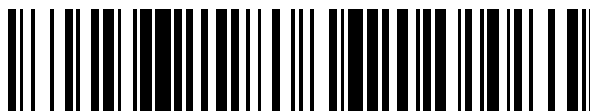


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 662**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2014 PCT/GB2014/052911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15044669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014 E 14781264 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3049056**

54 Título: **Composición tópica antifúngica y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:

25.09.2013 GB 201317005

25.11.2013 GB 201320723

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

24.01.2020

73 Titular/es:

**BLUEBERRY THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
The Biohub Alderley Park, Alderley Edge
Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB**

72 Inventor/es:

**RIDDEN, JOHN;
DAVIES, MICHAEL y
GOOD, LIAM**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 738 662 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

Composición tópica antifúngica y métodos de tratamiento

Campo técnico de la invención

5 La invención se refiere a una composición tópica (y a métodos de producción de dichas composiciones) para el tratamiento de una infección fúngica de la piel o las uñas que comprende un polímero capaz de formar nanopartículas y un agente antifúngico, que es terbinafina.

Antecedentes de la invención

10 Las infecciones fúngicas son cada vez más comunes tanto en los seres humanos como en los animales, pero el tratamiento de dichas infecciones sigue siendo problemático debido a la toxicidad de las composiciones antifúngicas, mala solubilidad de dichas composiciones y la localización remota de algunas infecciones que pueden resultar difíciles de alcanzar usando formulaciones medicinales tradicionales.

Por tanto, por ejemplo, el documento de patente, tal como US 2010/021530, desvela un método de administración de un agente antiinfeccioso a través de la uña de un sujeto que tiene una infección de las uñas con un sistema de calor que mantiene la estructura de la uña a una temperatura de 37-45 °C.

15 Se descubrió en los años 60 un amplio espectro de antifúngicos tales como anfotericina B, hamicina, filipina y nistatina. Pero debido a la toxicidad, solo la hamicina y la nistatina se usan por vía tópica y la anfotericina B por vía sistémica. Fue un descubrimiento en la terapia antifúngica la introducción de azoles, especialmente ketoconazol. Las principales clases de los antifúngicos actualmente usados son polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos y pirimidinas. Sin embargo, los polienos son tóxicos para las células de mamífero. Los azoles son bien tolerados por
20 vía tópica, pero tienen efectos secundarios cuando se administran por vía sistémica y ha habido varios informes de resistencia a azoles. La flucitosina es la pirimidina más común usada. Aunque tiene excelente penetración tisular, se puede desarrollar rápidamente resistencia contra la flucitosina y producir efectos secundarios gastrointestinales. Los lipopéptidos muestran baja toxicidad y todavía están en curso varios ensayos para probar la eficacia.

25 El desarrollo de nuevos antifúngicos está restringido debido a que los hongos son eucariotas y si se rompen las dianas celulares también pueden dañar las células hospedadoras. El aumento en las infecciones fúngicas y el aumento en el uso de antifúngicos ha producido la emergencia de resistencia entre hongos. La resistencia antifúngica tiene un alto impacto clínico, ya que las enfermedades fúngicas están causando un aumento en la morbilidad y mortalidad de pacientes inmunodeprimidos.

30 Se estima que aproximadamente el 40 % de los fármacos recién descubiertos fracasan debido a la ausencia de una administración apropiada debido a problemas de solubilidad acuosa. En el caso de la administración tópica de fármacos, las propiedades de barrera de la piel frecuentemente requieren potenciadores de la permeación para lograr la dosis requerida de fármacos.

35 La onicomiosis (más comúnmente conocida como infección fúngica de las uñas) provoca el engrosamiento, decoloración, desfiguración y partición de las uñas. Sin tratamiento, las uñas se pueden volver tan gruesas que presionan contra el interior de los zapatos, causando presión, irritación y dolor. Existen riesgos de complicaciones adicionales, especialmente en pacientes con diabetes, aquellos con enfermedad vascular periférica y el paciente inmunodeprimido. La infección fúngica de las uñas puede provocar problemas psicológicos y sociales. La incidencia de la infección fúngica de las uñas aumenta con la edad y tiene una prevalencia de ~30 % en las personas de más de 60 años con incidencia significativa en Europa con niveles incluso mayores en Asia. La infección fúngica de las
40 uñas puede afectar a una o más uñas del pie y/o uñas de las manos y puede destruir completamente la uña si se deja sin tratar.

