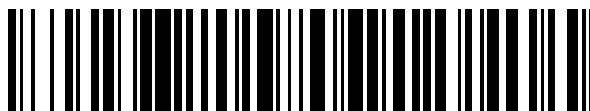


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 851**

51 Int. Cl.:

A61L 15/38 (2006.01)

A61L 15/46 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10718677 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2424578**

54 Título: **Tratamiento de infecciones de la superficie del cuerpo humano o animal**

30 Prioridad:

01.05.2009 GB 0907553

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

19.10.2016

73 Titular/es:

**INSENSE LIMITED (100.0%)
Colworth Science Park
Sharnbrook, Bedfordshire MK44 1LQ, GB**

72 Inventor/es:

**DAVIS, PAUL y
AUSTIN, ANDREW**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 586 851 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

Tratamiento de infecciones de la superficie del cuerpo humano o animal

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al tratamiento de infecciones de la superficie del cuerpo humano o animal, en particular una infección por hongos de una zona de las uñas humanas.

Antecedentes

10 Unas uñas sanas en un estado visiblemente bueno son aspectos importantes y altamente apreciados del aspecto humano. Con frecuencia, el aspecto, la fuerza y la salud de las uñas pueden verse afectados adversamente por la infección con células de hongos patógenos, típicamente del género *Trychophyton*, y existe una fuerte demanda de terapias que mejoran la apariencia de uñas afectadas por la eliminación de los hongos infestantes. Aunque existen numerosos remedios en el comercio, existe una insatisfacción generalizada con las tecnologías y los productos disponibles.

15 Agentes suministrados sistémicamente pueden alcanzar la zona de las uñas a través del torrente sanguíneo, pero una penetración deficiente en la zona de las uñas a partir de la circulación y efectos secundarios graves limitan la utilidad del enfoque.

Uñas infectadas por hongos a menudo se vuelven porosas o abiertas por la acción de los hongos invasores. Por lo tanto, a menudo la uña se co-coloniza con bacterias que pueden exacerbar los efectos dañinos de los hongos mediante la liberación de enzimas destructivas adicionales y toxinas activas a nivel local.

20 Es bien reconocido que incluso si una infección por hongos de las uñas es reducida por una terapia conocida, rara vez se elimina por completo y es habitual que las infecciones vuelvan poco después de interrumpir el tratamiento.

Sumario de la invención

Los autores de la invención han descubierto que los ingredientes activos no penetran fácilmente en la uña y, en todo caso, poco del material aplicado a la superficie superior llega a las estructuras subyacentes donde las células fúngicas pueden residir en relativa seguridad.

25 La invención se refiere a una combinación de un líquido acuoso y un apósito que comprende una fuente de peróxido de hidrógeno en el tratamiento de una infección por hongos en la superficie del cuerpo humano o animal, particular pero no exclusivamente una zona de las uñas humanas o animales.

30 Mediante la aplicación de un líquido acuoso a la superficie del cuerpo infectada, la superficie del cuerpo se ablanda y se hace más porosa. Por ejemplo, esto puede permitir que el líquido pase hacia el interior de la región de las uñas a través de la porosidad existente. Así, el líquido proporciona una trayectoria de flujo acuoso en el interior de la superficie del cuerpo, p. ej., la zona de las uñas.

35 La aplicación subsiguiente de un apósito que comprende una fuente de peróxido de hidrógeno da lugar así a la difusión eficaz del peróxido de hidrógeno a lo largo de la trayectoria del flujo acuoso generado en las partes interiores, menos accesibles de la superficie del cuerpo, p. ej., la zona de las uñas, permitiendo que el peróxido de hidrógeno penetre profundamente permitiendo una reducción significativa o eliminación de la infección, p. ej., infección por hongos en todos los componentes de, p. ej., la zona de las uñas.

40 Las uñas tienen una anatomía distintiva y la composición que debe ser apreciada al considerar nuevos enfoques para la terapia dirigida a la placa ungueal y al lecho ungueal subyacente, así como todas las estructuras asociadas. La parte más visible de una uña, la placa ungueal, consiste en una estructura queratinizada dura, formada a partir de células cornificadas muertas (corneocitos), que es empujada hacia arriba a partir de la matriz en la base de la uña. La mayor parte de la placa ungueal es semi-transparente, permitiendo que el color del suministro de sangre en la dermis sea transparente, dando un color rosáceo. La uña está por sí misma relativamente desprovista de humedad, pero, cuando se expone al agua, puede llegar a ser relativamente hidratada, suponiendo un estado ablandado y flexible.

