

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 237**

51 Int. Cl.:

A61K 38/34 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

C07K 5/068 (2006.01)

A61K 47/54 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/US2013/029696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13142088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13710751 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2827907**

54 Título: **Lipopéptidos antimicrobianos cortos**

30 Prioridad:

20.03.2012 US 201261613212 P

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

31.10.2019

73 Titular/es:

**HELIX BIOMEDIX INC. (100.0%)
22121 17th Avenue SE 112
Bothell, WA 98021, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, LIJUAN y
CARMICHAEL, ROBIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 729 237 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

Lipopéptidos antimicrobianos cortos

5 La invención se refiere a péptidos que tienen actividad biológica y terapéutica. particularmente, la invención se refiere a análogos de dipéptidos lipidados de KPV o KdPT que presentan actividad antimicrobiana. En particular, los péptidos de la presente invención proporcionan una actividad aumentada por encima de los tripéptidos básicos, lisina-prolina-valina y lisina-d-prolina-tirosina. La invención se refiere adicionalmente a procedimientos de utilización de estos péptidos para tratar distintas lesiones, inflamaciones o infecciones bacterianas que afectan la piel y otras superficies del cuerpo relacionadas tales como la cavidad oral.

Antecedentes de la invención

10 Los investigadores han desarrollado tratamientos antimicrobianos y agentes durante décadas. Recientemente, ha habido una necesidad de nuevos agentes antimicrobianos para el tratamiento del número creciente de infecciones bacterianas, víricas, y fúngicas resistentes a los fármacos.

15 Se han expuesto distintos péptidos bioactivos en la literatura científica y en las patentes expedidas. Históricamente se han aislado los péptidos de fuentes naturales, y se han sometido recientemente a estudios de relación entre estructura y función. Adicionalmente, los péptidos naturales han servido de punto de partida para el diseño de análogos peptídicos sintéticos.

Existen distintas patentes que describen composiciones cosméticas que contienen péptidos cortos. Por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N.º 6.492.326 sugiere la preparación y uso de composiciones de cuidado de la piel que contienen pentapéptidos y principio activos para el cuidado de la piel.

20 Strom y col. 2003 (Journal of Medicinal Chemistry 46: 1567-1570) describen péptidos antimicrobianos cortos enfocándose principalmente en péptidos muy cortos (dímeros y trímeros) que contenían modificaciones químicas. También se describen ciertos hexapéptidos. Sin embargo, no se ensaya ni se expone la actividad antimicrobiana de estos hexapéptidos.

25 La hormona estimulante de melanocitos-alfa (MSHa) es un neuropéptido de 13 aminoácidos con potente actividad antiinflamatoria. Se produce mediante procesamiento postranscripcional de la molécula precursora más grande, la pre-opiomelanocortina. El tripéptido del extremo carboxilo de la MSHA que comprende los restos 1 a 13 KPV se ha demostrado que ejerce la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* (Brzoska, T., Luger, TA. y col., *α*-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effects *in vitro* and *in vivo*, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. Endocrine Reviews 2009. 29 (5): 581-602). Se ha descrito un derivado relacionado estructuralmente, el KdPT (KPT) que es colineal en los restos 193-195 de IL-13 y parece que es capaz de interactuar con el receptor tipo I de la IL-1 (Luger T.A., y Brzoska T. *α*-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. Ann Rheum Dis 2007; 66 (supl III): iii52-iii55). Había un informe que sugería que el KPV tienen influencia antimicrobiana en *S. aureus* and *C. albicans*, pero no se determinó su CIM (Cutuli M y col., 2000, antimicrobial effects of *α*-MSH peptides, J. Leukocyte Biology, 67:233-239). A diferencia del KPV, nunca se ha expuesto que el tripéptido KdPT posea influencia antimicrobiana.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar péptidos que tengan un amplio intervalo de actividad antimicrobiana potente contra un gran número de microorganismos, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas. El coste de fabricación de los péptidos antimicrobianos también es una consideración clave para las aplicaciones farmacéuticas y cosméticas. Los inventores desvelan en la presente invención péptidos antimicrobianos cortos baratos que se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas o cosméticas para el tratamiento tópico o el manejo de afecciones de la piel asociadas con infecciones bacterianas y fúngicas.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a análogos de dipéptidos lipidados de KPV o KdPT que presentan actividad antimicrobiana. En particular, estos péptidos proporcionan una actividad aumentada por encima de los tripéptidos básicos, lisina-prolina-valina y lisina-d-prolina-tirosina. La actividad antibacteriana dirigida por los péptidos aislados se dirige contra las bacterias que afectan a la piel y asociadas con las superficies mucosas. Aunque sin limitarse a ningún mecanismo en particular, los péptidos son capaces de promover la salud cutánea inhibiendo la inflamación asociada a la infección bacteriana.

En particular, la presente invención se refiere a dipéptidos lipidados de fórmula general:

50 C_{12-18} lípido-KXZ-NH₂,

en la que K es lisina; X es prolina o D prolina (isómero D de prolina); Z está ausente; y el COOH terminal está amidado con NH₂. El péptido está lipidado con un lípido C₁₂₋₁₈ y preferentemente es el resto lipídico del ácido láurico (C₁₂), ácido mirístico (C₁₄), ácido pentanoico (C₁₅), ácido palmítico (C₁₆), o ácido esteárico (C₁₈). Los grupos lipídicos más preferidos son pentadecanoil y palmitoil.

Los di-aminoácidos lipidados son por lo tanto lípido C₁₂₋₁₈-lisina-prolina-NH₂; y lípido C₁₂₋₁₈-lisina-d-prolina-NH₂.

La presente invención proporciona composiciones para su uso en la prevención o tratamiento de una infección microbiana de la piel o el tejido mucoso de un mamífero, comprendiendo la composición un vehículo farmacéutica o cosméticamente aceptable y uno o más de los péptidos mencionados anteriormente. El péptido en dichas composiciones varía preferentemente en concentración desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o desde aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente un 10 % (p/v). Las formas preferidas de la composición son aerosoles, emulsión, líquidos, soluciones acuosas, lociones, cremas, pastas, ungüentos, polvos y espumas, adecuadas para la aplicación tópica.

