad clínicamente significativa en un animal infectado con las células bacterianas.

Inhibición del crecimiento de un microorganismo

La divulgación también incluye un método para inhibir el crecimiento de un microorganismo. Este método comprende poner en contacto el microorganismo con una composición que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. Se contempla, el uso de este método para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas humanas, incluyendo cepas resistentes a múltiples fármacos de bacterias. De acuerdo con este método de la invención, la misma composición descrita para su uso en el método de inducir la muerte celular descrita en este documento, se utiliza sustancialmente de la misma manera como se utiliza en este método, siendo entendido que la histona H1 presentará actividad citotóxica hacia muchos microorganismos y la actividad citostática hacia los demás. Sin embargo, la inhibición del crecimiento de un microorganismo tal como un patógeno humano reduce la velocidad a la que la gravedad de la infección aumenta y permite que el sistema inmunológico del animal infectado monte una reacción más fuerte a la infección que sería posible en ausencia de la inhibición del crecimiento inducido por la histona H1 del microorganismo.

La invención también incluye un método para tratar una infección microbiana en un animal tal como un ser humano. Este método comprende la administración al animal de una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. La composición se puede administrar al animal por una vía oral, rectal, vaginal, parenteral, tópica, pulmonar, intranasal, bucal, oftálmica u otra vía de administración. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración por estas vías se describen en este documento.

La divulgación todavía incluye además un método para inhibir el crecimiento microbiano en un sitio seleccionado que puede, por ejemplo, ser un sitio sobre o dentro del cuerpo de un animal tal como un humano, un sitio sobre o en un objeto no vivo o un sitio en o sobre el cual el crecimiento microbiano se sospecha o se sabe que está presente. Este método comprende proporcionar una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota en el sitio. En un aspecto de este método, se provee la composición en el sitio mediante la incorporación de la composición en el sitio, tales como mediante la síntesis de un objeto utilizando un material que comprende la composición. A modo de ejemplo, el crecimiento microbiano se puede inhibir en una composición farmacéutica inyectable mediante la inclusión de una proteína histona H1 eucariota en la composición. Adicionalmente a modo de ejemplo, el sitio puede ser

un sitio en o dentro de un producto alimenticio. Cuando el sitio está en o dentro del cuerpo del animal, la composición puede ser proporcionada en el sitio en el momento de o antes de la cirugía, por lo que la infección se previene o inhibe mediante la inhibición del crecimiento microbiano en el sitio.

5 En otra realización de este método, se provee la composición en el sitio, proporcionando la composición a una superficie que se pone en contacto con el sitio. La superficie puede ser una superficie animal, tal como la superficie de una herida de un animal herido, o puede ser una superficie inanimada, tal como una superficie de preparación de alimentos o la superficie de un implemento quirúrgico. Adicionalmente, la superficie puede ser la superficie de un implante biodegradable que comprende la composición y que se implanta dentro del cuerpo de un animal tal como un ser humano.

10 Es conocido en la técnica que el pienso para animales suplementado con uno o más antibióticos resulta en la mejora del crecimiento de los animales tales como vacas y otros animales de granja que ingieren el pienso. Por lo tanto, la divulgación incluye un pienso para animales suplementado que comprende un pienso para animales suplementado con una composición antimicrobiana que comprende una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. La invención también incluye un método para mejorar el crecimiento de un animal no humano, el método comprende
15 alimentar el animal con pienso para animales suplementado con histona H1.

La divulgación incluye además un método de vacunación de un animal contra un microorganismo. Este método comprende administrar al animal una composición que comprende una forma atenuada o muerta del microorganismo y una proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada. Como se describe en la Patente de los Estados Unidos 5,182,257, las histonas, incluyendo histona H1, muestran efectos inmunoestimulantes, lo que significa que se
20 incrementa la actividad de los componentes del sistema inmune cuando una histona se administra a un animal. Debido a que la histona H1 también presenta actividad antimicrobiana, una vacuna se puede hacer poniendo en contacto un microorganismo con la histona H1 en una mezcla con el fin de matar el microorganismo, y luego administrar la mezcla a un animal para inmunizar al animal con respecto al microorganismo. La vacuna preparada de esta manera contiene tanto el microorganismo muerto que comprende un antígeno y una histona inmunoestimulante, preferiblemente histona H1. La divulgación incluye por lo tanto un método para preparar una vacuna, una vacuna preparada por ese método, y
25 un método de inmunización de un animal, que comprende la administración de una vacuna preparada de la manera revelada al animal.

El kit de la divulgación

30 La divulgación incluye, además, un kit que comprende la composición farmacéutica antimicrobiana de la invención y un material instructivo seleccionado del grupo que consiste en un material instructivo que describe el uso de la composición antimicrobiana para matar un microorganismo y un material instructivo que describe el uso de la composición antimicrobiana para detener el crecimiento de un microorganismo. Preferiblemente, la composición está en una forma de dosificación unitaria.

35 En una realización del kit de la divulgación, el kit comprende además una segunda composición que comprende un antídoto de la histona H1 tal como la heparina. En otra realización, el kit comprende además un material instructivo que describe la administración del antídoto de histona H1 a un animal que presenta una reacción adversa a la administración al mismo de la histona H1.

Como se utiliza en este documento, un "material instructivo" incluye una publicación, un registro, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que se utiliza para comunicar la utilidad de la composición farmacéutica de la divulgación para matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo en un sujeto. El material instructivo también puede, por ejemplo, describir una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la invención. El material instructivo del kit de la divulgación puede, por ejemplo, ser fijada a un recipiente que contiene una composición farmacéutica de la invención o ser enviado junto con un recipiente que contiene la composición farmacéutica. Alternativamente, el material instructivo puede ser enviado por separado del recipiente con la intención de que el material instructivo y la composición farmacéutica se pueden usar cooperativamente por el destinatario.
45

La divulgación también incluye un kit que comprende una composición farmacéutica de la invención y un dispositivo de suministro para suministrar la composición a un sujeto. A modo de ejemplo, el dispositivo de suministro puede ser una botella exprimible de pulverización, una botella de pulverización de dosis medida, un dispositivo de pulverización en aerosol, un atomizador, un dispositivo de suministro de polvo seco, un dispositivo de solvente/dispensadores de polvo de autopropulsión, una jeringa, una aguja, un tampón, o un recipiente de medición de dosis. El kit puede comprender además un material instructivo según se describe en este documento.
50

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos ejemplos se proveen solamente con el propósito de ilustración y la invención de ningún modo deberá interpretarse como limitada a estos ejemplos, sino más bien debe interpretarse para abarcar cualquiera y todas las variaciones que se engloban en el alcance de las reivindicaciones 1-27 adjuntas.
55

Ejemplo 1

Preparación de la histona bovina purificada

Las histonas se purificaron de acuerdo con Pehrson et al. (1981, Biochemistry 20:2298-2301).

Ejemplo 2

Preparación de la histona H1 recombinante humana en *Escherichia coli*

- 5 La histona H1 recombinante humana se puede preparar en *E. coli* como se describe en las referencias citadas en este documento.

Ejemplo 3

Preparación de la histona H1 recombinante humana en levadura

- 10 La histona H1 recombinante humana se puede preparar en la levadura como se describe en las referencias citadas en este documento.

Ejemplo 4

Dependencia de la concentración de la citotoxicidad de la histona H1

- 15 La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 (obtenido de ATCC) se cultivaron en medio NYET (4 gramos por litro de caldo nutriente, 7.5 gramos por litro de extracto de levadura, y 4 gramos por litro de triptona a 37 °C. Las células de *E. coli* en aproximadamente la fase de crecimiento exponencial se incubaron en solución reguladora de Sorensen (Na₂HPO₄ 41 mM, KH₂PO₄ 25.7 mM) durante veinte minutos en presencia de una concentración seleccionada de histona H1. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, en relación a las células que no se pusieron en contacto con la histona H1 se determinó contando las colonias utilizando un contador de colonias automático (3M modelo 620). Aproximadamente 200 microlitros de una suspensión bacteriana que contiene H1 se sembraron en placas de Petri por la adición de 10 mililitros de medio a 57 °C que contiene agar Bacto al 1.5% (peso/peso). La histona H1 fue inactivada por calor y se diluyó 50 veces mediante este procedimiento, con el resultado de que la concentración de H1 ya no era biológicamente activa.

- 25 Como se indica en la figura 1 y la figura 1A, más del 98% de las células de *E. coli* murieron tras el contacto de las células con una suspensión que tiene una concentración de histona H1 de menos de 1 micromolar. La citotoxicidad significativa se observó en concentraciones de H1 tan bajas como 0.24 micromolar.

La incubación de las células a 37 °C con una composición que comprende H1 1.9 micromolar por menos de diez minutos era suficiente para lograr el efecto citotóxico máximo. Una incubación más larga no resultó en una mayor aniquilación, como se indica en la figura 2.

- 30 La eficacia citotóxica de la histona H1 se comparó con las eficacias de las concentraciones iguales de penicilina y kanamicina. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron a 37 °C, durante diez minutos en solución reguladora de Sorensen que comprendía una histona H1 1.9 micromolar, penicilina 1.9 micromolar, y kanamicina 1.9 micromolar. La citotoxicidad efectuada por incubación de las células en presencia de histona H1 fue más de cien veces mayor que la citotoxicidad efectuada por incubación de las células en presencia de penicilina. La incubación de las células en presencia de kanamicina resultó en ninguna citotoxicidad medible.

- 35 Los experimentos presentados en este Ejemplo demuestran que la histona H1 mata las bacterias más rápido y más eficientemente que ya sea la penicilina o la kanamicina a una concentración igual.

Ejemplo 5

Dependencia de la temperatura de los efectos antibióticos de histona H1

- 40 La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a una temperatura seleccionada durante un período seleccionado en presencia de una histona H1 1.9 micromolar. La supervivencia fraccionada de células en contacto con histona H1, con respecto a las células sin contacto con la histona H1 se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4. Se observó que el efecto bactericida de la histona H1 fue significativamente mayor a 37 °C que a ya sea 4 °C o 30 °C. La temperatura normal del cuerpo humano es de aproximadamente 37 °C.

- 45 Los resultados de los experimentos presentados en este ejemplo indican que la histona H1 presenta mayor efecto bactericida a la temperatura normal del cuerpo humano del que hace a temperaturas más bajas. Por lo tanto, es necesario utilizar una mayor concentración de histona H1 en situaciones en las que la temperatura es inferior a la temperatura normal del cuerpo humano con el fin de lograr un efecto bactericida equivalente. Por lo tanto, una

preparación tópica de antibiótico para su uso antiséptico en heridas de piel humana, por ejemplo, puede comprender una mayor concentración de histona H1 que la de una preparación destinada para inyección intravenosa en un ser humano.