45 La pared de la uña, un pliegue de la piel que solapa los lados de la uña, mantiene la placa ungueal en su lugar y protege sus bordes. La única parte viva que reproduce parte de la uña es la matriz ungueal, situada directamente por debajo de la cutícula. En este punto se forman nuevas células y continuamente empujan hacia delante a medida que maduran para producir la placa ungueal. La matriz también es suministrada con nervios, así como abundantes vasos sanguíneos para proporcionar las células con nutrientes y oxígeno.

50 La placa ungueal reposa sobre el lecho de la uña, que se continúa con la matriz. Ésta también es suministrada abundantemente con los vasos sanguíneos y los nervios. Su superficie se transforma en numerosas crestas paralelas que encajan exactamente con las crestas en la superficie inferior de la placa ungueal. La cutícula es la parte de la epidermis de la piel que se superpone a la uña. Protege a la matriz de bacterias invasoras y de daños

físicos.

Las células fúngicas pueden residir y crecer en cualquier parte de estas estructuras y es importante que cualquier tratamiento impregne todos los ámbitos con el fin de eliminar cualquier foco residual de infección, así como la eliminación de la infección en las principales zonas de la placa ungueal.

- 5 La expresión "zona de la uña" se define en esta memoria para comprender la placa ungueal, el lecho ungueal, la matriz ungueal, el pocillo ungueal y la cutícula.

En una realización preferida, el líquido acuoso comprende una enzima peroxidasa. La peroxidasa se difunde en el interior de la superficie del cuerpo, p. ej., la zona de la uña.

- 10 La enzima peroxidasa, una vez que ha penetrado en la zona interior de la superficie del cuerpo, p. ej., las uñas, permanece esencialmente inactiva hasta que el peróxido de hidrógeno se difunde a través de la vía acuosa desde el apósito. En presencia de peroxidasa se potencian los efectos oxidativos de peróxido de hidrógeno.

Así, se ha encontrado que la peroxidasa potencia sustancialmente la actividad, especialmente la actividad antifúngica, del peróxido de hidrógeno, ya que cataliza la oxidación de moléculas de hongos vulnerables pero esenciales sobre o en la membrana celular y/o citoplasma de las células fúngicas.

- 15 Se puede emplear cualquier peroxidasa adecuada, incluyendo lactoperoxidasa, peroxidasa de rábano picante, peroxidasa de yoduro, peroxidasa de cloruro y mieloperoxidasa. Sin embargo, se prefieren actualmente la lactoperoxidasa y la peroxidasa de rábano picante.

La concentración de enzima peroxidasa en el líquido acuoso está preferiblemente en el intervalo de 1 a 1000 µg/ml, preferiblemente de 50 a 1000 µg/ml, más preferiblemente de 100 a 500 µg/ml.

- 20 El líquido acuoso también comprende preferiblemente tensioactivos y/o disolventes, que se ha encontrado que potencian la penetración del líquido en la superficie del cuerpo, p. ej., las uñas.

El apósito está preferiblemente en una condición hidratada, con el fin de que el peróxido de hidrógeno pueda difundirse en la región de las uñas con eficacia una vez que se aplica el apósito. Se requiere suficiente agua en el apósito para formar una unión de contacto líquido entre la zona de la uña y el apósito.

- 25 Preferiblemente, la resistencia osmótica del líquido acuoso es la misma o similar a la del líquido en el apósito para potenciar los flujos de fluidos y solutos deseados.

El apósito dona preferiblemente agua a la zona de la uña en uso, lo cual se logra mediante la selección de propiedades osmóticas apropiadas de manera conocida.

- 30 El material del apósito puede ser en forma de hidrogel, una esponja, una espuma o alguna otra forma de matriz hidrófila que puede contener agua suficiente para permitir una vía de difusión controlada entre el apósito y la zona de la uña. Preferiblemente, el apósito contendrá solutos que sirven para regular el paso de peróxido de hidrógeno, p. ej., por enlaces de hidrógeno, que se puede conseguir por concentraciones apropiadas de polímeros, p. ej., polisacáridos, incluyendo glicosaminoglicanos.