45 El actual tratamiento para la infección fúngica de las uñas es como laca/pintura tópica para las uñas (tal como amorolfina) 1-2 veces por semana durante 6-12 meses y/o antifúngicos orales (tales como terbinafina o itraconazol). Los antifúngicos orales pueden tener efectos secundarios intensos tales como dolor gastrointestinal y pueden incluso dar como resultado insuficiencia hepática. Comúnmente se informa de una recaída en 25-50 % de los casos y muchos pacientes no se comprometerán con el ciclo de tratamiento debido a los efectos secundarios predichos y la duración del tiempo de tratamiento y frecuentemente solo empezarán el tratamiento cuando la enfermedad se vuelva más agresiva. Los actuales tratamientos orales o tópicos pueden durar 6-12 meses hasta que funcionen. Los
50 tratamientos orales tienen que saturar la circulación sistémica para llegar a los dedos de los pies y la elevada dosis aumenta el riesgo de complicaciones gastrointestinales y hepáticas. Los tratamientos tópicos son ineficaces en penetrar en la uña engrosada y requieren nuevamente alta dosis.

55 El pie de atleta (conocido de otro modo como tiña del pie, Tinea pedis o pie de mocasín) es una infección fúngica de la piel provocada generalmente por hongos del género *Trichophyton* (los más comunes *T. rubrum* o *T. mentagrophytes*). Los diversos hongos parasíticos que provocan el pie de atleta también pueden provocar otra infección de la piel tal como onicomiosis y tinea cruris. Aunque es distinta de la infección fúngica de las uñas, el pie de atleta también tiene problemas con el cumplimiento y la duración del tratamiento.

La aspergilosis es causada por una infección de los pulmones provocada por hongos *Aspergillus*. La infección participa en varias afecciones tales como tuberculosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La infección puede ser frecuentemente difícil de tratar incluso cuando se utilice un enfoque de terapia de combinación. Las infecciones por *Aspergillus* son cada vez más resistentes a los triazoles.

5 La queratitis fúngica es la inflamación de la córnea provocada por una infección fúngica. Se usa frecuentemente suspensión oftálmica de natamicina para infección fúngica filamentosa, mientras que se recomienda la disolución oftálmica de fluconazol para infecciones por *Candida*. Se usan colirios de anfotericina B para casos difíciles de tratar, sin embargo, estos colirios pueden ser tóxicos en un individuo.

10 La candidiasis oral es una infección fúngica de las membranas mucosas de la boca por especies de *Candida*. Puede ser particularmente problemática en pacientes inmunodeficientes donde es frecuentemente difícil de tratar satisfactoriamente.

15 Es un objeto de la presente invención tratar uno o más de los problemas anteriores asociados a los actuales tratamientos antifúngicos. También es un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento antifúngico tópico. Es además un objeto de la presente invención proporcionar un tratamiento que permita la mejor penetración del agente antifúngico a través de varios tejidos corporales, tales como la uña y/o dermis, membranas mucosas y córnea y/o esclerótica.

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que se encuentre fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo para fines de información.

20 Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia (o diagnóstico).

Sumario de la invención

25 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición tópica para el tratamiento de una infección fúngica que comprende un polímero capaz de formar nanopartículas y un agente antifúngico, en donde el polímero comprende una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, análogo o su derivado y el agente antifúngico comprende terbinafina.

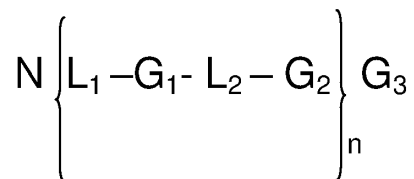
30 Formando nanopartículas de polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida y terbinafina, los inventores han encontrado ventajosamente que los agentes antifúngicos son absorbidos por las células mucho más eficientemente y así se pueden formular en un medicamento tópico que tiene no solo un perfil de liberación más lento, sino también una dosis terapéutica reducida que se puede administrar por vía local en vez de por vía sistémica, eliminando así el peligro de algunos agentes antifúngicos administrados por vía oral. Combinando un sistema de administración de nanopolímeros seguro con un potente agente antifúngico, se puede proporcionar un tratamiento tópico que puede mejorar la eficacia y posiblemente reducir los actuales plazos de tratamiento para infecciones de 6 meses a 6 semanas.

35 El término "composición tópica" pretende significar una composición que se aplica (o se puede aplicar) a una superficie exterior de la superficie del cuerpo, tal como la piel, y las uñas.