Ejemplo 6

5 Efecto bactericida de la histona H1 en bacterias resistentes a la penicilina

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 o células (por separado) de una cepa de *E. coli* resistente a la penicilina derivada de la cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a 37 °C, por un periodo seleccionado en la presencia de una histona H1 1.9 micromolar. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se hicieron resistentes a la penicilina cultivándolas en medio de crecimiento que contenía penicilina durante un período de varios días. La población resultante era completamente resistente a la penicilina. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, en relación a las células sin contacto con la histona, se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4.

Como se indica en la figura 3, la histona H1 mató a las células resistentes a la penicilina aproximadamente tan eficientemente como mató las células de tipo salvaje. Estos resultados indican que la histona H1 se puede utilizar para tratar infecciones que implican bacterias resistentes a los fármacos. Los efectos bactericidas de la histona H1 no se vieron afectados por el(los) mecanismo(s) bacteriano(s) que confiere(n) la resistencia a la penicilina a las bacterias.

Ejemplo 7

Dependencia de la estructura terciaria de la actividad del antibiótico de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. La histona H1 digerida proteolíticamente fue preparada mediante la incubación de la histona H1 purificada en solución reguladora de Sorensen que contiene 0.05% (peso/vol.) de tripsina durante treinta minutos a temperatura ambiente (i.e., unos 20 °C). Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a 37 °C, durante veinte minutos en presencia de cualquiera de histona H1 1.9 micromolar o histona H1 1.9 micromolar tripsinizada. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, respecto a las células sin contacto con la histona H1, se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4.

La histona H1 tripsinizada no mostró actividad antibiótica, mientras que la histona H1 no-tripsinizada sí. La tripsina sola no tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de las bacterias. Estos resultados indican que el efecto antibiótico de la histona H1 es atribuible a la unión de la histona a una molécula biológica particular de células diana, y que el efecto antibiótico de la histona H1 no es atribuible simplemente a las características físicas de los componentes de la histona (por ejemplo, la sola presencia de o la naturaleza básica de las cadenas laterales de aminoácidos de la histona H1). Estos resultados sugieren que, además, el efecto antibiótico de la histona H1 es atribuible a una interacción específica proteína-proteína entre la histona y una proteína de célula diana.

Ejemplo 8

Estabilidad térmica de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. En un primer experimento, la histona H1 purificada se almacenó a -80 °C durante más de treinta y seis meses. La actividad antibiótica de la histona H1 no se redujo significativamente por este método de almacenamiento.

En un segundo experimento, alícuotas de la histona H1 purificada se almacenaron por separado a -80 °C, a 4 °C, y a 37 °C durante veinte horas. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron a partir de entonces en solución reguladora de Sorensen a 37 °C durante diez minutos en presencia de 40 microgramos por mililitro de histona H1 obtenidos a partir de una de las tres alícuotas. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, en relación a las células sin contacto con la histona H1, se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4. La supervivencia fraccionada de las células incubadas con la histona H1 se almacena a -80 °C fue de aproximadamente 0.1%. La supervivencia fraccionada de las células incubadas con la histona H1 se almacena a 4 °C fue de aproximadamente 1%. La supervivencia fraccionada de las células incubadas con la histona H1 se almacena a 37 °C fue de aproximadamente 6%.

Los resultados de los experimentos descritos en este Ejemplo indican que la actividad antibiótica de la histona H1 se puede conservar mediante el almacenamiento de la enzima en o por debajo de -20 °C, y preferiblemente en o por debajo de -80 °C. La histona H1 se debe utilizar dentro de las seis horas después de la descongelación. Además, estos resultados indican que la histona H1 se puede almacenar a -80 °C durante al menos treinta y seis meses sin pérdida de actividad, y preferiblemente se almacena no más de aproximadamente veinticuatro meses antes de su uso.

Ejemplo 9

Espectro de actividad antibiótica de la histona h1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describen en este documento en el Ejemplo 1. Los cultivos de diversas bacterias de prueba se hicieron en medio seleccionado apropiadamente, y las células se incubaron hasta que se estimaron los cultivos, utilizando procedimientos estándar, que presentan un crecimiento en fase logarítmica temprana. La histona H1 suspendida en solución reguladora de Sorensen se adicionó a alícuotas de cultivos bacterianos individuales para lograr una concentración final de 1.9 micromolar o 3.8 micromolar. No se adicionó histona H1 a alícuotas de cultivo de control individuales. Las alícuotas se incubaron después a 37 °C, ya sea durante diez minutos o cuarenta y cinco minutos, y las alícuotas se sembraron en medios sólidos o semisólidos apropiados. Al día siguiente, el número de colonias se enumera en las alícuotas sembradas en placas, y el porcentaje de reducción en la formación de colonias, como se indica en la Tabla 1, se determinó mediante la comparación de las colonias formadas en alícuotas tratadas con histona H1 sembradas en placas con colonias formadas en alícuotas de control sembradas en placa.

Tabla 1

Tiempo de incubación del organismo [histona H1] micromolar	Reducción porcentual en la formación de colonias			
	10 minutos		45 minutos	
	1.9	3.8	1.9	3.8
<i>Escherichia coli</i> cepa AB1157	99.6	99.9	99.7	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.6	100	100	100
<i>Salmonella enteritidis</i>	>99	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	97.4	-	-	-
<i>Bacillus megaterium</i>	93.3	91.2	92.9	99.3
<i>Bacillus cereus</i>	11.8	50.7	42.5	77.4
<i>Serratia marcescens</i>	14.0	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Proteus mirabilis</i>	0.0	-	-	-

- Los datos de la Tabla 1 indican que la histona H1 mostró actividad antibiótica con respecto a la cepa de *Escherichia coli* cepa AB1157, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, y *Serratia marcescens*.

Como se indica en la figura 9, la histona H1 mostró actividad antibiótica con respecto a diversas cepas de *E. coli* aisladas de infecciones del tracto urinario. Después de treinta minutos todas las cepas muestran una supervivencia de menos del 3%.

- Se prevé que la histona H1 mostrará actividad antibiótica con respecto a al menos las bacterias enumeradas en la Tabla 2.

Tabla 2 - Bacterias susceptible a la histona-H1

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella* especie, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Staphylococcus albus*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus megaterium*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*

Ejemplo 10

- Independencia del suero de la actividad antibiótica de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a una temperatura seleccionada durante un período seleccionado en la presencia de una concentración seleccionada de la histona H1. En ensayos seleccionados, el medio también contenía entre 0 y aproximadamente 10% (v/v) de suero humano o bovino. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, respecto a las células sin contacto con la histona H1, se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4.

Se determinó que la actividad antibiótica de H1 era independiente de las concentraciones en suero a concentraciones al menos tan altas como 10% (v/v) de suero, utilizando ya sea suero AB humano o suero de ternera fetal. Basándose en estas observaciones, los expertos en la técnica entenderán que la histona H1 mostrará su actividad antibiótica incluso en entornos que contienen suero, tales como el flujo sanguíneo humano.

Ejemplo 11

Inhibidores de la actividad antibiótica de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a 37 °C durante diez minutos en presencia de 4 microgramos por mililitro de la histona H1. En ensayos seleccionados, el medio de incubación también contenía una concentración seleccionada de heparina, en el intervalo de 0 a aproximadamente de 250 unidades por mililitro. La supervivencia fraccionada de las células en contacto con histona H1, en relación a las células sin contacto con la histona H1, se determinó como se describe en este documento en el Ejemplo 4.

Como se indica en la figura 4, la heparina reduce la actividad antibiótica de la histona H1 a concentraciones tan bajas como 6.2 unidades por mililitro. A concentraciones mayores que aproximadamente 150 unidades por mililitro de heparina, la histona H1 no mostró esencialmente ninguna actividad antibiótica. Estos resultados indican que la actividad antibiótica de la histona H1 puede ser detenida mediante la adición de heparina al medio que contiene la histona H1. Estos resultados sugieren además que cualquier actividad citotóxica adversa que la histona H1 potencialmente pueda presentar cuando se administra a un sujeto tal como un humano puede ser detenida, mediante la administración de heparina al sitio que contiene la histona H1-del sujeto. A modo de ejemplo, la actividad hemolítica observada en un paciente humano sensible a la histona H1 después de la administración intravenosa de la histona H1 puede ser inhibida o eliminada, mediante la administración intravenosa de heparina al paciente.

Ejemplo 12

Desarrollo de resistencia bacteriana a la actividad antibiótica de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incuban en alícuotas de solución reguladora de Sorensen que contienen diversas concentraciones fijas de la histona H1. La alícuota que tiene la concentración más alta de la histona H1 en la que proliferan las células (como se indica, por ejemplo, por la turbidez de la memoria intermedia) se utiliza para sembrar cultivos que tienen concentraciones aún mayores de histona H1. Este proceso se repite hasta que las células son aisladas, que crecen a una concentración de histona H1 que normalmente es tóxica para las células de *E. coli*.

Como se describe en este documento en el Ejemplo 6, la histona H1 mata las bacterias rápidamente de forma relativa (i.e., dentro de unos diez minutos). Se sabe que las bacterias mueren rápidamente utilizando un agente, se reduce la presión de selección para el desarrollo de resistencia bacteriana al agente (Desnottes, 1998, *The Scientist* 12:6). En vista de estos datos, el experto en el arte comprenderá que el desarrollo de bacterias resistentes a la histona H1 no debe ser mayor, y probablemente menos, presumiblemente que el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos conocidos.

Ejemplo 13

Unión de la histona H1 a las bacterias

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Una alícuota de células de *E. coli* cepa AB1157 se incubó con la histona H1 como se describe en este documento en el Ejemplo 4. Después de cuarenta y cinco minutos de incubación, las células se eliminaron por centrifugación y decantación. El medio decantado fue inoculado con células frescas de *E. coli*, y la supervivencia fraccionada de estas células se determinó como se describe en el Ejemplo 4, en comparación con una muestra de células incubadas con la histona H1 recién preparada. Los resultados de este experimento se presentan en la figura 5.

El medio de incubación que contiene H1 aparentemente se aclaró de moléculas H1 antibióticamente activas incubando el medio con células de *E. coli*. Los resultados de los experimentos descritos en este Ejemplo indican que la histona H1 se une específicamente a las bacterias de una manera no reversible. Estos resultados sugieren que la actividad

antibiótica de H1 es un mecanismo selectivo, diana específico, que depende de la presencia de un ligando de H1 en la superficie de bacterias susceptibles.