- 35 El apósito puede comprender un apósito de algodón húmedo o puede incluir un material de mecha estructural con ingredientes húmedos. Preferiblemente, sin embargo, el apósito incluye uno o más geles a base de agua o acuosos, a los que también se alude como hidrogeles hidratados. Tales geles pueden formarse de una diversidad de materiales y pueden contener una diversidad de reactivos tal como se discutirá a continuación.

- 40 Típicamente, el apósito estará en forma de una hoja, capa o película. El apósito puede estar, alternativamente, en forma de un gel o loción amorfo, preferiblemente un hidrogel, no teniendo una forma o configuración fija, que puede ser deformado y conformado en tres dimensiones, incluyendo el ser exprimido a través de una boquilla. Geles amorfos no son típicamente reticulados o tiene niveles bajos de reticulación. Se puede utilizar un gel amorfo reductor de la cizalla. Un gel de este tipo es líquido cuando se somete a esfuerzo de cizalla (p. ej., cuando se vierte o se exprime a través de una boquilla) pero se endurece cuando es estático.

- 45 Hidrogeles hidratados adecuados se describen en el documento WO 03/090800. El hidrogel hidratado comprende convenientemente material polimérico hidrófilo. Materiales poliméricos hidrófilos adecuados incluyen poliácridatos y metacrilatos, p. ej., tal como se suministra por First Water Ltd en forma de hidrogeles laminares, incluyendo el ácido poli-2-acrilamido-2-metilpropano-sulfónico (poliAMPS) o sales de los mismos (p. ej., tal como se describe en el documento WO 01/96422), polisacáridos, p. ej., gomas de polisacáridos, particularmente goma de xantano (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Keltrol), diversos azúcares, ácidos policarboxílicos (p. ej., disponibles bajo la Marca Comercial Gantrez AN-169 BF de ISP Europe), poli (metil-vinil-éter co-anhídrido maleico) (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Gantrez AN 139, que tiene un peso molecular en el intervalo de 20.000 a 40.000), polivinilpirrolidona (p. ej., en forma de calidades disponibles comercialmente conocidas como PVP K-30 y K-90), poli(óxido de etileno) (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Polyox WSR-301), poli(alcohol vinílico) (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Elvanol), polímero poliacrílico reticulado (p. ej., disponible bajo la Marca

Comercial Carbopol EZ-1), celulosas y celulosas modificadas, incluyendo hidroxipropil-celulosa (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Klucel EEF), carboximetilcelulosa sódica (p. ej., disponible bajo la Marca Comercial Cellulose Gum 7LF) e hidroxietil-celulosa (p. ej., disponible de la Marca Registrada Natrosol 250 LR).

Mezclas de materiales polímeros hidrófilos pueden utilizarse en un gel.

- 5 En un hidrogel hidratado de material polimérico hidrófilo, el material polimérico hidrófilo está presente deseablemente en una concentración de al menos 0,1%, preferiblemente al menos 0,5%, preferiblemente al menos 1%, preferiblemente al menos 2%, más preferiblemente al menos 5%, aún más preferiblemente al menos 10%, o al menos 20%, deseablemente al menos 25% e incluso más deseablemente al menos 30% en peso, basado en el peso total del gel. Se pueden utilizar incluso mayores cantidades, hasta aproximadamente 40% en peso, basado en el peso total del gel.

Un hidrogel hidratado preferido comprende ácido poli-2-acrilamido-2-metilpropano-sulfónico (poli AMPS) o sales del mismo, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 20% en peso del peso total del gel.

La fuente de peróxido de hidrógeno puede comprender peróxido de hidrógeno *per se* o peróxido de hidrógeno en combinación con o formando complejo con otra entidad.

- 15 Alternativamente, la fuente de peróxido de hidrógeno puede ser un medio de generación de peróxido de hidrógeno.

En una realización preferida, la fuente de peróxido de hidrógeno es un medio de generación de peróxido de hidrógeno que comprende enzima oxidoreductasa, una fuente de oxígeno y una fuente de sustrato para la enzima. La enzima oxidoreductasa cataliza una reacción de un sustrato apropiado con oxígeno para producir peróxido de hidrógeno.