Normalmente, su uso conlleva la administración de una cantidad eficaz de composiciones que contienen péptidos en las áreas afectadas de la piel (epidermis) y tejidos mucosos asociados, durante una cantidad de tiempo eficaz. Las composiciones pueden ser útiles cuando la infección bacteriana está causada por una bacteria seleccionada de entre *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

Adicionalmente, los péptidos de la presente invención, y las composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para su inclusión en las formulaciones generales de cuidado de la piel y cosméticas, tal como distintos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, protectores solares, y lociones o cremas terapéuticas tales como las formulaciones antiacné.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse más completamente, se expone la siguiente descripción detallada. La invención se refiere en general a composiciones y usos que comprenden análogos dipéptidos lipidados de KPV o KdPT de fórmula general:



en la que K es lisina; X es prolina o d-prolina; está ausente; y el COOH terminal está amidado con NH₂. Ejemplos de ácidos grasos saturados o insaturados que se pueden utilizar para proporcionar el componente lipídico C₁₂₋₁₈ de los compuestos de la invención incluyen:

Nombre sistemático	Nombre común	Denominación abreviada
ácido dodecanoico	ácido láurico	12:0
ácido tetraicoico	ácido mirístico	14:0
ácido hexanoico	ácido palmítico	16:0
ácido heptadecanoico	ácido margárico (datúrico)	17:0
ácido octadecanoico	ácido esteárico	18:0
ácido 9-cis-tetradecenoico	ácido miristoleico	14:1 (n-5)
ácido 9-cis-hexadecenoico	ácido palmitoleico	16:1 (n-7)
ácido 6-cis-hexadecenoico	ácido sapiénico	16:1 (n-10)
ácido <i>all</i> -cis-7,10,13-hexadecatrienoico		16:3 (n-3)
ácido 9-cis-octadecenoico	ácido oleico	18:1 (n-9)
ácido <i>all</i> -cis-9,12-octadecadienoico	ácido linoleico	18:2 (n-6)

La hormona estimulante de melanocitos-alfa (MSHa) es un neuropéptido de 13 aminoácidos con potente actividad antiinflamatoria. Se produce mediante procesamiento post-transcripcional de la molécula precursora más grande, la pre-opiomelanocortina. El tripéptido del extremo carboxilo de la MSHA que comprende los restos 1 a 13 KPV se ha demostrado que ejerce la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* (Brzoska, T., Luger, TA, y col., a-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effects *in vitro* and *in vivo*, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocrine reviews* 2009. 29 (5): 581-602). Se ha descrito un derivado relacionado estructuralmente, el KdPT (KPT) que es colineal en los restos 193-195 de IL-1 y parece que es capaz de interactuar con el receptor tipo I de la IL-1 (Luger T.A., y Brzoska T. a-MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 (supl III): iii52-iii55). Había un informe que sugería que el KPV tienen influencia antimicrobiana en *S. aureus* and *C. albicans*, pero no se determinó su CIM (Cutuli M y col., 2000, antimicrobial effects of a-MSH peptides, *J. Leukocyte Biology*, 67:233-239). A diferencia del KPV, nunca se ha expuesto que el tripéptido KdPT posea influencia antimicrobiana.

Los inventores llevaron a cabo la determinación de la concentración inhibidora mínima (CIM) utilizando el protocolo de referencia del CLSI (Instituto de Referencia Clínico y de Laboratorio) para antimicrobianos (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Novena Edición). Para sorpresa de los inventores, ni el KPV ni el KdPT demostraban MIC detectables a una concentración de hasta 2000 mg/ml contra *E. coli*, *S. aureus* o levaduras. Dicho pobre perfil antimicrobiano hace que ambos tripéptidos estén lejos de ser deseables para aplicaciones terapéuticas o cosméticas que necesiten una actividad antimicrobiana.

Los inventores modificaron ambos péptidos mediante acilación del extremo N con lípidos de distintas longitudes con

el grupo alfa amino de KPV o KdPT. Dicha modificación genera moléculas con una nueva actividad antimicrobiana superior e inesperada contra un amplio intervalo de microorganismos. Los lipotripéptidos resultantes presentaban una actividad sorprendentemente superior respecto a los péptidos parentales contra bacterias gramnegativas y grampositivas, y levaduras. La longitud de los lípidos también afecta dicha actividad y los inventores descubrieron que los lípidos con un número de carbonos que variaba desde 12 a 18 eran los más eficaces. Después de la lipidación la CIM estaba muy mejorada en el caldo de Muller Hinton variando desde 1 a 64 mg/ml contra *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*. La sustitución del tercer resto en Pal-KPV-NH₂ con A o L mantenía la actividad antimicrobiana y este hallazgo dio pie a los inventores a retirar el tercer resto de aminoácido de KPV o KdPT. Todos los lipodipéptidos resultantes, Pal-KP-NH₂, Pal-K-dP-NH₂, presentaban una nueva actividad antimicrobiana. Además, tanto KP-NH₂ como KdP-NH₂ presentaban una actividad antiinflamatoria moderada contra la expresión de IL-6 inducida por histamina en queratinocitos humanos (datos no mostrados). La actividad antimicrobiana se puede traducir en aplicaciones terapéuticas en una preparación farmacéutica o cosmética.

En resumen, la invención se basa en el descubrimiento de que los lipodipéptidos específicos derivados de KPV que consisten en lípido-KXZ eran con lípidos que se pueden seleccionar deseablemente de entre Palmitoil-, Lauril-, Miristil-, Pentadecanoil-, y Estearil-; y X se puede seleccionar de entre P en forma L-o D-enantiomérica, Z está ausente, amidados en el extremo carboxilo, son antimicrobianos contra bacterias grampositivas y gramnegativas que incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), , dermatofitos tales como *Trichophyton* spp., y las levaduras *Candida* spp., incluyendo *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*.

Leyenda de abreviaturas: Los lípidos enumerados anteriormente se acoplan mediante un enlace amida al dipéptido utilizando la química peptídica convencional: myr = ácido mirístico, pen = ácido pentadecanoico, pal = ácido palmítico, ste = ácido esteárico, lau = ácido láurico. La forma dextro de los aminoácidos se abrevia como "d", por ejemplo la forma dextro de la prolina es la d-prolina. Además, las abreviaturas de los aminoácidos siguen el uso convencional:

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	ASN	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Los detalles de las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co, Easton Pa.). Aunque es deseable el suministro tópico local, hay otros medios de suministro, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, en aerosol, intramuscular, subcutánea, transcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, o intranasal. La presente invención se puede formular con varios vehículos excipientes, por ejemplo, en un pulverizador, un aerosol; una emulsión tipo agua en aceite; una emulsión aceite en agua; un crema de cara o una crema de cuerpo, una loción solar o una loción para después del sol; u otro vehículo de administración tópica. Adicionalmente, los péptidos de la presente invención, y las composiciones que los contienen, pueden proporcionar características útiles para su inclusión en las formulaciones generales de cuidado de la piel y cosméticas, tal como distintos cosméticos para la piel, cremas para la piel, lociones, protectores solares, y lociones o cremas terapéuticas tales como las formulaciones antiacné.