Ejemplo 14

Efecto de la histona H1 en la integridad de la membrana bacteriana

5 La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen en presencia de diversas concentraciones de histona H1 a 37 °C. El daño de la membrana de las células de *E. coli* se determinó a varios intervalos de tiempo, utilizando el colorante Sytox verde y un citómetro de flujo como se describe (Roth et al., 1997, Appl. Env. Microbiol. 63:2421-2431).

10 Como se indica por los datos presentados en la figura 7, la fracción de las células que mostraba daño de la membrana era dependiente de la concentración de histona H1 presente en el medio.

Los resultados de los experimentos presentados en este Ejemplo, indican que la interrupción de la integridad de la membrana se asocia con la actividad antibiótica de H1, lo que sugiere que los efectos de alteración de la membrana de H1 pueden ser responsables de los efectos bactericidas de la histona H1.

Ejemplo 15

15 Efectos de mejora bactericida de la histona H1

La histona H1 bovina purificada se preparó como se describe en este documento en el Ejemplo 1. Las células de *E. coli* cepa AB1157 se incubaron en solución reguladora de Sorensen a 37 °C, durante diez minutos con histona H1, lisozima, y una combinación de histona H1 y lisozima. La supervivencia fraccionada de estas células se determinó como se describe en el Ejemplo 4.

20 Como se indica en la figura 8, la lisozima esencialmente no mostró ninguna actividad antibiótica cuando se incubó sin histona H1. La coincubación con la histona H1 aumentó la actividad antibiótica atribuible a la lisozima. Estos resultados sugieren que la histona H1 mejora el efecto bactericida de los compuestos con los cuales esta se coincuba o coadministra.

Resistencia contra la histona H1

25 Los antibióticos de la técnica anterior inhiben el crecimiento de microorganismos o causan la muerte de los microorganismos al interferir directamente con alguna ruta bioquímica esencial del metabolismo bacteriano. Los antibióticos más conocidos interfieren con alta especificidad con las etapas individuales de las rutas bioquímicas, y conducen a defectos específicos, la mayoría del metabolismo central implicado en la síntesis de moléculas precursoras de macromoléculas celulares, por ejemplo, la síntesis de peptidoglicano, la síntesis de los lípidos de membrana, la biosíntesis de aminoácidos, la transcripción, la traducción y la replicación del ADN. En la técnica anterior, se han determinado los mecanismos de acción de un gran número de antibióticos al nivel molecular. En estos estudios, el fenómeno de la resistencia espontánea ha sido de gran ventaja. Por lo tanto, se ha observado a menudo, que la resistencia contra un antibiótico es un resultado de una única mutación en una enzima individual de una vía metabólica. De esta manera, en la mayoría de los casos, se ha hecho posible indicar una enzima individual de una ruta bioquímica, que se inhibe específicamente por un antibiótico dado, y, además, para indicar qué parte de la enzima tiene que ser alterada estructuralmente por mutaciones, con el fin de conferir resistencia contra el antibiótico.

30 Los antibióticos de la técnica anterior interfieren con alta especificidad con la actividad de las enzimas individuales de metabolismo bacteriano y, por lo tanto, una causa común de la resistencia es a menudo una alteración estructural de la enzima diana, que se inhibe específicamente por un antibiótico. Otros mecanismos comunes de resistencia bacteriana contra los antibióticos se incrementan las concentraciones celulares de la enzima diana sensible y la disminución de la absorción o el aumento del flujo de salida del antibiótico de la célula por una serie de mecanismos. Todos los mecanismos de resistencia bacteriana contra los antibióticos antes mencionados de la técnica anterior se basan en un principio común, a saber, en la interferencia con la interacción altamente específica de un antibiótico dado con su diana celular. Así, la resistencia a los antibióticos de la técnica anterior, por ejemplo, por los mecanismos de resistencia específicos descritos anteriormente, puede ser fácilmente adquirida por bacterias, al interferir de algún modo con la interacción específica entre un antibiótico y su diana celular. Como se describió anteriormente, las bacterias pueden adquirir una variedad de mecanismos de resistencia simples pero eficaces contra los antibióticos altamente específicos de la técnica anterior por mutaciones espontáneas en genes individuales.

45 El mecanismo de acción antibiótica de la histona H1 es distinto de los mecanismos de acción de los antibióticos de la técnica anterior, en los que H1 interactúa con la membrana bacteriana, y los cambios o alteraciones de la estructura de la membrana nativa, causando con ello la lisis celular y la muerte de la bacteria. La actividad antibiótica de la histona H1, por lo tanto, es el resultado de la capacidad de la histona H1 para interactuar con las membranas biológicas y para interrumpir su estructura nativa. La capacidad de la histona H1 para interactuar con y romper las membranas celulares

no es específica para las membranas bacterianas, pero también se observa con las membranas eucariotas y arqueas, y se puede utilizar, por ejemplo, en la terapia de tumores humanos. Sin embargo, como se describe en este documento, hay un aumento notablemente de la sensibilidad de las membranas bacterianas para histona H1 en comparación con las membranas eucarióticas, tales como las membranas celulares de los hongos o células humanas. Esto permite utilizar la histona H1 como un antibiótico dentro del cuerpo humano.

Las bacterias no pueden adquirir fácilmente resistencia contra la histona H1, porque la histona H1 interactúa con la membrana bacteriana como tal, en lugar de con una sola proteína celular específica. Por lo tanto, las mutaciones en los genes individuales no pueden llevar a la resistencia bacteriana contra la histona H1. Las bacterias tendrían que cambiar la estructura de sus membranas considerablemente, con el fin de llegar a ser tolerantes contra las propiedades generales que dañan la membrana de la histona H1. Por lo tanto, la resistencia contra la histona H1 no puede ser adquirida por las bacterias tan rápidamente como con los antibióticos de la técnica anterior, y es menos probable que ocurra. Los cambios en la estructura general de la membrana bacteriana que podrían conferir resistencia contra la histona H1 requeriría una variedad de mutaciones en diferentes genes, mientras que la resistencia contra los antibióticos de la técnica anterior a menudo resulta de mutaciones individuales. Además, los cambios en la estructura general de la membrana celular son más propensos a interferir con algunos de la multitud de funciones de la membrana bacteriana y para ser perjudiciales para el crecimiento o la supervivencia de la célula completa.

La resistencia contra la acción antibiótica de la histona H1 puede ser menos fácilmente adquirida por las bacterias que la resistencia contra los antibióticos de la técnica anterior. Por lo tanto, la histona H1 se puede utilizar para el tratamiento de infecciones con cepas bacterianas multirresistentes. La histona H1 puede además ser utilizada en situaciones donde los antibióticos no deben ser utilizados con el fin de evitar el desarrollo de cepas bacterianas resistentes, tales como en la cría de animales, en la producción y conservación de los alimentos, en productos de cuidado personal, etc.

Como se revela en este documento, la histona H1 puede además ser utilizado en combinación con otros compuestos bactericidas, debido a su mecanismo de acción diferente. Con gran ventaja, la histona H1 se puede utilizar en combinación con agentes bactericidas, tales como lisozima, que interrumpen la capa de peptidoglicano de bacterias gram positivas, y hacen que la membrana bacteriana sea accesible a la histona H1.

Interacción de la histona H1 con heparina

Como se mencionó anteriormente, la histona H1 tiene una capacidad general para unirse a e interrumpir la estructura de las membranas biológicas. Sin embargo, como se revela en este documento, las células bacterianas difieren en gran medida a partir de células eucariotas, por ejemplo, células fúngicas y humanas, en su sensibilidad frente a la histona H1. Las concentraciones tóxicas de la histona H1 para las bacterias se revelan en este documento, que son considerablemente más bajas que para los hongos y, en particular, son considerablemente más bajas que para las células humanas. Por lo tanto, la histona H1 se puede aplicar a los pacientes, por ejemplo, para el tratamiento de infecciones bacterianas, sin ningún riesgo para el paciente. Sin embargo, para los pacientes sensibles y para las situaciones difíciles, la presente invención proporciona un antídoto contra la histona H1, que fácilmente se puede administrar al paciente para unirse específicamente e inactivar así a la histona H1.

De acuerdo con una realización adicional de la invención, la heparina se provee como un antídoto contra la histona H1. La heparina es un compuesto farmacéutico que se ha utilizado durante muchos años con el fin de prevenir la coagulación de la sangre, por ejemplo, durante o después de la cirugía. El uso de heparina como un antídoto contra la histona H1 es una nueva aplicación de la invención de la heparina. Las composiciones farmacéuticas, que se pueden administrar a un paciente sin riesgo para la nueva aplicación de acuerdo con la invención de heparina mencionada anteriormente se pueden tomar de la técnica anterior. En particular, la incorporación guardada de heparina en infusiones y las dosis no tóxicas de heparina que se pueden administrar a un paciente, son conocidas en la técnica anterior.

La heparina se une específicamente a e inactiva la histona H1. Esto es al menos en parte debido al hecho de que la heparina es un polianión y por lo tanto interactúa fácilmente con la histona H1, que lleva múltiples cargas positivas. Por lo tanto, otros antídotos de la invención contra la histona H1 son los polianiones solubles que se unen a la histona H1 y se puede administrar a un paciente sin riesgo, y en particular, cualquiera de los polianiones solubles que se pueden incorporar en una solución de infusión.

De acuerdo con aún otra realización de la invención, la histona H1 se puede utilizar como antídoto contra la heparina. La heparina se utiliza con frecuencia durante o después de la cirugía para prevenir la coagulación de la sangre. En particular, durante la cirugía cardíaca, los pacientes se inyectan grandes cantidades de heparina, con el fin de prevenir la coagulación de la sangre. Después de la cirugía, la heparina se elimina de manera rutinaria, en muchos casos por inyecciones de protamina. La protamina es similar a la histona H1, debido a su alto contenido de aminoácidos básicos cargados positivamente. Aunque las funciones fisiológicas de protamina y la histona H1 son diferentes, la histona H1 se puede utilizar terapéuticamente en lugar de protamina para la eliminación de la heparina no deseada. Por lo tanto, la invención proporciona la histona H1 como antídoto contra la heparina, en particular, pero no limitándose a, para la unión y la inactivación de la heparina no deseada después del tratamiento quirúrgico, en particular después de la cirugía del corazón.

Incorporación de la histona H1 en materiales estériles

En realizaciones adicionales de la invención, la histona H1 se incorpora en materiales estériles. En estas realizaciones, la histona H1 está vinculada a la superficie de los artículos estériles o se libera de forma continua desde artículos estériles, tales como implantes quirúrgicos, catéteres a largo plazo, tiritas o envolturas de polímeros sintéticos para alimentos perecederos.