- 20 Enzimas oxidoreductasa adecuadas para uso en la invención y los sustratos correspondientes (que están presentes en la sangre y fluidos de tejidos) incluyen los siguientes:

<u>Enzima</u>	<u>Sustrato</u>
Glucosa oxidasa	β -D glucosa
Hexosa oxidasa	Hexosa
Colesterol oxidasa	Colesterol
Galactosa oxidasa	D-galactosa
Piranosas oxidasa	Piranosas
Colina oxidasa	Colina
Piruvato oxidasa	Piruvato
Glicolato oxidasa	Glicolato
Aminoácido oxidasa	Aminoácido

La enzima oxidoreductasa actualmente preferida es la glucosa oxidasa. Ésta cataliza la reacción del sustrato β -D glucosa para dar peróxido de hidrógeno y ácido glucónico.

- 25 Se puede utilizar una mezcla de enzimas oxidoreductasa.

La enzima oxidoreductasa y glucosa pueden ser íntimamente mezcladas opcionalmente junto con una fuente de oxígeno. El oxígeno puede ser proporcionado por cualquier donante de oxígeno conveniente, pero una fuente conveniente es el oxígeno atmosférico.

- 30 Cuando la fuente de oxígeno es oxígeno atmosférico, el apósito comprende preferiblemente primera y segunda capas discretas. La primera capa comprende la enzima oxidoreductasa y se encuentra en la vecindad de las partes exteriores del apósito, es decir, a distancia de la zona de la uña en uso, en donde los niveles de oxígeno atmosférico son los más altos. La segunda capa comprende la fuente de sustrato y se encuentra en las proximidades de las partes internas del apósito, es decir, adyacente a la zona de la uña, de modo que el peróxido de hidrogeno producido puede penetrar directamente en la zona de la uña.

Una forma preferida de la realización estratificada es en los casos en los que la primera y segunda capas incluyen hidrogeles hidratados reticulados. Los hidrogeles se pueden colar en torno a una estructura de refuerzo mecánica tal como una lámina de gasa de algodón o una malla flexible inerte, p. ej., para proporcionar una capa de hidrogel estructuralmente reforzada o plancha.

- 5 Alternativamente, la primera capa que contiene la enzima puede estar en estado seco, pero colocada en comunicación de fluido con la segunda capa durante el uso, resultando la migración de agua a la primera capa para hidratar la enzima.

- 10 En la realización estratificada es preferible que la primera capa sea relativamente fina, es decir, de 0,01 a 2,0 mm y que la segunda capa sea relativamente gruesa, es decir, de 0,5 a 5,0 mm. Si la primera capa es un hidrogel hidratado, entonces éste es preferiblemente de 0,1 a 2,0 mm de espesor. Si la primera capa es una película seca, entonces es preferiblemente de 0,01 a 0,1 mm de espesor.

La relación de espesor de la primera capa a la segunda capa es preferiblemente de 1:2 a 1:200, preferiblemente de 1:5 a 1:50, más preferiblemente de 1:5 a 1:20.

- 15 La enzima oxidoreductasa puede ser convenientemente inmovilizada de manera que se impida la migración hacia la segunda capa.

El sustrato, p. ej., glucosa, puede estar presente en diversas formas, incluyendo disuelto dentro de una estructura de hidrogel hidratado, presente como un sólido de disolución lenta, o encapsulado dentro de otra estructura para una liberación lenta.

- 20 Es preferible disponer el apósito de modo que tenga un exceso de sustrato, de manera que el apósito es capaz de funcionar en uso para generar peróxido de hidrógeno a lo largo de un período prolongado de tiempo, p. ej., al menos una hora, p. ej., de 1 a 10 horas o más.

La combinación de acuerdo con la invención es típicamente un kit envasado que comprende una combinación de una disolución acuosa y un apósito que comprende una fuente de peróxido de hidrógeno tal como se describió anteriormente.

- 25 Los componentes se encuentran típicamente en paquetes sellados, impermeables al agua,

La invención se ilustrará ahora, a modo de ejemplo, y con referencia a las siguientes figuras, en las que:

la Figura 1 es un gráfico que muestra la corriente medida en función del tiempo que muestra la generación de peróxido de hidrógeno.

La Figura 2a es un gráfico que muestra las curvas de exterminio del hongo *T. rubrum*.

- 30 La Figura 2b es otro gráfico que muestra las curvas de exterminio del hongo *T. rubrum*.