Como se utiliza en el presente documento, el término "terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, mejorar, evitar o mejorar una afección no deseada o enfermedad de un paciente. La afección que se va a tratar en la presente invención incluye varias infecciones bacterianas que afectan comúnmente la piel o las regiones mucosas de mamíferos tales como los seres humanos. Los procedimientos también pueden ser útiles cuando la infección bacteriana está causada por una bacteria hongo seleccionados de entre *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.

Dependiendo de la aplicación específica contemplada, la composición farmacéutica proporcionada por la invención

objeto puede formularse como una solución, suspensión, preparación parenteral, ungüento, crema, loción, pulverizador, polvo, o cápsula comprimida. Las preparaciones parenterales pueden incluir un vehículo tal como especialmente agua destilada libre de pirógenos, tampón de fosfato o solución salina normal. Los ungüentos, crema, lociones y pulverizadores pueden incluir un vehículo tal como aceite vegetal o mineral, vaselina blanca, o alcoholes de alto peso molecular, es decir, mayores de C₁₂. Los comprimidos o cápsulas pueden incluir diluyentes (por ejemplo, lactosa), aglutinantes, lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico) y un desintegrante (por ejemplo, almidón de maíz).

También se puede formular un pulverizador bucal que contenga una cantidad eficaz de un principio activo con uno o más péptidos lipidados de la presente invención. Este material puede pulverizarse como un agente microbiano en alícuotas de 0,25 a 0,5 ml sobre los dientes y las superficies gingivales de cada cuadrante entre 1 y 3 veces al día. En el caso de dentaduras postizas, se puede utilizar el pulverizador directamente sobre la superficie de la dentadura postiza antes de la inserción diaria de la dentadura. Si se desea se puede proporcionar una formulación de enjuague bucal que contenga una cantidad eficaz del agente antimicrobiano.

La composición de la presente invención también puede incluir un vehículo farmacéutica o dermatológicamente aceptable. Ejemplos de vehículos incluyen emulsiones y geles. Las emulsiones a menudo son una mezcla de una fase oleosa y una fase acuosa. Las composiciones también pueden comprender materiales abrasivos exfoliantes. Las composiciones también pueden comprender un estabilizante. Las composiciones también pueden comprender un compuesto para controlar la espuma.

Las composiciones también pueden incluir uno o más principios activos para el cuidado de la piel. Ejemplos de principios activos para el cuidado de la piel incluyen activos de descamación, activos antiacné, compuestos de vitamina B3, retinoides (incluyendo el retinol, retinal, ésteres de retinol, propionato de retinilo, ácido retinoico, y palmitato de retinilo), hidroxiácidos, neutralizante de radicales, quelantes, agentes antiinflamatorios, anestésicos tópicos, activos de maquillaje, agentes de iluminación de la piel, agentes anticelulitis, flavonoides, activos antimicrobianos, agentes de cicatrización cutánea, activos antifúngicos, farnesol, fitantriol, alantoína, ácido salicílico, niacinamida, dexpanthenol, acetato de tocoferol y glucosamina.

Las composiciones también pueden incluir compuestos de protección solar. Ejemplos de compuestos de protección solar incluyen compuestos de protección solar inorgánicos y compuestos de protección solar orgánicos. Los compuestos de protección solar inorgánicos pueden incluir óxidos metálicos tales como óxido de zinc, óxido de titanio, y óxido de hierro. Los compuestos de protección solar orgánicos pueden incluir octilmetoxicinamato, salicilato de octilo, tereftalideno dialcanfor ácido sulfónico, avobenzona, y octocrileno.

Materiales y procedimientos

1. Síntesis de péptidos. Todos los péptidos desvelados se sintetizaron utilizando la química de fase sólida convencional Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo). Los péptidos se prepararon como secuencias amidadas o de ácido libre utilizando aminoácidos convencionales.

2. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Las cepas bacterianas incluidas en el presente estudio se enumeran en la Tabla 1. *E. coli* UB1005, *S. aureus* SAP0017 (MRSA) y *C. albicans* 105 se cultivaron en placas de agar Mueller Hinton (MH) (Difco, BD Biosciences, MD) y caldo (2g de extracto bovino, 17,5 g de caseína de hidrólisis ácida y 1,5 g de almidón por litro) a 37 °C a menos de que se indique otra cosa. Las bacterias provenientes de las materias primas congeladas se subcultivaron en placas de agar MH recién preparadas antes del ensayo de susceptibilidad. Para el *P. acnes*, la bacteria se cultivó en caldo de infusión de cerebro-corazón BBL™ (Becton, Dickinson & Company, Sparks MD) o placas de agar a 37 °C en condiciones anaeróbicas generadas utilizando una jarra anaeróbica y AnaeroGen™ (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

3. Determinación de la actividad antimicrobiana. Se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) de cada péptido utilizando un ensayo de dilución de caldo de microtitulación CLSI modificado (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Novena Edición). Se utilizó un inóculo de 10⁵-10⁶ unidades formadoras de colonias o de 10⁴ UFC/ml para levaduras. El valor de la MIC se tomó como la concentración más baja de péptido a la que se inhibía más del 90 % de crecimiento microbiano después de una incubación de 15 a 20 h a 37 °C. Para *P. acnes*, la incubación se mantuvo en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 2 semanas antes de determinar la CIM. Se llevaron a cabo las cinéticas de destrucción utilizando una concentración determinada (aproximadamente 2-5 veces la CIM) de péptido mezclado con un microorganismo indicador. Después de la dilución apropiada de las células se colocaron en placas de agar después de intervalos de tiempo definidos y se incubaron a 37 °C durante una noche. En el caso de *P. acnes* se necesitó un periodo de incubación prolongado. Las UFC se contaron y se representaron como supervivencia de las bacterias después del tratamiento con el péptido a lo largo del tiempo, lo que indica la eficacia de un péptido para destruir un microbio.

4. Determinación de la toxicidad del tejido cutáneo La toxicidad cutánea y compatibilidad se determinó utilizando el tejido cutáneo EpiDerm (EPI-200) y el kit MTT (MTT-100) (MatTek, Ashland, MA) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron un 1 % de Triton X-100 y PBS como control positivo (tóxico) y negativo (no tóxico), respectivamente.