En implantes quirúrgicos, tales como, por ejemplo, cirugía de reemplazo de cadera, existe un riesgo a largo plazo de las infecciones recurrentes en el lugar del implante. Se ha observado, que las infecciones bacterianas en el sitio del implante pueden ocurrir hasta varios años después del implante exitoso. Se cree generalmente, que en estos casos las bacterias se introducen en el sitio del implante junto con el implante o en la superficie del implante. Por razones desconocidas, las bacterias permanecen en un estado inactivo o permanecen bajo el control de la defensa inmune innata durante hasta varios años. En una etapa posterior, sin embargo, las bacterias que descansan pueden llegar a ser activadas y comienzan a proliferar, causando una infección en el sitio del implante.

En los casos de infecciones locales en los sitios del implante descritos anteriormente, las bacterias patógenas se introducen en el sitio del implante en la superficie de un implante que no fue esterilizado adecuadamente, o se introduzca la herida durante la cirugía por la contaminación de los alrededores. Por lo tanto, es necesaria una acción bactericida adicional en el sitio del implante, además de la esterilización del implante, con el fin de evitar las infecciones descritas anteriormente. De acuerdo con una realización de la invención, la histona H1 está vinculada a la superficie de un implante o está contenida en y se libera de un implante. La histona H1, por lo tanto, está presente en el sitio del implante e inhibe el crecimiento bacteriano en el sitio del implante durante y después de la cirugía. De acuerdo con la invención, la histona H1 que está vinculada a la superficie de un implante o está contenida en y se libera de un implante, media la protección a largo plazo contra la supervivencia, la activación y la proliferación de bacterias que se han introducido sin querer en el sitio del implante.

De acuerdo con la invención, la histona H1 se incorpora a un implante quirúrgico, y por lo tanto está presente en la superficie del implante o se libera desde el implante durante y/o después de la cirugía. Por lo tanto, la histona H1 confiere protección antimicrobiana frente a la proliferación de bacterias no deseadas en el sitio del implante. Una ventaja importante de la incorporación de la histona H1 como agente bactericida en un implante es, además, que la histona H1 es sólo débilmente inmunogénica y no conduce a respuestas inmunes no deseadas en el sitio del implante.

En una primera realización de la invención para la incorporación de la histona H1 en materiales estériles, las superficies de los implantes de titanio se recubren con la histona H1. La superficie de los implantes de titanio se puede recubrir fácilmente con histona H1 cargada positivamente. Debido a su potencial de oxidación, la superficie de titanio siempre está cubierta por una capa fina y fuertemente adherente de óxido de titanio. En una primera etapa, la capa de óxido es tratada por procedimientos químicos de la técnica anterior, con el fin de contener grupos hidroxilo o grupos aniónicos de oxígeno, que se unen fácilmente con histona H1 cargada positivamente por interacción electrostática. En una segunda etapa, el implante de titanio que contiene cargas negativas en su superficie se pone en contacto con la histona H1 cargada positivamente, que se adhiere fácilmente por interacción electrostática a la superficie del implante de titanio.

En una primera realización preferida, el implante de titanio en una primera etapa es tratado químicamente con un procedimiento, seleccionado del grupo incluyendo, pero no limitando a, los procedimientos de la técnica anterior, para obtener una superficie cargada negativamente del implante de titanio. En una segunda etapa, el implante se esteriliza con los métodos de la técnica anterior, por ejemplo, por la exposición al calor, y en una tercera etapa, el implante se pone en contacto con la histona H1 en forma estéril, por ejemplo, como polvo estéril, o solución tan estéril, para permitir la interacción electrostática entre la superficie cargada negativamente del implante de titanio y la histona H1 cargada positivamente. Si se utiliza un polvo estéril de la histona H1, el recubrimiento del implante de titanio con la histona H1 y el embalaje del implante se pueden llevar a cabo en una sola etapa en condiciones estériles. Si se utiliza una solución estéril de la histona H1, se requiere una etapa adicional de secado y envasado del implante de titanio recubierto con la histona H1 en condiciones estériles. El implante recubierto con histona H1-empacado puede además ser esterilizado de nuevo con óxido de etileno, radiación tal como radiación γ o cualquier otro método de esterilización, diferente del calor, que no desnaturalice la conformación nativa biológicamente activa de la histona H1.

En una segunda realización preferida, el implante de titanio es en una primera etapa tratado químicamente con un procedimiento, seleccionado del grupo incluyendo, pero no limitando a, los procedimientos de la técnica anterior, para obtener una superficie cargada negativamente del implante. En una segunda etapa, el implante de titanio se pone en contacto con la histona H1, por ejemplo, con una solución de histona H1 o un polvo que contiene la histona H1, para permitir la interacción electrostática entre la superficie cargada negativamente del implante de titanio y la histona H1 cargada positivamente. En una tercera etapa, el implante de titanio recubierto con histona H1 se seca, si es necesario, y se empaca. En una cuarta etapa, el implante recubierto con histona H1-empacado se esteriliza con óxido de etileno, radiación tal como radiación γ o cualquier otro método de esterilización, diferente de calor, que no desnaturalice la conformación nativa biológicamente activa de la histona H1 ionizante.

De acuerdo con aún otra realización de la invención, la histona H1 se adhiere a la superficie de un implante de titanio, o un implante de cualquier otro material utilizado para los implantes quirúrgicos, por ejemplo, un implante de carbono en la cirugía dental, por un método, incluyendo una primera etapa de fijar grupos de acoplamiento elegidos que se unen a la histona H1, por ejemplo, por electrostática o por unión covalente, a la superficie del implante, en donde dichos grupos de acoplamiento se seleccionan del grupo que incluye, pero no se limita a grupos de acoplamiento de la técnica anterior capaces de unirse a la histona H1, una segunda etapa de unir la histona H1 al implante, en donde la histona H1 se une a los grupos de acoplamiento en la superficie del implante, y una tercera etapa, en donde el implante recubierto con histona H1 se empaca. En una cuarta etapa, el implante empacado se esteriliza con óxido de etileno, radiación tal como radiación γ o cualquier otro método de esterilización, diferente de calor, que no desnaturalice la conformación nativa biológicamente activa de la histona H1.

En aún otra realización de la invención, el implante, en la superficie de la cual, se han fijado los grupos de acoplamiento en una primera etapa como se describió anteriormente, se esteriliza con un método elegido que no inactive los grupos de acoplamiento sobre el implante y no interfiera con la posterior unión de la histona H1 a dichos grupos de acoplamiento. En una etapa adicional, el implante se pone en contacto con la histona H1 en forma estéril, por ejemplo, como polvo estéril, o en solución estéril, para permitir la unión de la histona H1 a los grupos de acoplamiento en la superficie del implante, por ejemplo, por electrostática o mediante la unión covalente. Si se utiliza un polvo estéril de la histona H1, el recubrimiento del implante de titanio con la histona H1 y el embalaje del implante se puede ejecutar en una sola etapa en condiciones estériles. Si se utiliza una solución estéril de la histona H1, se requiere una etapa adicional de secado y envasado de la histona H1 cubiertas del implante de titanio en condiciones estériles. El implante recubierto con histona H1-empacado de nuevo puede ser esterilizado con óxido de etileno, radiación tal como radiación γ o cualquier otro método de esterilización, diferente de calor, que no desnaturalice la conformación nativa biológicamente activa de la histona H1 ionizante.

De acuerdo con una realización preferida, todos los métodos descritos anteriormente para el recubrimiento de la superficie de un implante con la histona H1 se pueden modificar, con el fin de recubrir solamente al menos una parte elegida de la superficie de un implante.

De acuerdo con aún otra realización de la invención, la superficie o cualquier parte elegida de la superficie de un implante se recubre con una capa que contiene histona H1, que libera la histona H1 dentro del sitio de trasplante de una manera continua durante un período elegido de tiempo. La liberación continua de la histona H1 de la capa de superficie que contiene la histona H1 confiere protección continua contra el crecimiento bacteriano no deseado durante un período prolongado de tiempo. Además, la cantidad de histona H1 liberada en un período de tiempo dado y por lo tanto la concentración de histona H1 libre en la superficie del implante pueden ser elegidos, de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, se forma la capa que contiene la histona H1 en la superficie del implante de una matriz de polímero que contiene la histona H1, en donde la matriz de polímero puede absorber agua y/o es biodegradable. La histona H1 se libera de la capa que contiene la histona H1 por difusión desde la matriz de polímero y/o por la degradación de la matriz de polímero. La matriz de polímero de la capa que contiene la histona H1 de los implantes de la invención es biocompatible y no es tóxica. La matriz de polímero es libre de pirógenos, y no causa irritación o inflamación de los tejidos en el sitio del implante. Además, la matriz de polímero es inmunológicamente inerte, i.e., que no conduce a una activación y/o la respuesta del sistema inmune específico o inespecífico.

La matriz de polímero de la capa que contiene histona H1 de los implantes de la invención se elige del grupo que incluye, pero no se limita a los polímeros biocompatibles y biodegradables y/o hidratables que se conocen o se desarrollan continuamente en los campos de galénica o farmacología para la liberación continua de compuestos farmacéuticos dentro del cuerpo, en particular para la liberación a largo plazo de los compuestos farmacéuticos de dispositivos de almacenamiento implantados. Tales dispositivos de almacenamiento son especialmente conocidos por o se desarrollan de forma continua para la anticoncepción, o en el tratamiento de la diabetes u otras enfermedades crónicas. En una realización preferida, la matriz de polímero de la capa que contiene histona H1 de los implantes de la invención se elige entre los polímeros que están adaptados para contener y/o liberar las moléculas cargadas positivamente y, en particular proteínas cargadas positivamente, tales como histona H1.

En otra realización preferida de la invención, se proveen catéteres a largo plazo que medien la protección contra la infección bacteriana por la acción bactericida de la histona H1. Los catéteres a largo plazo, como se utilizan, por ejemplo, para la cirugía de bypass, vías i.v., bombas i.v. o catéteres urinarios a menudo tienen que ser retirados del paciente debido a infecciones locales. Las infecciones por bacterias u hongos que entran en el cuerpo a lo largo de la superficie de los catéteres o se introducen en la superficie de los catéteres son muy frecuentes con catéteres a largo plazo y son un problema grave que conduce a la irritación local, daño o destrucción de tejido, causando continuo sufrimiento de los pacientes con catéteres a largo plazo y, además, puede llevar a una infección sistémica. En la técnica anterior, los problemas higiénicos anteriormente mencionados con catéteres urinarios y sanguíneos son un problema no resuelto.