Ejemplos

Sumario Experimental

- 35 Discos de prueba se sumergieron en suero al 50% que contiene 10^7 células fúngicas para volver a crear un alto entorno de proteínas. Estos discos se colocaron en un lecho de gel, que también contenía suero al 50% para imitar el contacto con el lecho ungueal. Los discos fueron dosificados con disoluciones acuosas de peroxidasa de rábano picante o lactoperoxidasa, teniendo cada uno de los conjuntos de discos diferentes niveles de dosis de las enzimas. Los discos de control se dejaron sin peroxidasa de ningún tipo. El experimento se inició mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno generando parches estratificados (véase más adelante) a las superficies de la mayoría de los discos de prueba, y éstos se dejaron reposar durante períodos definidos de tiempo. Algunos discos se dejaron al descubierto como controles experimentales adicionales para determinar lo bien que sobrevivieron las células fúngicas cuando se dejan sin tratamiento. A intervalos de tiempo establecidos, los discos representativos fueron retirados para el muestreo y el número de células fúngicas supervivientes se determinaron por métodos estándares. Estos experimentos demostraron que el peróxido de hidrógeno suministrado por los parches de gel estratificados podría exterminar a las células fúngicas si se dejan en reposo durante varias horas. Sin embargo, la tasa de exterminio de los hongos fue fuertemente potenciada por la presencia adicional de la enzima peroxidasa en contacto con el hongo. La enzima peroxidasa de rábano picante era más potente que la lactoperoxidasa, y el efecto generalmente aumentaba con la dosis.

Ejemplo 1: Construcción y evaluación de un parche de capa estratificada que dona peróxido de hidrógeno en términos de generación de peróxido de hidrógeno

- 50 La generación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se midió utilizando la electroquímica (técnica crono lenta). Un apósito se colocó sobre un sensor diseñado a medida, se aplicó un potencial a través de los electrodos y se midió la presencia de H_2O_2 .

El apósito se componía de dos capas: (i) la capa de hidrogel hidratado y (ii) la capa de activación de la película seca que contienen glucosa oxidasa.

Preparación de la Capa 1: una lámina de hidrogel se preparó como sigue:

- 5 Se preparó una disolución acuosa de ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico sódico al 20% (Lubrizol Corporation, disolución madre acuosa al 50%), glucosa al 10% (Fisher Scientific, calidad analítica) y lactato de zinc al 0,1% (Aldrich). Diacrilato de Peg 700 (Aldrich) se incluyó como agente de reticulación y 2-hidroxi-2-metilpropiofenona (Aldrich) como el fotoiniciador. 6,5 g y 13 g de la disolución se dispensaron en una placa de Petri de 10x10 cm y se sometieron a 100 mW/cm² de luz ultravioleta durante 20 segundos.

Preparación de la Capa 2: una película seca se preparó como sigue:

- 10 Se preparó una disolución acuosa de 25% p/p de PVA (poli(alcohol vinílico) Gohsenol, código EG05P suministrado por Nippon Gohsei). Además, 40,3 mg de glucosa oxidasa (biocatalizadores, 150.000 unidades/gramo) + 300 mg de histidina (Sigma) + 150 mg de ácido cítrico (Fisher, calidad analítica) + 75 mg de yoduro de potasio (Sigma) se disolvieron en 2 ml de agua de calidad analítica (Fisher). 30 g de disolución de PVA al 25% se mezclaron con la disolución de glucosa oxidasa/histidina/ácido cítrico/yoduro de potasio y se dejó sedimentar para eliminar las burbujas de aire atrapadas. A continuación, la mezcla se secó a 50°C para dar una película seca de 40-45 micras de espesor.
- 15

Análisis electroquímico:

- 20 Se utilizó un sensor de 3 electrodos diseñado a medida (de trabajo, contador y de referencia) para el análisis. La instrumentación y el software Ezescan se adquirieron de Whistonbrook Technologies, Luton, Reino Unido. Los electrodos se montaron dentro de una caja de Teflon y se colocan dentro de una incubadora a 25°C. En uso, 20 µl de una disolución de KCl 0,1 M se aplicaron al extremo del electrodo del sensor. Secciones de 1,5x2 cm de la lámina de hidrogel de la Capa 1 (6,5 g y 13 g de peso de colada) se cortaron y se colocaron en la disolución de KCl, asegurando incluso el contacto con los electrodos de modo que no hubiera burbujas de aire atrapadas entre el gel y el sensor. Los geles fueron cubiertos para reducir la evaporación. Se aplicó un potencial de + 950mV a través de los electrodos y el generado se registró en corriente. Cuando se obtuvo una corriente de línea de base estable, secciones de 1,5x2 cm de la película seca se aplicaron a las superficies de las láminas de hidrogel de la Capa 1. Se registró la corriente generada. Véase la Figura 1:
- 25