5. Análisis del perfil genético. Los 84 genes que codifican las moléculas de adhesión a la matriz extracelular en los fibroblastos dérmicos humanos se analizaron utilizando matrices de PCR llevados a cabo en Sunny Biodiscovery, Inc (Santa Paula, CA). Los fibroblastos dérmicos humano eran de Zen-Bio, Research Triangle Park, NC (cat n° DF-

F, lote nº DFMF112410). Las células (de pocos pasajes) se cultivaron en DMEM/10 %FCS c/s rojo fenol hasta que alcanzaban el estadio de confluencia después de incubarse por duplicado con los materiales de ensayo a 3, 5, o 10 mg/ml o agua durante 24 h. Al final de la incubación se observaron las células bajo un microscopio invertido Nikon TS. Ninguna de las condiciones experimentales era citotóxica. La evaluación cualitativa demostraba más células en mitosis con los materiales de ensayo a 5 mg/ml que con 10 pg/ml, y por lo tanto se escogió la condición de 5 mg/ml para la extracción de ARN.

Al final del periodo de incubación se conservaron las células en solución *RNAlater* (Ambion, Austin, TX) durante 6 h. Se extrajo el ARN y se purificó con un kit NucleoSpin RNA II de Machery-Nagel, Bethlehem, PA). El ARN total purificado se evaluó a 230 nm, 260 nm y 280 nm con un espectrómetro de matriz de diodo Agilent HP-8452A. La concentración de ARN se igualó a lo largo de las muestras y se midió la expresión de los genes de interés mediante PCR cuantitativa en tiempo real con el Sistema de detección BioRad iCycler iQ utilizando matrices de PCR PAHS -013A (www.abiosciences.com/rt_per_produc t/HTML/PAHS-013A.html), con el kit de síntesis 1st strand, la mezcla maestra SYBR Green y ejecutando la PCR en las condiciones de Qiagen (anteriormente SA Biosciences). Se utilizó el procedimiento de eficacia AACt para la cuantificación de los resultados, después de la normalización de la expresión genética a 5 genes constitutivos que llevada a cabo con el software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5.

Resultados y conclusión

Ambos tripéptidos KPV y KdPT se conocían por sus actividades antiinflamatorias *in vitro* e *in vivo*. También se había expuesto que el tripéptido KPV tenía actividad antimicrobiana en tampón de fosfato contra *S. aureus* y *C. albicans* (Cutulis M. y col., Antimicrobial effects of α -MSH peptides. J. Leukocyte Bio. 2000 67:233-239). Sin embargo el valor de la CIM de KPV nunca se había determinado ni expuesto. También se desconoce si el KdPT posee influencia antimicrobiana o no.

Los inventores ensayaron la actividad antimicrobiana de KPV y K-dPT en medios de cultivo utilizando el ensayo de dilución microbroth y recomendado por el CLSI, un ensayo convencional utilizado para la determinación de la CIM *in vitro* para antibióticos y antifúngicos (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Novena Edición). Para sorpresa de los inventores ni el KPV (HB2067, HB2068) ni el KdPT (HB2089, HB2090) con o sin amidación terminal presentaban CIM detectables a concentraciones hasta de 2000 mg/ml en caldo MH (Tabla 1). Esto era consecuente con el hallazgo descrito por Rauch y colaboradores de que el KPV fallaba en la inhibición del crecimiento de levaduras a hasta 100 mM utilizando un ensayo de crecimiento contra la cepa de *C. albicans* SC5314, una cepa convencional de laboratorio para experimentos de susceptibilidad antifúngica ((Rauch I., Holzmeister S., y Kofler B. Anti-Candida activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSK) peptides. J. Leukoc. Biol. 2009. 85 (3):371-372).

Los inventores modificaron el KPV y KdPT con lípidos de distintas longitudes con el fin de buscar análogos con un perfil antimicrobiano mejor o mejorado que los tripéptidos parentales. La acilación del núcleo del tripéptido reveló resultados sorprendentes. La longitud del lípido parece ser crítica y la Tabla 2 muestra los resultados utilizando KPV como ejemplo.

Un lípido con número de carbonos que varíe desde 11 a 18 parece que tiene una influencia positiva en la actividad antimicrobiana tanto de KPV como de KdPT (Tabla 1, 2). Se identificó que la longitud óptima del lípido era de 15 y 16 carbonos para KPV y KdPT (Tabla 1, 2). Dichos lípidos mejoran significativamente la actividad antimicrobiana de ambos péptidos hacia un amplio espectro de microorganismos incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas y levaduras como es evidente por las SEQ ID NO, 5 (HB2178), 7 o 24 (HB2180 o HB2200), 17 (HB2192), 23 (HB2199), (Tabla 1, 2). De hecho, los lipopéptidos presentaban una mejora de casi 2000 veces de la CIM variando desde 1-64 mg/ml contra *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, en comparación con el tripéptido parental KPV-NH2 o KdPT-NH2 solos que estaban inactivos hasta a 2000ug/ml (Tabla 1). El aumento de la longitud del lípido a 18 carbonos eliminaba la actividad selectiva contra gramnegativas pero mantenía la actividad selectiva para grampositivas y levaduras (Tabla 1, 2). Los inventores sustituyeron adicionalmente el tercer aminoácido en Pal-KPV-NH2 por A o L para obtener las SEQ ID NO 30 (HB2208) y 31 (HB2209). De manera interesante, las SEQ ID NO 30 y 31 mantenían una actividad antimicrobiana en un amplio espectro aceptable sugiriendo que el tercer resto V en Pal-KPV-NH2 puede ser necesario o no para la nueva actividad antimicrobiana observada. Además de su actividad de amplio espectro como se indica por las CIM, los análogos que incluían las SEQ ID NO, 5 (HB2178), 7 (2180), 30 (HB2208) y 31 (HB2209) eran todos microbicidas y erradicaban 5-6 log de *S. aureus* en 20 min en un ensayo de destrucción (Tabla 3). En resumen, la unión de lípidos a KPV-NH2 o KdPT-NH2 con un número de carbono variando de 12 a 18 permite la generación de lipotripéptidos con una actividad antimicrobiana de amplio espectro. El tercer resto en KPV-NH2 o KdPT-NH2 puede ser crucial o no para la nueva actividad antimicrobiana observada. La amidación del extremo C es muy crítica para la actividad antimicrobiana descrita ya que los equivalentes no amidados tal como HB2184 y HB2182 eran inactivos o menos activos.