En la invención, se proveen catéteres de cualquier forma y para cada aplicación que contienen la histona H1 en su superficie o liberan la histona H1 continua durante un período de tiempo elegido y por lo tanto confieren protección

contra la infección bacteriana. Los catéteres de la invención se eligen del grupo que contiene, pero no se limita a los catéteres de sangre, por ejemplo, tal como se utilizan para la cirugía de bypass, vías i.v., bombas i.v., y catéteres urinarios.

- 5 En una primera realización, los catéteres de la invención están hechos de los materiales para catéteres de la técnica anterior y se recubren con la histona H1 por lo menos en su superficie exterior. El recubrimiento de catéteres con la histona H1 puede ser ejecutado poniendo en contacto los catéteres preformados con la histona H1 en solución o en forma de polvo, en donde la histona H1 es adsorbida espontáneamente a la superficie sin cambios del catéter. Los catéteres recubiertos se empaquetan y esterilizan con cualquier método para esterilizar, que no interrumpa de forma irreversible la conformación biológicamente activa de la histona H1.
- 10 De acuerdo con una realización preferida, el recubrimiento de los catéteres puede ser mejorado por un producto químico, físico-químico, o un tratamiento de radiación eléctrica de los catéteres que confiere cargas negativas a la superficie de los catéteres. De acuerdo con otra realización preferida, los grupos de acoplamiento para la histona H1 se fijan a al menos la superficie exterior de los catéteres de la invención y la histona H1 está unida por interacciones electrostáticas y/o covalentes a por lo menos la superficie exterior de los catéteres. De acuerdo con otra realización
- 15 preferida, los catéteres están formados de o contienen en al menos un segmento elegido un material que se une con alta afinidad a la histona H1. Dicho material se elige del grupo que incluye, pero no se limita a, polímeros y polímeros cargados negativamente con grupos de acoplamiento que interactúan por interacción electrostática o covalente con la histona H1. De acuerdo con la invención, la histona H1 puede ser liberada de los catéteres recubiertos o permanecer fijos en la superficie de los catéteres recubiertos.
- 20 De acuerdo con aún otra realización preferida, los catéteres de la invención contienen una capa superficial de una matriz de polímero, que contiene la histona H1, en donde la matriz de polímero puede absorber agua y/o es biodegradable. La histona H1 se libera de la capa que contiene la histona H1 por difusión desde la matriz de polímero y/o por la degradación de la matriz de polímero. La matriz de polímero de la capa que contiene la histona H1 de los catéteres de la invención es biocompatible y no es tóxica, es libre de pirógenos, y no causa irritación o inflamación de
- 25 los tejidos, que entran en contacto con el catéter. Además, la matriz de polímero es inmunológicamente inerte, i.e., que no conduce a una activación y/o la respuesta del sistema inmune específico o inespecífico. La matriz de polímero de la capa que contiene histona H1 de los catéteres de la invención se elige del grupo que incluye, pero no se limita a los polímeros biocompatibles y biodegradables y/o hidratables que se sabe o se desarrollan continuamente en los campos de la galénica o farmacología para la liberación continua de compuestos farmacéuticos dentro del cuerpo, en particular para la liberación a largo plazo de los compuestos farmacéuticos de dispositivos de almacenamiento implantados. Tales dispositivos de almacenamiento son especialmente conocidos por o se desarrollan de forma continua para la anticoncepción, o en el tratamiento de la diabetes u otras enfermedades crónicas. En una realización preferida, la matriz de polímero de la capa que contiene histona H1 de los catéteres de la invención se elige entre los polímeros que están adaptados para contener y/o liberar las moléculas cargadas positivamente y, en particular proteínas cargadas
- 30 positivamente, tales como histona H1.
- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proveen tiritas, apósitos médicos para heridas, emplastos, y toallas sanitarias y tampones vaginales para el tratamiento de infecciones con bacterias no deseadas que contienen histona H1. En esta realización, la histona H1 se puede aplicar con ventaja en forma de polvo o en cualquier forma de una impregnación que contiene la histona H1.
- 40 De acuerdo con aún otro aspecto de la invención, se proveen envolturas de polímeros sintéticos para el recubrimiento y la conservación de alimentos, que contienen la histona H1 e inhiben el crecimiento de microorganismos. Las envolturas de polímeros sintéticos de la invención se pueden utilizar con ventaja para el almacenamiento para guardar los alimentos perecederos, tal como por ejemplo queso, carne y pescado.
- 45 De acuerdo con una primera realización, la histona H1 está unida a las envolturas de polímeros sintéticos de la invención mediante interacción electrostática. En este caso, el polímero sintético contiene o es manipulado para contener cargas negativas y por lo tanto se une con histona H1 cargada positivamente. En una segunda realización, la histona H1 se une covalentemente a grupos de anclaje de al menos un polímero sintético o contenida en la formación de las envolturas de la invención. De acuerdo con la invención, la histona H1 puede estar vinculada a una o ambas de las superficies de la envoltura inventiva de polímero sintético. Las envolturas de la invención se forman de cualquier polímero sintético que se pueda unir o se puede hacer para unir la histona H1. En una realización adicional, las envolturas de polímeros sintéticos de la invención pueden en ambos o cualquiera de los lados contener al menos una
- 50 capa de una matriz de polímero que contiene la histona H1. En aún una realización adicional, la histona H1 puede ser liberada continuamente desde las envolturas de polímeros sintéticos y/o de alguna capa de una matriz de polímero sobre una superficie de dicha envoltura de polímeros sintéticos.

Reivindicaciones

1. La proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso en el tratamiento de una infección en un humano o animal con una bacteria seleccionada entre: *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus megaterium*; *Bacillus cereus*; y *Serratia marcescens*, bacterias que muestran resistencia contra conocidos antibióticos tales como penicilina, estreptomycin, eritromicina y vancomicina, en donde la proteína histona H1 eucariota purificada causa:
5
(i) muerte de la bacteria; o
(ii) inhibición del crecimiento de la bacteria.
2. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Escherichia coli*.
10
3. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Pseudomonas aeruginosa*.
4. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Bacillus subtilis*.
5. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Bacillus megaterium*.
15
6. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Bacillus cereus*.
7. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Serratia marcescens*.
20
8. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el tratamiento de infección por *Salmonella enteritidis*.
9. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína histona H1 se une covalentemente con polietilenglicol.
10. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además uno o más agentes activos farmacéuticamente seleccionados entre:
25
histonas seleccionadas del grupo que consiste en: H2A; H28; H3; H4; y H5, y
sustancias antibióticas seleccionadas del grupo que consiste en: penicilina; estreptomycin; vancomicina; bacitracina; polimixina; neomicina; cloranfenicol; clortetraciclina; ciprofloxacina; tobramicina; eritromicina; gentamicina; gramicidina; oxitetraciclina; norfloxacina; una sal de una de dichas sustancias antibióticas; y un éster de una de dichas sustancias antibióticas.
11. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo además la lisozima.
12. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la forma de un comprimido, una cápsula dura o blanda, un sello, un trocisco, un comprimido para deshacer en la boca, una formulación en polvo, una formulación en gránulos, una solución acuosa, una suspensión acuosa, una solución oleosa, una suspensión oleosa y una emulsión.
35
13. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se provee en la forma de una suspensión médica apropiada para inyección o infusión en un tejido humano o animal.
14. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho tejido es sangre.
40
15. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se provee en la forma de una composición incluida en un apósito para heridas.
16. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho apósito para heridas se selecciona del grupo que consiste en una crema, un gel, un material absorbente, y un material degradable fisiológicamente.
45

17. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se incorpora en y/o se utiliza para el recubrimiento de implantes quirúrgicos seleccionados del grupo que incluye vías intravenosas, bombas intravenosas y catéteres urinarios; tiritas, apósitos para heridas, emplastos, toallas sanitarias o tampones vaginales.
- 5 18. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la incorporación en y/o para el recubrimiento de un implante de titanio, en donde al menos una parte predeterminada de una superficie de dicho implante de titanio se modifica químicamente con el fin de contener grupos de acoplamiento cargados negativamente que se ponen en contacto con la proteína histona H1 eucariota.
- 10 19. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde dichos grupos de acoplamiento se unen covalentemente o se unen electrostáticamente a al menos una parte predeterminada de una superficie de un implante quirúrgico seleccionado del grupo que incluye vías intravenosas, bombas intravenosas y catéteres urinarios y tirita, yeso, apósito para heridas, toalla sanitaria o tampón vaginal.
- 15 20. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 19, en donde al menos una parte predeterminada de una superficie de un implante quirúrgico seleccionado del grupo que incluye vías intravenosas, bombas intravenosas y catéteres urinarios y tiritas, apósito para heridas, yeso, toalla sanitaria o tampón vaginal se recubre con una capa superficial, que comprende una composición que comprende la histona H1 eucariota y al menos un polímero sintético y/o al menos un polímero que contiene macromoléculas biológicas.
- 20 21. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una composición que comprende la histona H1 eucariota se incorpora en y/o se utiliza para el recubrimiento de al menos una superficie de una envoltura para el recubrimiento y la conservación de alimentos perecederos, que consta de al menos un polímero sintético y/o al menos un polímero que comprende macromoléculas biológicas.
- 25 22. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho envoltorio o al menos una superficie de dicho envoltorio que comprende macromoléculas biológicas como grupos de acoplamiento para unirse covalentemente o unirse electrostáticamente a la composición.
- 30 23. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en donde al menos una parte predeterminada de al menos una superficie de dicho envoltorio se recubre con una capa superficial que comprende la composición y al menos un polímero sintético que contiene macromoléculas biológicas.
- 35 24. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 23, en donde dicha capa superficial libera continuamente la histona H1 por difusión y/o por biodegradación de dicha capa superficial.
- 40 25. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que está incluida en un producto de cuidado personal seleccionados del grupo que consiste en una crema, una loción, un desodorante, una barra de labios, una pasta de dientes, un polvo dental, un hilo dental, un enjuague bucal, una toalla sanitaria, un tampón vaginal y una venda.
26. La histona H1 eucariota sustancialmente purificada para uso de acuerdo con una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en donde la histona H1 es la histona H1 subtipo cero.
27. El uso de la proteína histona H1 eucariota sustancialmente purificada para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un humano o animal con una bacteria seleccionada entre: *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella enteritidis*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus megaterium*; *Bacillus cereus*; y *Serratia marcescens*, bacteria que presenta resistencia contra conocidos antibióticos tales como penicilina, estreptomina, eritromicina y vancomicina, en donde la proteína histona H1 eucariota purificada causa:
- (i) muerte de la bacteria; o
- (ii) inhibición del crecimiento de la bacteria.