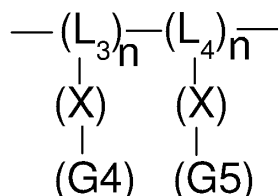
40 El término "nanopartícula" pretende significar una estructura que tiene un diámetro medio en el intervalo aproximado de 0,5 - 200 nm. Preferentemente, las nanopartículas estarán en el intervalo de 1 a 150 nm, más preferentemente en el intervalo de 2 a 120 nm y lo más preferentemente 5 a 120 nm. En algunos casos, se prefiere que las nanopartículas estén en un intervalo superior de aproximadamente 100 a 120 nm, más preferido en el intervalo de 50 a 175 nm, incluso más preferido en el intervalo de 75 a 150 nm y lo más preferido en el intervalo de 110 a 140 nm. En otros casos, se prefiere que las nanopartículas estén en un intervalo más bajo de 0,5 a 10 nm, más preferido en el intervalo de 0,5 a 8 nm, incluso más preferido 1 a 7 nm y lo más preferido aproximadamente 7 nm o más bajo. El término "agente antifúngico" pretende cubrir un intervalo de compuestos y moléculas que son capaces de inhibir el crecimiento y/o la supervivencia de hongos que provocan una infección fúngica.

45 Se prefiere que el polímero comprenda una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, análogo o su derivado. La polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, análogo o su derivado puede ser según la siguiente fórmula 1a o fórmula 1b, con ejemplos proporcionados en las Tablas A y B a continuación:

Fórmula 1a



Fórmula 1b

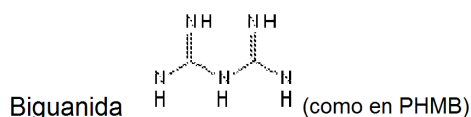


en donde:

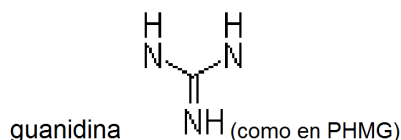
5 "n", se refiere al número de unidades repetidas en el polímero, y n puede variar desde 2 hasta 1000, por ejemplo desde 2 o 5 hasta 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800 o 900;

G₁ y G₂ representan independientemente un grupo catiónico que comprende biguanida o guanidina, en donde L₁ y L₂ se unen directamente a un átomo de nitrógeno de la guanida. Así, los grupos biguanida o guanidina son integrantes del esqueleto de polímero. Los grupos biguanida o guanidina no son restos de cadena lateral en la fórmula 1a.

10 Ejemplo de grupos catiónicos:



o



15 En la presente invención, L₁ y L₂ son los grupos de enlace entre los grupos catiónicos G₁ y G₂ en el polímero. L₁ y L₂ pueden representar independientemente un grupo alifático que contiene C₁-C₁₄₀ átomos de carbono, por ejemplo un grupo alquilo tal como metileno, etileno, propileno, C₄ C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀; alquilo C₁-C₁₀, -C₂₀, -C₃₀, -C₄₀, -C₅₀ - C₆₀, -C₇₀, -C₈₀, -C₉₀, -C₁₀₀, -C₁₁₀, -C₁₂₀, -C₁₃₀ o -C₁₄₀; o L₁ y L₂ pueden ser (independientemente) radicales C₁-C₁₄₀ (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀; C₁-C₁₀, -C₂₀, -C₃₀, -C₄₀, -C₅₀ -C₆₀, -C₇₀, -C₈₀, -C₉₀, -C₁₀₀, -C₁₁₀, - C₁₂₀, -C₁₃₀ o -C₁₄₀), cicloalifáticos, heterocíclicos, aromáticos, arilo, alquilarilo, arilalquilo, oxialquileno, o L₁ y L₂ pueden ser (independientemente) un radical polialquileno opcionalmente interrumpido por uno o más, preferentemente solo un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, grupos funcionales, así como resto cíclico saturado o insaturado. Los ejemplos de L₁ y L₂ adecuados son los grupos enumerados en la Tabla A.

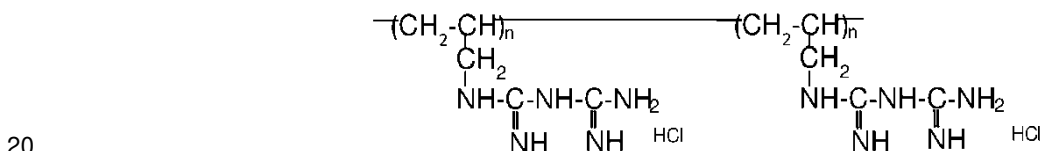
L₁, L₂, G₁ y G₂ se pueden haber modificado usando radicales alifáticos, cicloalifáticos, heterocíclicos, arilo, alcarilo y oxialquileno.