Que la sustitución del tercer resto de Pal-KPV-NH2 con A o L no eliminara la actividad llevó a los inventores a modificaciones adicionales. Los inventores por lo tanto retiraron el tercer resto de aminoácido de Pal-KPV-NH2 y Pal-KdPT-NH2 para obtener los lipodipéptidos de las SEQ ID NO 26 (HB2202) y SEQ ID NO 27 (HB2203). Ambos derivados demostraban una nueva actividad antimicrobiana similar a los lipotripéptidos parentales Pal-KPV-NH2 y Pal-KdPT-NH2 (Tabla 1). Dicha actividad era inesperada y nunca se había desvelado. Las cinéticas de destrucción

- sugieren que ambos derivados lipodipeptídicos eran igualmente microbicidas y erradicaban más de 5 log de microorganismos incluyendo *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y la levadura *C. albicans* en 20 min de contacto directo en PBS (Tabla 3). La actividad antimicrobiana de los lipodipeptidos descritos en la presente invención también era evidente ya que ambos mantenían una actividad de destrucción significativa contra *S. aureus* en presencia de un 10 % de suero fetal bovino (Tabla 3). Esto es particularmente significativo. Los antibióticos peptídicos a menudo tienen un problema debido a la interferencia y la unión a las proteínas del huésped dando como resultado una reducción de la actividad antimicrobiana. Considerando que los cortes o lesiones de la piel incluyendo las lesiones por acné se acompañan a menudo de infiltraciones de suero en el área de la herida, la actividad antimicrobiana en el suero es muy importante para los terapéuticos potenciales.
- 5 Para estar seguros de que Pal-KP-NH2 contiene el diseño para la actividad óptima, los inventores cambiaron la posición de p y K para generar el HB2251 (Pal-PK-NH2) y HB2255 (Pal-PK-OH). En comparación con Pal-KP-NH2, el Pal-PK-NH2 presentaba más de 8 veces de reducción de la actividad. Los derivados no amidados Pal-PK-OH y Pal-KP-OH eran inactivos sugiriendo de nuevo que la amidación del extremo C era crítica para la actividad antimicrobiana.
- 10 Se ensayó el potencial para la irritación dérmica de los lipodipeptidos utilizando el EpiDerm™ Skin Model (MatTek, Ashland, MA) en combinación con un ensayo MTT modificado. El EpiDerm™ Skin Model presentaba características de crecimiento y morfológicas *tipo in vivo* que eran uniformes y altamente reproducibles. EpiDerm™ consiste en capas basal, espinosa, granular, y cornificada organizadas de manera análoga a las que se encuentran *in vivo*. Los tejidos se trataron con cada compuesto a la concentración deseada durante 20 h. Como se ve en la Tabla 1, ninguno de los lipopeptidos seleccionados representados por HB2202, HB2203, HB2180, HB2208 y HB2209 presentaban efectos negativos sobre la viabilidad tisular hasta a 2000 ug/ml.
- 15 En las siguientes tablas, las SEQ ID No 26 y 27 se refieren a péptidos que están comprendidos en las composiciones de la invención, el resto de SEQ ID son de referencia.
- 20

Tabla 1. Actividad antimicrobiana y toxicidad tisular cutánea de análogos de KPV

SEQ ID	HB nº	Secuencia	CIM (µg/ml)				Toxicidad EpiDerm™
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. acnes</i>	
1	HB2067	KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
2	HB2068	KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
3	HB2089	K-dPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
4	HB2090	K-dPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
5	HB 2178	Pal-K-dPT-NH2	64	4	16	2	>2000
6	HB2179	Dec-K-dPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
7	HB 2180	Pal-KPV-NH2	128	8	16	1-2	>2000
8	HB 2181	Dec -KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	1000	ND
9	HB2182	Pal-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	32	ND
10	HB2183	Dec-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
11	HB2184	Pal-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	8	ND
12	HB2185	Dec-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
13	HB 2188	Octanil-KPV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
14	HB 2189	Undecil-KPV-NH2	2000	1000	>2000	256-500	ND
15	HB 2190	Lauril-KPV-NH2	250	250	>2000	64	ND
16	HB2191	Miristil-KPV-NH2	500	250	250	16	ND
17	HB 2192	Pentadecanoil-KPV-NH2	64	16	32	1	ND
18	HB 2194	Estearil-KPV-NH2	>2000	16	16	1-2	ND
19	HB 2195	Octanyl-KdPT-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
20	HB 2196	Undecil-KdPT -NH2	2000	1000	1000	256-500	ND
21	HB 2197	Lauril-kdPT-NH2	1000	500	500	128	ND
22	HB 2198	Miristil-KdPT-NH2	128	64	64	8-16	ND
23	HB 2199	Pentadecanoil-KdPT-NH2	64	32	32	2-4	ND
24	HB 2200	Pal-K-dPT-NH2	64	4	16	2	ND
25	HB 2201	Estearil-K-dPT-NH2	128	16	8	1-2	ND
26	HB 2202	Pal-KP-NH2	64	16	16	1	>2000

(continuación)

SEQ ID	HB nº	Secuencia	CIM (µg/ml)				Toxicidad EpiDerm™
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>P. acnes</i>	
27	HB 2203	Pal-K-dP-NH2	128	8	16	1-2	>2000
28	HB 2205	Pal-PV-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
29	HB 2207	Pal-dPS -NH2	>2000	>2000	>2000	32	ND
30	HB 2208	Pal-KPA-NH2	128	16	16	1	>2000
31	HB 2209	Pal-KPL-NH2	>2000	16	32	4-8	>2000
32	HB2230	KP-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
33	HB 2231	K-dP-NH2	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
48	HB2251	Pal-PK-NH2	2000	128	128	4-16	ND
51	HB 2255	Pal-PK-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
52	HB 2256	Pal-K-dP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
53	HB2257	Pal-KP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND

Tabla 2. Efecto de la longitud del lípido sobre la actividad antimicrobiana de KPV-NH2

SEQ ID	HB nº	Secuencia	Longitud del lípido	CIM (µg/ml)		
				<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
13	HB 2188	Octanil-KPV-NH2	8C	>2000	>2000	>2000
8	HB 2181	Dec-KPV-NH2	10C	>2000	>2000	>2000
14	HB 2189	Undecil-KPV-NH2	11C	2000	1000	>2000
15	HB 2190	Lauril-KPV-NH2	12C	250	250	>2000
16	HB 2191	Miristil-KPV-NH2	14C	500	250	250
17	HB 2192	Pentadecanoil-KPV-NH2	15C	64	16	32
5	HB2178	Palmitoil-KPV-NH2	16C	128	8	16
18	HB 2194	Estearil-KPV-NH2	18C	>2000	16	16