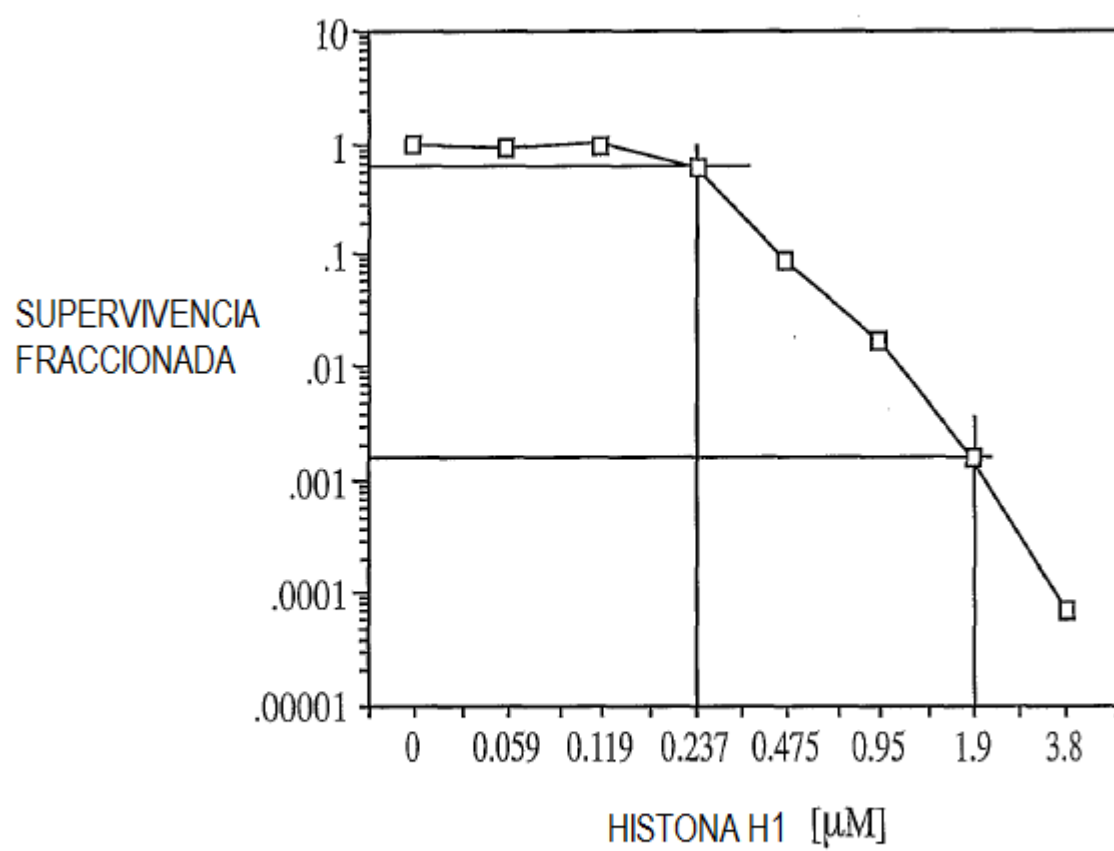


Fig. 1

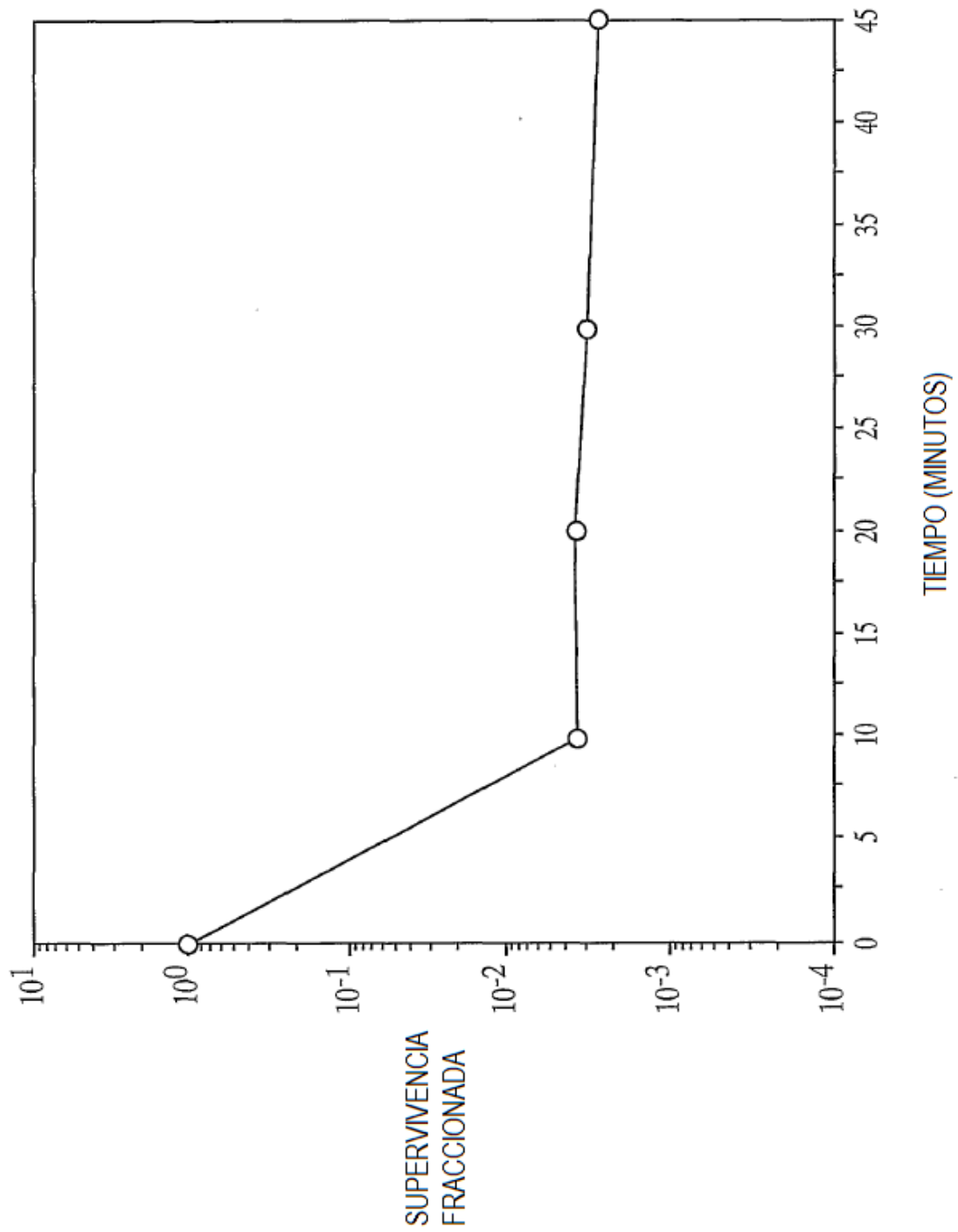


Fig. 2

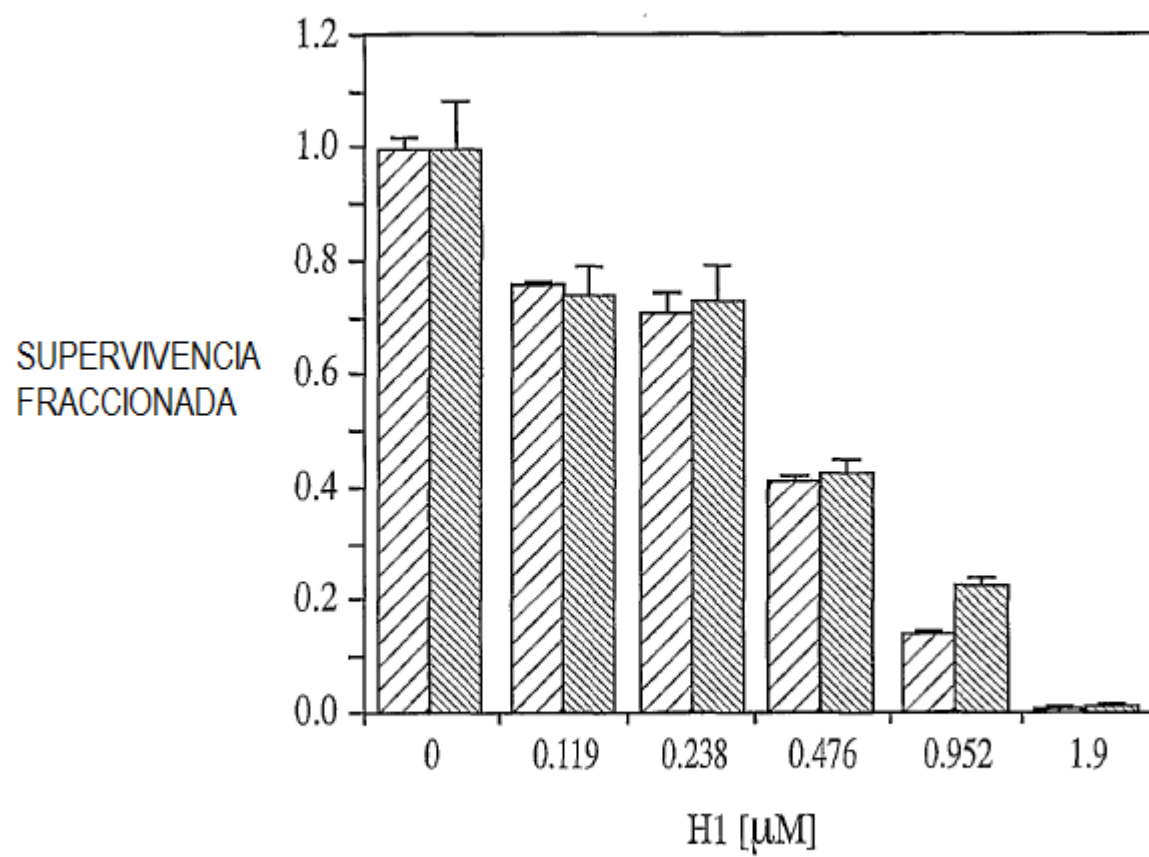


Fig. 3