- 30 La Figura 1 demuestra que cuando se aplicó un potencial de + 950mV a la lámina de hidrogel de la Capa 1 en el sensor, hay muy poca corriente de fondo medible, por lo tanto existe poca interferencia de los materiales utilizados en la preparación del hidrogel a este potencial dado. Después de la aplicación de la película de enzima seca (en torno a 4000 segundos en el gráfico), la química de la glucosa oxidasa se activa y se produce H₂O₂, que rápidamente se difundía a través del hidrogel de la Capa 1 al electrodo, en donde se mide un aumento significativo de la corriente. Esto demuestra claramente que el sistema de doble capa genera H₂O₂ dentro del sistema de doble capa y lo suministra a la superficie de contacto. La corriente generada en relación a la meseta principal del diagrama (entre 5.000 y 13.000 segundos) generalmente equivale a alrededor de H₂O₂ (aq) al 0,1%. Además, los diferentes espesores de la Capa 1 de hidrogel producían curvas muy similares, con la excepción de que el gel más delgado (6,5 g de gel por área de 10x10 cm) dio una corriente de pico significativamente más alta (por lo tanto la concentración de H₂O₂) en la hora de aplicación (alrededor de 3000 segundos después de la activación). El H₂O₂ de medición disminuye luego gradualmente hasta que las curvas vuelven a una respuesta plana en torno a 40.000 segundos (aprox. 11 horas) después de la activación.
- 35
- 40

Ejemplo 2: Preparación de peroxidasa que contiene muestras de cebadores como disoluciones acuosas.

Un soporte de base adecuado para la peroxidasa se preparó como sigue: Tampón fosfato de sodio 50 mM pH 6-6,5 se mezcló con tensioactivo Tween 20 al 0,2% p/p (Sigma). Para ello, la enzima peroxidasa se disolvió para dar una concentración final de 100 µg/ml.

- 45 La formulación de soporte puede ser alterada para proporcionar diferentes propiedades según sea necesario. Por ejemplo, la concentración y el tipo de la sal tampón se pueden cambiar para proporcionar un intervalo de límites de tamponamiento y para cambiar el pH de la disolución, dependiendo de la aplicación y del pH óptimo de la enzima (p. ej., peroxidasa) utilizada; la concentración y el tipo de tensioactivo se pueden cambiar para proporcionar diferentes características de humectación; se pueden incluir espesantes poliméricos adicionales para reducir las características de flujo del fluido (p. ej., para ayudar a evitar que la disolución rebese de la uña una vez aplicada); el nivel de enzima utilizada también puede ser alterado para permitir una acción fuerte o reducida mediada por peroxidasa en o dentro de la estructura tratada. Los aditivos adicionales pueden también incorporarse para mejorar la eficacia del apósito, por ejemplo, agentes anti-microbianos.
- 50

- 55 Ejemplo 3: Ensayo del sistema de tratamiento antifúngico de la invención contra *Trichophyton rubrum* en un sistema modelo.

Se utilizó un modelo de difusión estática en lecho plano *in vitro*, en base a las técnicas descritas en "In vitro diffusion

bed, 3-day repeat challenge 'capacity' test for antimicrobial wound dressings", J. Greenman, R.M.S. Thorn, S. Saad, A. Austin *Internacional Wound Journal* (2006), 3, 322-329.

El inóculo de prueba se preparó emulsionando la biomasa de crecimiento en superficie madura de *Trichophyton rubrum* en agar de dextrosa de patata en medio líquido Saboraud, separando la suspensión, mezclando en vórtice y luego permitiendo que las partículas grandes se asienten fuera de la disolución. La suspensión resultante se ajustó a través de espectrofotometría para dar un inóculo estandarizado alrededor de 10^7 cfu ml⁻¹, que es lo suficientemente densa para detectar cualesquiera efectos fungicidas (una reducción de $> 10^3$ cfu es indicativa de un efecto cidal).