Tabla 3. Cinéticas de destrucción de análogos de KPV seleccionados

Se muestran las cinéticas de destrucción como supervivencia de microbios a lo largo del tiempo (UFC/ml) (límite de detección 10 UFC/ml)						
SEQ ID	HB nº	<i>S. aureus</i> SAP0017 (MRSA) en PBS				
		0 h	20 min	1 h	2 h	3 h
	PBS	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
2	HB2068	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
3	HB2089	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
5	HB2178	23050000	<10	<10	<10	<10
7	HB2180	23050000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	23050000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	23050000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	23050000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	23050000	<10	<10	<10	<10
<i>P. acnes</i> ATCC11827 en PBS						
SEQ ID	HB nº	0 h	20 min	1 h	2 h	3 h
	PBS	750000	750000	750000	750000	750000
2	HB2068	750000	750000	750000	750000	750000
3	HB2089	750000	750000	750000	750000	750000
5	HB2178	750000	20	<10	<10	<10
7	HB2180	750000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	750000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	750000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	750000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	750000	<10	<10	<10	<10
<i>C. albicans</i> 105 en PBS						
SEQ ID	HB nº	0 h	20 min	1 h	2 h	3 h
	PBS	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
2	HB2068	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
3	HB2089	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
26	HB2202	1300000	3000	150	<10	<10

(continuación)

Se muestran las cinéticas de destrucción como supervivencia de microbios a lo largo del tiempo (UFC/ml) (límite de detección 10 UFC/ml)						
SEQ ID	HB nº	<i>S. aureus</i> SAP0017 (MRSA) en PBS				
		0 h	20 min	1 h	2 h	3 h
27	HB2203	1300000	2980	160	30	<10
<i>S. aureus</i> SAP0017 (MRSA) en un 10 % de suero fetal bovino						
SEQ ID	HB nº	0 h	2 h	3 h	5 h	6 h
	un 10 % de suero en PBS	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
2	HB2068	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
3	HB2089	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
26	HB2202	30900000	4850	1250	110	50
27	HB2203	30900000	1927000	142500	68560	34280

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones preferidas de la invención.

5 La infección de heridas es un problema significativo que se exacerba por el aumento de frecuencia de patógenos resistentes a múltiples fármacos como el MRSA. La presente invención se puede aplicar, terapéutica o cosméticamente, para tratar, mejorar y prevenir las afecciones de la piel asociadas a las bacterias incluyendo, acné, dermatitis atópica, rosácea u hongos incluyendo la caspa y el pie de atleta.

10 El *S. aureus* es una causa principal de las infecciones hospitalarias más frecuentemente asociadas con la corriente sanguínea, piel y tejidos blandos, neumonía asistida por ventilación y catéteres. El aumento de frecuencia de infecciones causadas por el *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) es de particular preocupación, especialmente en los Estados Unidos donde la prevalencia es más del 55 % en la unidad de cuidados intensivos y la incidencia produce estancias en el hospital más largas, mayores costes y mayor riesgo de muerte. El MRSA adquirido en comunidad (CA-MRSA) genotípicamente distinto del HA-MRSA también se ha vuelto ahora un temor establecido entre los pacientes sin factores de riesgo tradicionales. Además del *S. aureus*, la bacteria grampositiva *Streptococcus pyogenes* es una causa principal de infecciones complicadas de la piel y estructuras cutáneas (SSTI). La presente invención proporciona una prevención potencial y un tratamiento contra las infecciones asociadas con el MRSA.

20 El acné vulgaris es una enfermedad cutánea humana común, caracterizada por áreas de piel con seborrea, comedones, pápulas, nódulos y posiblemente que dejan cicatrices. Las áreas afectadas por el acné incluyen la cara, la parte superior del pecho y la espalda. El acné grave es inflamatorio, pero el acné también se manifiesta de forma no inflamatoria. La bacteria, *Propionibacterium acnes*, puede causar inflamación que da lugar a lesiones inflamatorias de la dermis alrededor del microcomedón o comedón, lo que da como resultado el enrojecimiento y puede dar como resultado la formación de cicatrices o hiperpigmentación. Los lipopéptidos cortos antimicrobianos se podrían utilizar para el control de las manchas en forma de, pero sin limitarse a, un lápiz, espuma, toallitas, cremas, lociones, pulverizadores, tonificadores y/o limpiadores. Otro uso potencial de la presente técnica en combinación con, pero sin limitarse a, ácido salicílico o retinoides.

30 Foliculitis es la palabra que se utiliza para describir cualquier inflamación de uno o más folículos pilosos en cualquier sitio de la piel incluyendo la pseudofoliculitis barbae tal como los golpes con la afeitadora y la foliculitis del cuero cabelludo especialmente prominente en los hombres afroamericanos. La foliculitis es una infección de los folículos pilosos. Los casos leves tienden a causar picor mientras que los casos graves pueden dar lugar a la formación de cicatrices profundas. Es causada por bacterias que entran en la piel a través de la pequeña abertura del folículo piloso. En la mayoría de los casos de foliculitis, los folículos dañados se infectan luego con bacterias. El picor del barbero es una infección por estafilococos de los folículos pilosos del área de la barba, habitualmente en el labio superior. La Tinea barbae es similar al picor del barbero, pero la infección está causada por hongos. Hay trucos que pueden ayudar a evitar esta afección cutánea, tal como utilizar jabón antibacteriano y champú para la foliculitis del cuero cabelludo.

35 También se ha utilizado hidrocortisona, antibióticos o tretinoína en crema para tratar los golpes de la afeitadora que causan irritación y granos. El amplio espectro de los lipopéptidos antimicrobianos descritos en la presente invención debería ser ideal para los trastornos causados por daño de los folículos, por un folículo bloqueado, por el afeitado, o por la fricción causada por la ropa, tiras de cascos, y similares, en el cuello, garganta o área genital.

40 La caspa es una afección crónica común del cuero cabelludo marcador por el picor y la descamación de la piel en el cuero cabelludo. Las especies de *Malassezia* son levaduras bien conocidas que causan enfermedades de la piel comunes incluyendo la caspa, pitiriasis versicolor, dermatitis seborreica, psoriasis, y dermatitis atópica en seres humanos. La Tinea capitis, también conocida como tiña del pelo o tiña del cuero cabelludo es una infección fúngica superficial del cuero cabelludo. La enfermedad está causada en primer lugar por dermatofitos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* que invaden el tallo piloso. Los casos de infección por *Trichophyton* predominan en Centroamérica y los Estados Unidos y en partes de Europa occidental. La enfermedad es infecciosa y puede transmitirse por seres humanos, animales u objetos que albergan el hongo. también existen estados portadores en los que el hongo está presente en el cuero cabelludo pero no hay signos clínicos o síntomas. El pie de atleta, también

5 conocida como tiña del pie o tinea pedis, también es una infección fúngica de la piel del pie que causa descamación, en copos y picor de las áreas afectadas. Está causado por *Trichophyton* spp. En algunos casos una infección bacteriana secundaria puede acompañar la infección fúngica. Los antifúngicos tales como la terbinafina, itraconazol y fluconazol han empezado a ganar aceptación para el tratamiento. Los lipodipéptidos con actividad de amplio espectro contra bacterias y hongos desvelados en el presente documento podrían tener potencial como tratamiento tópico para la prevención y resolución de las afecciones descritas.