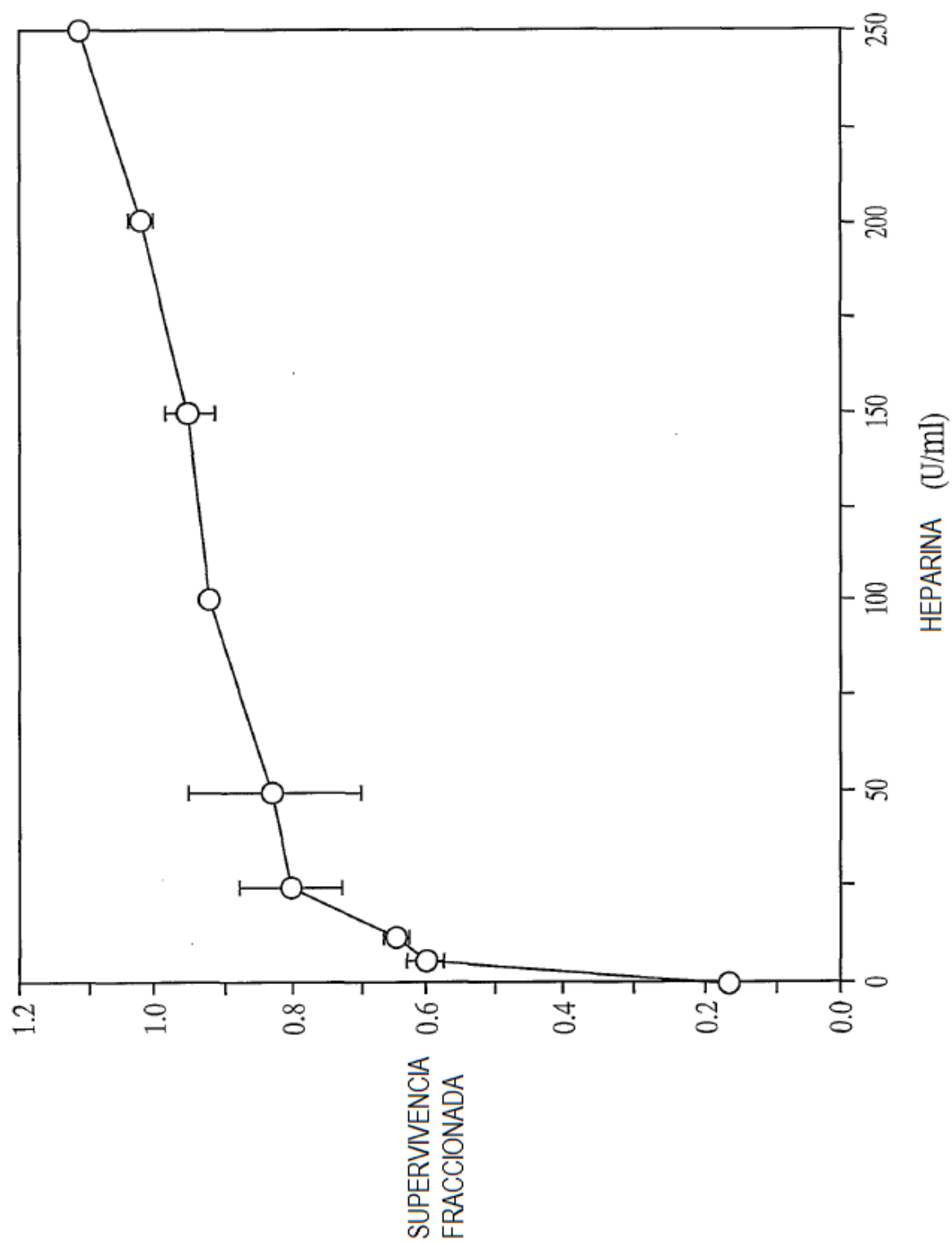


Fig. 4

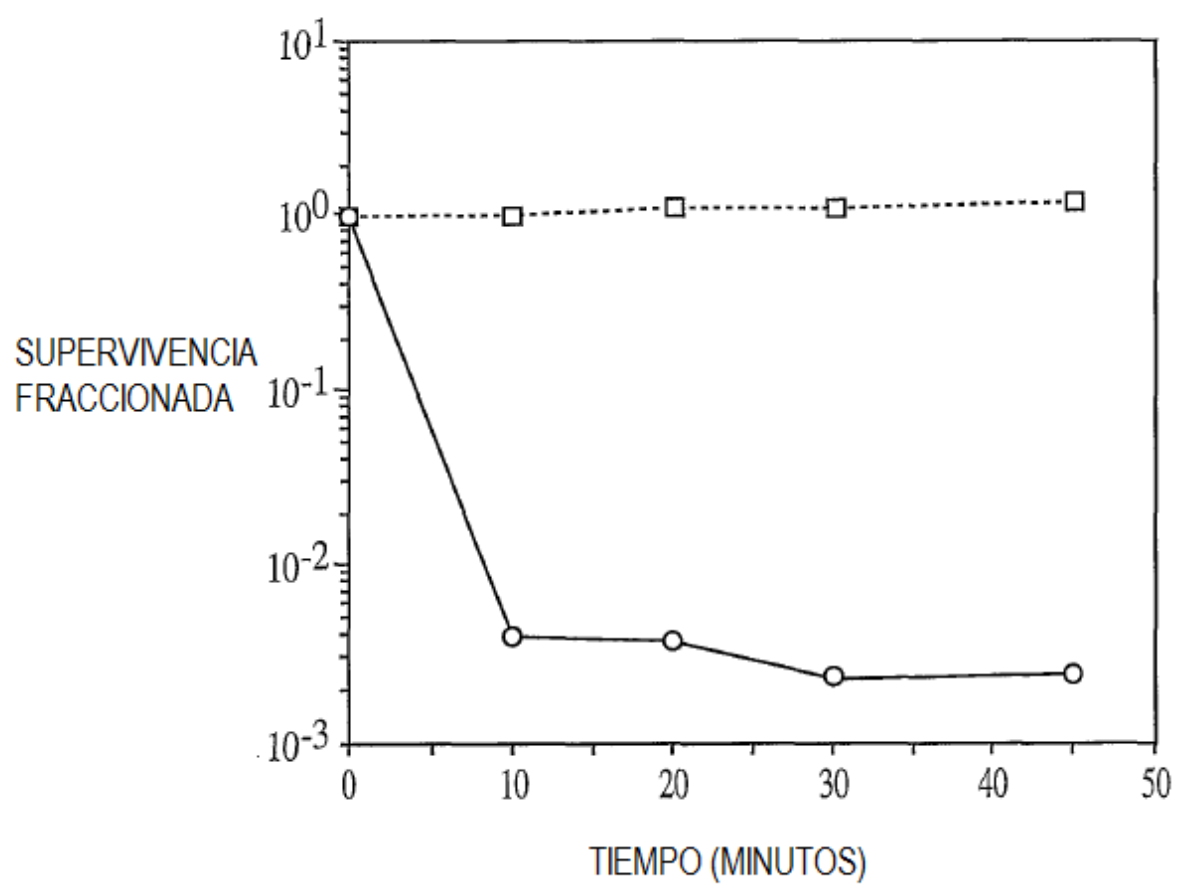


Fig. 5

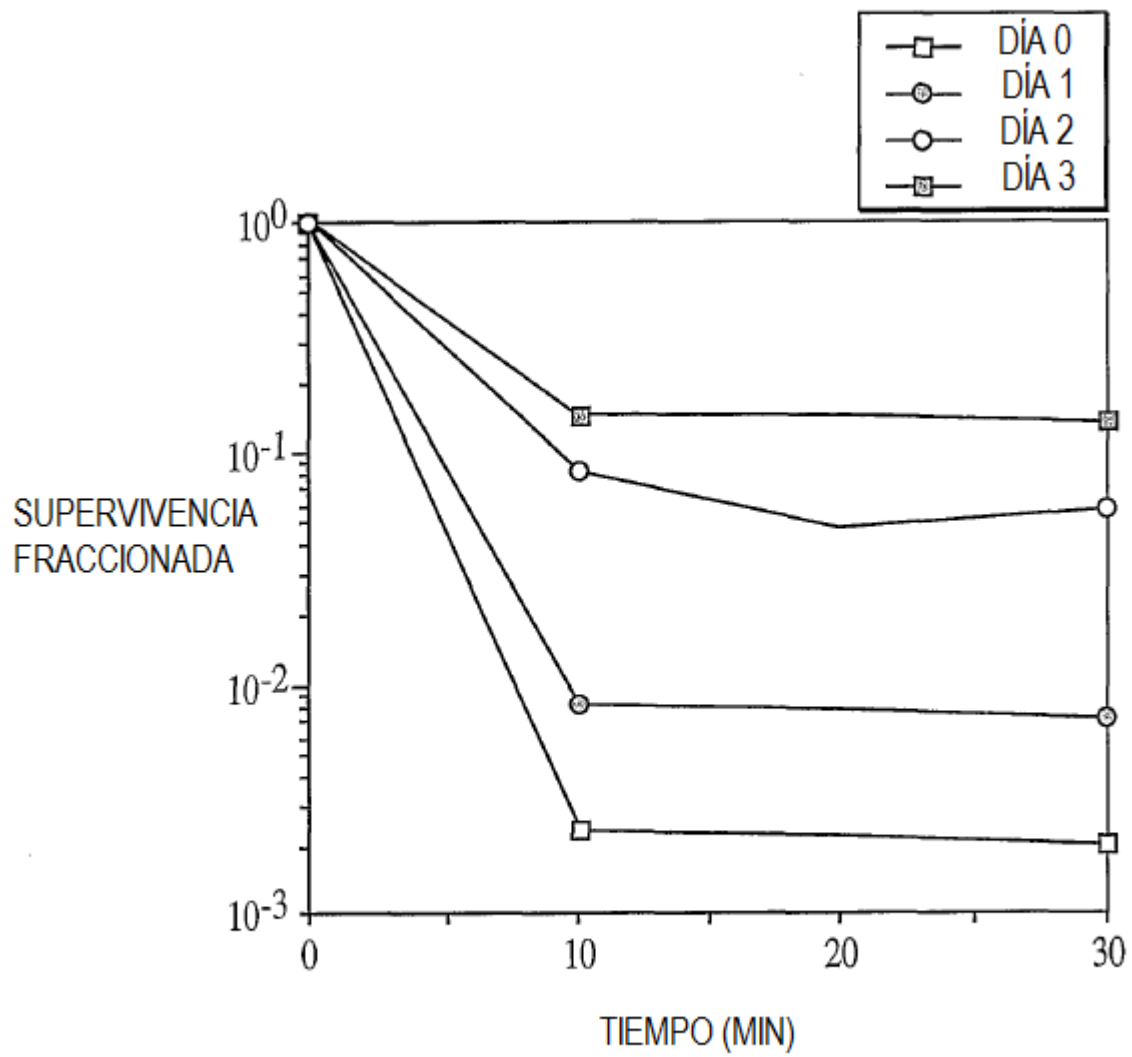


Fig. 6