Un volumen de 100 µl de los inóculos definidos se resuspendió en discos de celulosa replicados en la superficie de un lecho de ensayo de poli-AMPS (cuya formulación es idéntica a la Capa 1 de hidrogel tal como se describe en el Ejemplo 1, pero se cuela como una lámina de gel de 25 g por placa 10x10 cm), con lo cual se pueden aplicar luego productos de prueba (Figura 1). Se sometió a ensayo un apósito de dos capas. Las capas se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Enzimas lactoperoxidasa o peroxidasa de rábano picante se prepararon disolviendo en agua analítica a la concentración requerida antes de su uso. Se cree que la lactoperoxidasa puede potenciar los efectos antifúngicos del nuevo tratamiento tópico, y para algunos de los sistemas experimentales discos de celulosa fueron tratados previamente con una disolución de lactoperoxidasa o peroxidasa de rábano picante para determinar efectos diferenciales. La gama de condiciones de prueba y de control experimentales propuestas se muestra en la Tabla 1.

Los apósitos de dos capas se activaron al reunir las dos capas. La lámina de hidrogel se puso en contacto con el disco de celulosa y la película seca se aplicó a continuación a la superficie superior de la lámina de hidrogel. Lechos de ensayo se incubaron a 28°C, y a los intervalos de tiempo establecidos (0, 1, 2, 4 y 24 h); discos de celulosa se retiraron, se resuspendieron en PBSa, se diluyeron en serie y luego se extendieron en espiral sobre agar de dextrosa de Saboraud. Después de la incubación (5 días) se determinó el número de supervivientes de dermatofitos en diferentes momentos después de la exposición al tratamiento por recuento de colonias (disco cfu⁻¹). Los resultados se representaron y analizaron utilizando GraphPad Prism (v.4).

Resultados

Los resultados experimentales se muestran en la Figura 2 y es evidente que todas las condiciones de ensayo provocaron efectos antimicrobianos significativos, y hacia las 3 horas después de la exposición al tratamiento no se pudieron detectar células viables por debajo de cualquiera de los tratamientos tópicos. Lactoperoxidasa dentro del disco parece potenciar los efectos del tratamiento tópico de una manera dependiente de la concentración, aunque 1 µg ml⁻¹ no tuvo efecto significativo en comparación con el tratamiento de ensayo solo (Figura 2a). Peroxidasa de rábano picante dentro del disco también potencia los efectos del tratamiento tópico de una manera dependiente de la concentración, en los casos de incluso la concentración más baja (1 µg ml⁻¹) tiene un efecto significativo (Figura 2b). Dentro de las muestras de control se produjo un ligero descenso en los números de células de *T. rubrum*, lo que demuestra que este organismo no está muy bien soportado en las placas de ensayo de lecho de pruebas de hongos, particularmente después de 24 horas de incubación; aunque todos los tratamientos de las pruebas mostraron efectos significativos en comparación con los controles. Curiosamente, parece que el control de tratamiento inactivo está ofreciendo una cierta protección para el organismo en comparación con el control sin tapar a las 24 horas.

Conclusiones

Es evidente a partir de los resultados que el tratamiento tópico solo tiene un efecto antimicrobiano significativo en *T. rubrum*, reduciendo el número de células viables por debajo del punto mínimo de detección para este sistema (2×10^2 células) en el espacio de 3 horas, indicativo de un efecto fungicida (reducción de > 3 veces log). Tanto peroxidasa como peroxidasa de rábano picante potencian los efectos del tratamiento tópico, aunque es evidente que la peroxidasa de rábano picante es más eficaz.

Tabla 1. Test experimental y condiciones de control para determinar el potencial antifúngico de diversos nuevos tratamientos.

Control 1	disco no cubierto
Control 2	Tratamiento tópico inactivo
Prueba 1	Tratamiento tópico activo
Prueba 2	Tratamiento tópico activo + 1 µg/ml de lactoperoxidasa en disco
Prueba 3	Tratamiento tópico activo + 100 µg/ml de lactoperoxidasa en disco

ES 2 586 851 T3

Prueba 4	Tratamiento tópico activo + 500 µg/ml de lactoperoxidasa en disco
Prueba 5	Tratamiento tópico activo + 1 µg/ml de peroxidasa de rábano picante en disco
Prueba 6	Tratamiento tópico activo + 100 µg/ml de peroxidasa de rábano picante en disco
Prueba 7	Tratamiento tópico activo + 500 µg/ml de peroxidasa de rábano picante en disco