10 La dermatitis atópica (DA) es un trastorno inflamatorio, crónicamente recidivante, no contagioso y prurítico de la piel, que afecta al 15-30 % de niños y un 2-10 % de los adultos. A veces llamada eccema o eccema atópico, la dermatitis atópica es más común en bebés y niños. Se caracteriza por prurito, lesiones eccematosas, xerosis (piel seca), y liquenificación (engrosamiento de la piel y un incremento de las marcas cutáneas). La bacteria más común que se encuentra en la piel con DA es *S. aureus*. De hecho, más del 90% de los pacientes con DA están colonizados por *S. aureus*. en la piel lesional y no lesional frente al 5 % de la piel sana. La piel con DA presentaba una función de barrera epidérmica defectuosa así como una deficiencia en el sistema inmunitario innato de la epidermis como sugiere la disminución de la expresión de péptidos antimicrobianos. Los lipopéptidos descritos en el presente documento con actividad antimicrobiana más antiinflamatoria deberían ser una alternativa para el cuidado de la DA.

20 La halitosis, también conocida como mal aliento, es un término utilizado para describir olores marcadamente desagradables exhalados con la respiración. Se estima que la halitosis es la tercera razón más frecuente de visitas al dentista, siguiendo a las caries y la enfermedad periodontal. El mal aliento y la enfermedad del chicle están causadas por bacterias gramnegativas tales como *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides* spp. Las bacterias también causan una grave inflamación de la capa epitelial de la cavidad oral. Los péptidos selectivos de gramnegativos con actividad antiinflamatoria serían ideales para mantener un cuidado oral saludable

25 El triclosán es un compuesto clorado aromático con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivíricas. Se utiliza en una variedad de productos comunes del hogar, incluyendo jabones, enjuagues bucales, detergentes para vajilla, pasta de dientes, desodorantes y desinfectantes de manos. Los informes han sugerido que el triclosán se puede combinar con cloro en el agua del inodoro formando cloroformo que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos clasifica como un posible carcinógeno humano, lo que significa que probablemente produce cáncer. Los lipodipéptidos antimicrobianos descritos en el presente documento tienen un gran potencial para sustituir al triclosán por sus directas propiedades antibacterianas y antifúngicas sin riesgo carcinogénico.

30 De la misma manera, el olor corporal está influenciado por la acción de miembros de *Corynebacterium*. La propiedad antimicrobiana de la técnica descrita puede incorporarse en polvos cosméticos, geles, semisólidos, cremas u otras formas de desodorantes de la axila o pie.

35 La vaginosis bacteriana (VB) es la causa más general de infección vaginal conocida como vaginitis. Normalmente no se considera una 'infección de transmisión sexual'. La vaginosis bacteriana afecta del 20 % al 70 % de mujeres. El fuerte olor y exudación vaginal anormal son los síntomas más comunes de la enfermedad aparte de las sensaciones de picor y quemazón. La candidiasis vaginal es una infección de la vagina que implica el sobre crecimiento de una levadura u hongo, conocido como Candida. Esta levadura está presente normalmente en la boca, intestino y vagina, como varios otros organismos. Si el equilibrio de los microorganismos se altera como puede ocurrir cuando se toman antibióticos de amplio espectro, fluctuaciones hormonales, y otras afecciones, puede producirse una sobre crecimiento de levaduras. La candidiasis vaginal, a la que se hace referencia a menudo como "infección por levaduras", es un problema común, que afecta casi al 75 % de las mujeres adultas en su vida. También se asocian con la inflamación vaginal las *Candida* spp no albicans tales como *C. glabrata* y *C. tropicalis*; Herpes y Grupo B de *Streptococcus*. Las condiciones varían y pueden empeorar debido a la pérdida de *Lactobacillus* spp, un comensal natural que funciona como una barrera protectora contra los patógenos oportunistas. Por lo tanto el uso de los péptidos antimicrobianos desvelados en el presente documento para controlar los microbios indicados, en pero sin limitarse a lubricantes, por ejemplo, pueden proporcionar un cuidado eficaz como productos de higiene femenina.

50 Los fabricantes de cosméticos añaden conservantes químicos al maquillaje y lociones para destruir bacterias y extender la vida de almacenamiento de estos productos. Sin embargo, algunos conservantes causan erupciones y otras reacciones alérgicas, y los estudios han unido algunos de estos agentes con el cáncer y otros problemas de la salud. Los conservantes con parabeno sintético tales como el metilparabeno, butilparabeno y etilparabeno se encuentran en más del 70 por ciento de los cosméticos, lociones cutáneas y desodorantes. Los conservantes de parabeno replican los efectos de los estrógenos. Incluso una pequeña cantidad de estos potentes químicos pueden anular el equilibrio del sistema hormonal natural del cuerpo. Los desequilibrios hormonales desencadenados artificialmente se han unido al cáncer de mama en las mujeres y la deficiencia de testosterona en chicos jóvenes. La industria cosmética también utiliza el formaldehído como conservante. Incluso aunque la cantidad añadida al maquillaje es pequeña, puede producir una reacción alérgica en los que son sensibles al químico. Por lo tanto, una de las aplicaciones potenciales de los lipodipéptidos antimicrobianos de amplio espectro descritos, como son baratos, podrían sustituir los químicos perjudiciales como conservantes para la industria cosmética.

60 Las composiciones utilizadas para suministrar los péptidos en el procedimiento terapéutico anterior puede ser un aerosol, una emulsión, un líquido, loción, crema, pasta, ungüento, polvo o espuma, u otra formulación

farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, los péptidos se pueden suministrar utilizando menos formulaciones implicadas tales como agua desionizada/destilada, PBS o soluciones salinas médicas convencionales. En general, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier vehículo adecuado para su uso en la piel humana. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen etanol, dimetil sulfoxido, glicerol, sílice, alúmina, almidón, y vehículos y diluyentes equivalentes. La formulación puede tener adicionalmente una denominación cosmética, y/o contener otros agentes tales como retinoides u otros péptidos que pueden actuar como adyuvantes para la acción terapéutica de los péptidos de la invención. También se pueden añadir antibióticos a la formulación con el fin de repeler la infección, permitiendo de esta manera que se produzcan procesos de cicatrización máximos. La concentración del péptido en la composición puede ser aproximadamente de 0,1 [tg/ml a aproximadamente 50 [tg/ml o aproximadamente 0,1 [tg/ml a aproximadamente un 10 % (p/v); sin embargo la última concentración empleada puede variar fuera de estos intervalos, dependiendo de la naturaleza de la herida/tejido afectado, la bioactividad del péptido de la invención y el uso de cualquier adyuvante o técnica para obtener el aumento de la absorción de la composición.