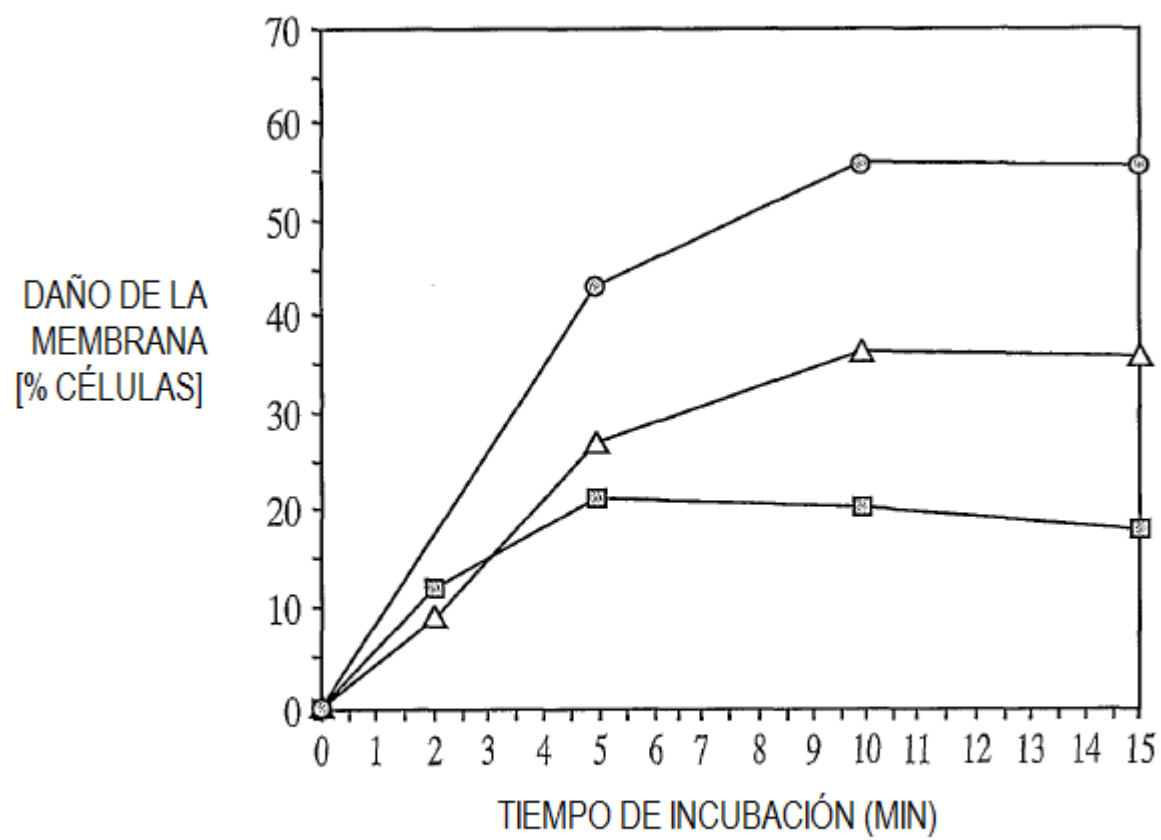


Fig. 7

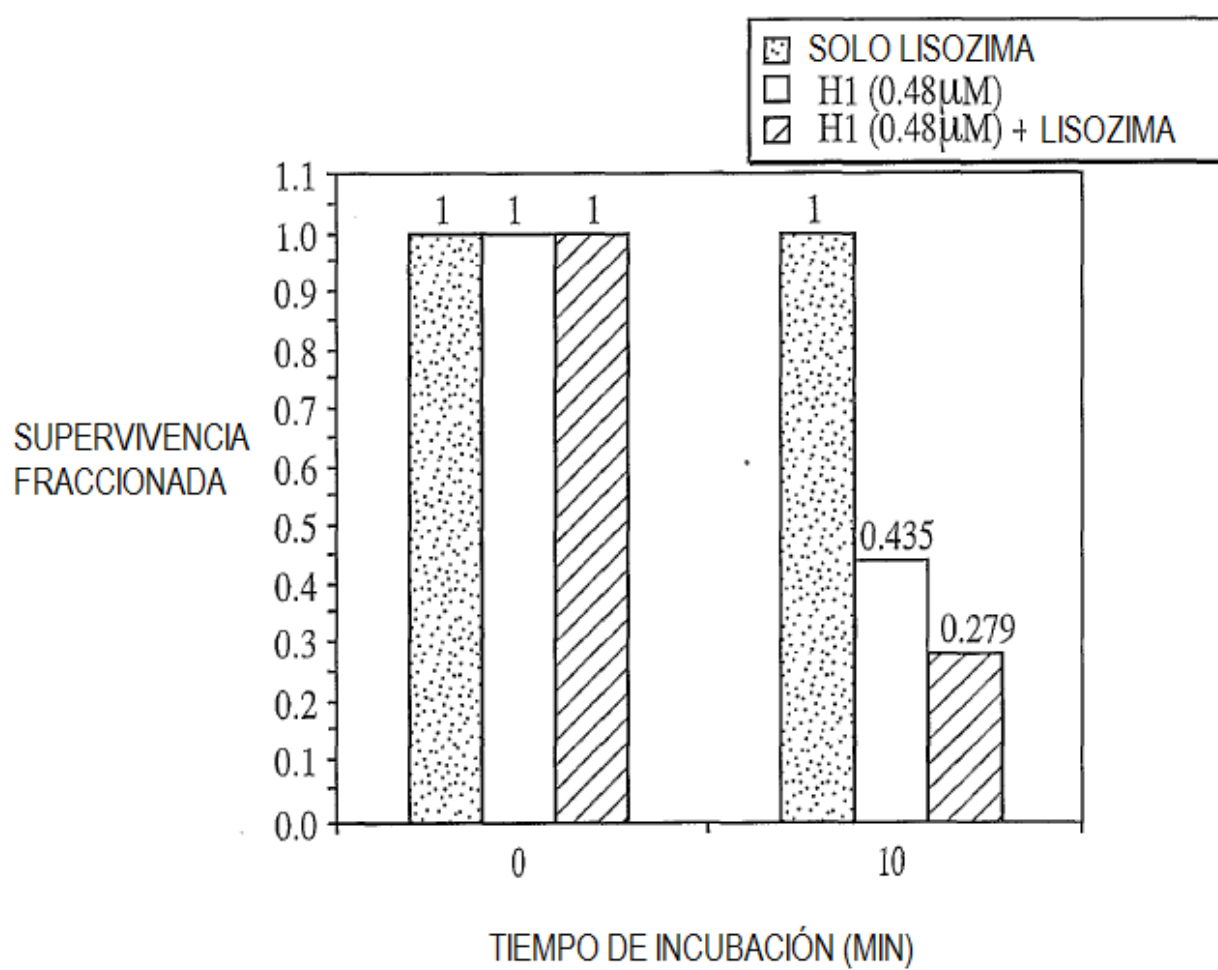


Fig. 8

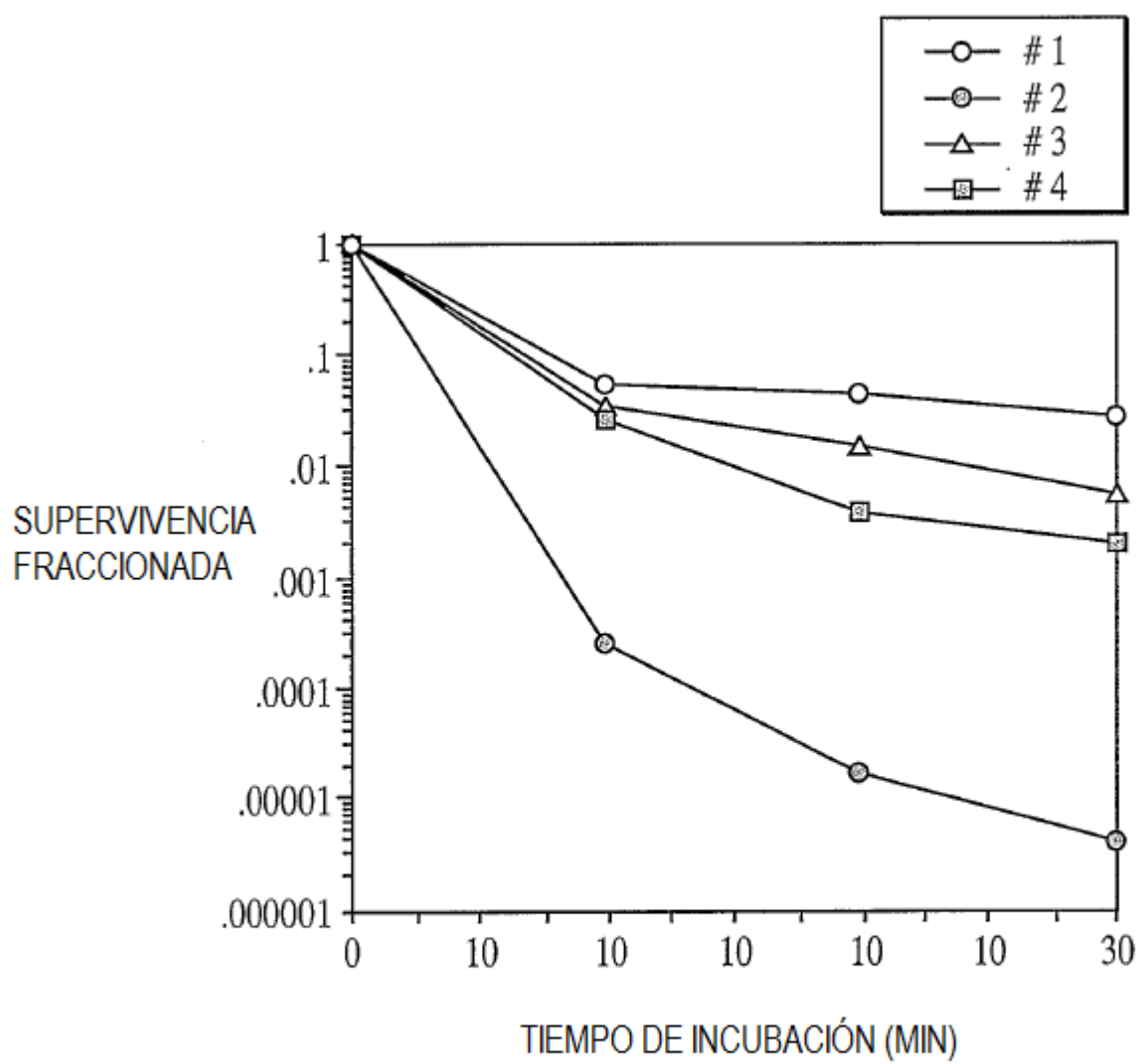


Fig. 9