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una combinación de un líquido acuoso para reblandecer una infección por hongos en una superficie del cuerpo humano o animal, y un apósito, que comprende una fuente de peróxido de hidrógeno, para la subsiguiente aplicación a la superficie del cuerpo, para uso en el tratamiento de una infección por hongos en la superficie del cuerpo humano o animal.
2. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la superficie del cuerpo es una zona de las uñas, particularmente una zona de las uñas humanas.
3. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el líquido acuoso comprende una enzima peroxidasa.
- 10 4. La combinación de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la peroxidasa comprende lactoperoxidasa, peroxidasa de rábano picante o una mezcla de las mismas.
5. La combinación de acuerdo con la reivindicación 3 ó 4, en donde la concentración de la enzima peroxidasa en el líquido acuoso está en el intervalo de 1 a 1000 µg/ml.
- 15 6. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el líquido acuoso comprende tensioactivos y/o disolventes.
7. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el apósito dona agua a la zona de la uña en uso.
8. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el apósito comprende un material de hidrogel hidratado.
- 20 9. La combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la fuente de peróxido de hidrógeno son medios de generación de peróxido de hidrógeno que comprende una enzima oxidorreductasa, una fuente de oxígeno y una fuente de sustrato para la enzima.
10. Combinación de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la enzima oxidorreductasa comprende glucosa oxidasa.
- 25 11. La combinación de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en donde el apósito comprende primera y segunda capas discretas, comprendiendo la primera capa la enzima oxidorreductasa y se encuentra en la vecindad de las partes exteriores del apósito, comprendiendo la segunda capa la fuente de sustrato y se encuentra en la vecindad de las partes internas del apósito.

Fig 1

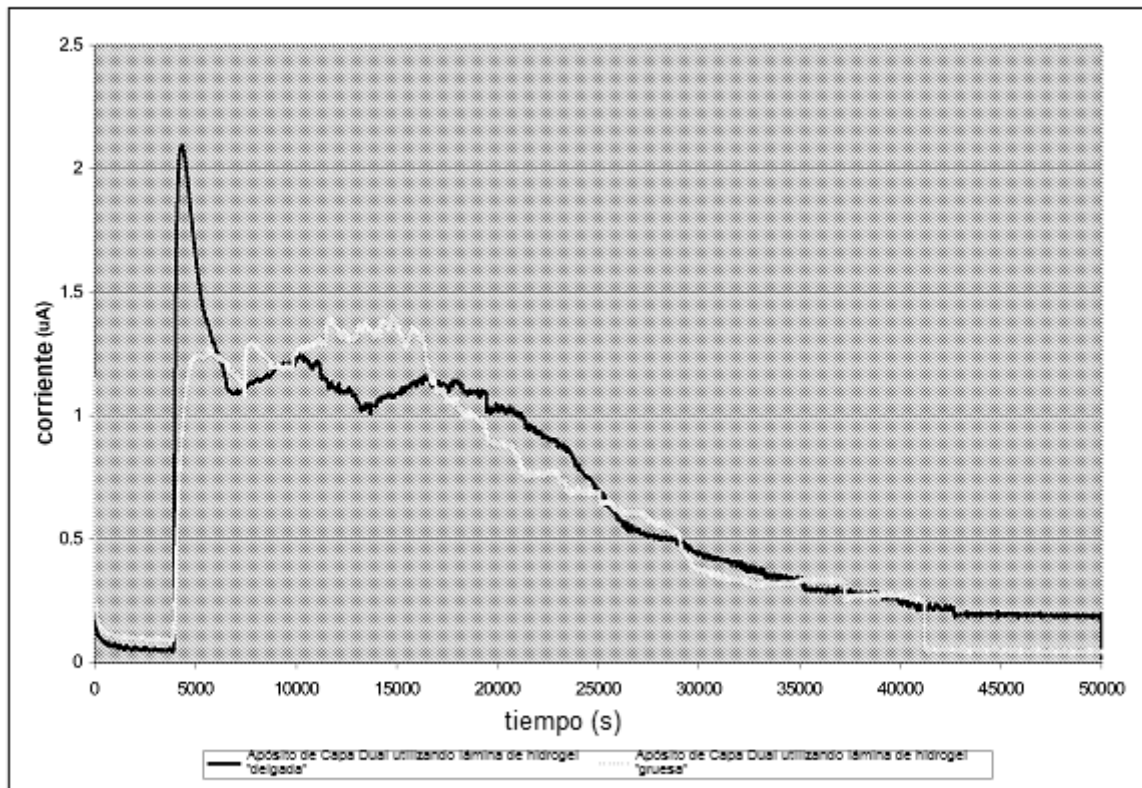


Fig 2