Las composiciones de la presente invención pueden contener uno o más agentes adicionales que ejerzan actividad de cuidado de la piel.

En una realización preferida de la presente invención, cuando la composición se va a poner en contacto con el tejido queratinoso humano, cualquier componente adicional aparte de los péptidos de la invención deberían ser adecuados para la aplicación al tejido queratinoso; es decir, cuando se incorporan en la composición, dichos otros componentes demuestran una toxicidad innecesaria, incompatibilidad, respuesta alérgica, y similares en el ámbito del sano juicio médico. El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992) describe una amplia variedad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitantes utilizados comúnmente en la industria de cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de estas clases de ingredientes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como aromas, pigmentos, colores/colorantes, aceites esenciales, pieles sensibles, astringentes, etc., (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, metil lactato, avellano de bruja destilado), agentes antiacné, agentes antiapelmazantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, yodopropil butilcarbamato), antioxidantes, aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tampón, agentes de volumen, agentes quelantes, aditivos químicos, biocidas cosméticos, desnaturizantes, fármacos astringentes, analgésicos externos, formadores o materiales de película, agentes opacificantes, ajustadores del pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes blanqueantes e iluminadores de la piel (por ejemplo, hidroquinona, ácido kójico ácido ascórbico, fosfato de ascorbilo magnesio, ascorbil glucosamina), agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, humectantes), lenitivos cutáneos y/o agentes de cicatrización (por ejemplo, pantenol y sus derivados, aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol, y glicirricinato dipotásico), agentes de tratamiento de la piel, espesantes, y vitaminas y derivados de los mismos.

La administración de las composiciones de la invención puede hacerse en humanos y animales, incluyendo todos los mamíferos. La aplicación puede hacerse en combinación con materiales típicos y/o experimentales tales como injertos de tejido, productos del cultivo tisular, oxígeno y vendajes.

Listado de vendajes utilizados comúnmente

Categorías de vendajes para heridas	Productos
Películas	Bioclusive™ (Johnson & Johnson Medical, Inc)
	Omiderm™ (omicron Scientific Ltd.),
	Opsite* (Smith & Nephew United, Inc)
	Polyskin II transparent dressing (Kendall Healthcare)
	Tegaderm™ (3M Health Care)
Hidrogeles	Intrasite™ (Smith & Nephew United, Inc),
	Nu-Gel ^s (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	Vigilon® (Bard Medical Division)
Hidrocoloides	Comfeel® (Coloplast Sween Corp.)
	DuoDerm® (ConvaTec)
	Restore™ (Hollister Incorporated)
Polisacáridos	Bard Absorption Dressing ^g (Bard Medical Division)
	Debrisan (Johnson & Johnson Medical, Inc.)
	DuoDerm ^o Granules (ConvaTec®)
Alginatos	Kaltostat ^o (ConvaTec®)
Vendajes de espuma	Sorbsan™ (Dow Hickam Pharmaceuticals Inc)
	Allewyn ^g (Smith & Nephew United, Inc)
	Lyof foam® (Acme United Corporation)
Laminados	Biobrane® (Dow Hickam Pharmaceuticals Inc)

(continuación)

Categorías de vendajes para heridas	Productos
(*) Los asteriscos se refieren a marcas comerciales individuales	

5 En general, la composición se puede administrar por vía oral, transdérmica, sistémica, o mediante otro procedimiento conocido por los expertos en la técnica que sean útiles para suministrar los péptidos de la invención en el sitio de la lesión. Las composiciones también se pueden aplicar de manera *in vitro* o *ex vivo*, sea a las células o injertos del paciente que crecen en cultivo, por ejemplo.

10 Debido a su pequeño tamaño, se espera que los péptidos sean capaces de tener por sí mismos algún nivel de permeabilidad a través de la piel, sin embargo, se pueden utilizar ciertas técnicas para amplificar este movimiento. Por ejemplo, se pueden añadir a los péptidos grupos lipófilos (no polares), se pueden suministrar los péptidos en la piel en un excipiente lipófilo, con el fin de aumentar la accesibilidad del péptido al estrato córneo para permitir la translocación de las capas epidérmicas inferiores. De esta manera dichas modificaciones lipófilas se pueden considerar profármacos. Se pueden utilizar aumentadores de penetración tales como disolventes y tensioactivos conocidos en el excipiente para permitir una mejor absorción del péptido. Técnicas especiales que se anticipa que son útiles en aumentar el acceso del péptido al tejido/lesión objetivo incluyen la iontoforesis, electroforesis y ultrasonidos.

15 Un dispositivo iontoforético consiste en dos electrodos sumergidos en una solución de electrolitos y se coloca sobre la piel. Cuando se aplica una corriente eléctrica a través de los electrodos, se crea un campo eléctrico a través del estrato córneo que dirige el suministro de los péptidos. La electroporación implica la aplicación de pulsos eléctricos de alta tensión para aumentar la penetración a través de bicapas lipídicas. Esto se diferencia de la iontoforesis en la duración e intensidad de la aplicación de la corriente eléctrica (la iontoforesis utiliza un campo eléctrico de baja tensión relativamente constante). Se cree que el pulso eléctrico de alta tensión de la electroporación induce la formación reversible de poros hidrófilos en las láminas lipídicas de la membrana que puede proporcionar un alto grado de aumento de penetración. Los ultrasonidos aplican ondas de sonido que tienen una frecuencia mayor de 16 kHz en la piel, lo que produce la compresión y expansión del tejido a través del que viajan las ondas sonoras. Las variaciones de presión resultantes producen varios procesos (por ejemplo, cavitación, mezcla, aumento de temperatura) que

20 pueden aumentar la penetración de los péptidos.

25

Todas las formulaciones y usos de péptidos anteriores se conocen bien en la técnica. Se describen modos adicionales de preparación y utilización de los péptidos inventivos se describen por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.º 6.492.326 y 6.974.799.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la prevención o tratamiento de una infección microbiana de la piel o el tejido mucoso de un mamífero, comprendiendo la composición un péptido de fórmula C_{12-18} lípido-lisina-prolina- NH_2 o C_{12-18} lípido-lisina-d-prolina- NH_2 ; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es: C_{12-18} lípido-lisina-prolina- NH_2 .
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido es:
10 palmitoil--lisina-prolina- NH_2 o
palmitoil--lisina-d-prolina- NH_2 .
4. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la infección bacteriana está causada por una bacteria seleccionada de entre el grupo que consiste en *P. acnes*, *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*.
- 15 5. Una composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la infección microbiana de la piel es acné, dermatitis atópica, rosácea, vaginosis bacteriana, caspa o pie de atleta.