25 N y G₃ son preferentemente grupos terminales. Normalmente, los polímeros de uso en la invención tienen grupos terminales amino (N) terminal y cianoguanidina (G₃) o guanidina (G₃). Dichos grupos terminales se pueden modificar (por ejemplo, con 1,6-diaminohexano, 1,6 di(cianoguanidino)hexano, 1,6-diguanidinohexano, ácido 4-guanidinobutírico) por enlace a radicales alifáticos, cicloalifáticos, heterocíclicos, heterocíclicos, arilo, alquilarilo, arilalquilo, oxialquileno. Además, los grupos terminales se pueden modificar por enlace a ligandos de receptor, dextranos, ciclodextrinas, ácidos grasos o derivados de ácido graso, colesterol o derivados de colesterol o polietilenglicol (PEG). Opcionalmente, el polímero puede terminar con guanidina o biguanida o cianoamina o amina o cianoguanidina en las posiciones N y G₃ o cianoamina en la posición N y cianoguanidina en G₃ o guanidina en las posiciones N y cianoguanidina en G₃ o L₁-amina en G₃ y cianoguanidina en N. G₃ puede ser L₁-amina, L₂-cianoguanidina o L₂-guanidina. Dependiendo del número de polimerización (n) o la rotura de cadenas de polímero y las reacciones secundarias durante la síntesis, la mezcla heterogénea de grupos terminales puede surgir como se

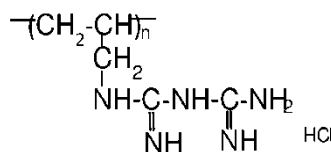
ha descrito anteriormente como un ejemplo. Así, los grupos N y G₃ pueden estar intercambiados/presentes como una mezcla heterogénea, como se observa anteriormente. Alternativamente, N y G₃ pueden estar ausentes y el polímero puede ser cíclico, en cuyo caso los grupos L₁ y G₂ terminales respectivos se unen directamente entre sí.

5 En la fórmula 1b, X puede estar tanto presente como ausente. L₃, L₄ y X son como se observa anteriormente para "L₁ o L₂". Así, L₃ y L₄ y X son los grupos de enlace entre los grupos catiónicos G₄ y G₅ en el polímero. L₃ y L₄ y X pueden representar independientemente un grupo alifático que contiene C₁-C₁₄₀ átomos de carbono, por ejemplo un grupo alquilo tal como metileno, etileno, propileno, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀; alquilo C₁-C₁₀, -C₂₀, -C₃₀, -C₄₀, -C₅₀ - C₆₀, -C₇₀, -C₈₀, -C₉₀, -C₁₀₀, -C₁₁₀, -C₁₂₀, -C₁₃₀ o -C₁₄₀; o L₃ y L₄ y X pueden ser independientemente radicales C₁-C₁₄₀ (por ejemplo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀; C₁-C₁₀, -C₂₀, -C₃₀, -C₄₀, -C₅₀ -C₆₀, -C₇₀, -C₈₀, -C₉₀, -C₁₀₀, -C₁₁₀, - C₁₂₀, -C₁₃₀ o -C₁₄₀), cicloalifáticos, heterocíclicos, aromáticos, arilo, alquilarilo, arilalquilo, oxialquileno, o L₃ y L₄ y X pueden ser independientemente un radical polialquileno opcionalmente interrumpido por uno o más, preferentemente solo un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, grupos funcionales, así como resto cíclico saturado o insaturado. Los ejemplos de L₃ y L₄ y X adecuados son los grupos enumerados en la Tabla B.

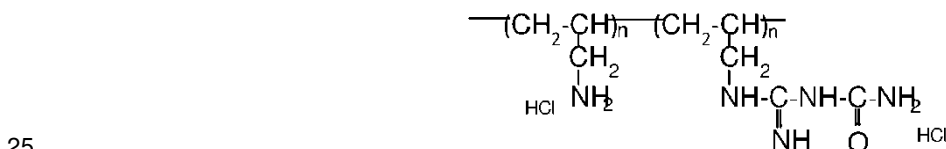
15 "G₄" y "G₅" son restos catiónicos y pueden ser iguales o diferentes. Al menos uno de ellos es un resto de biguanidina o carbamoilguanidina, y el otro resto puede ser como antes (biguanidina o carbamoilguanidina) o amina. Para evitar dudas, en la fórmula 1b, el resto catiónico G₄ y G₅ no contienen solo grupos guanidina individuales. Por ejemplo, G₄ y G₅ normalmente no contienen grupos guanidina individuales. Los ejemplos de dichos compuestos son polialilbiguanida, poli(alilbiguanidino-co-alilamina), poli(alilcarbamoilguanidino-co-alilamina), polivinilbiguanida, como se enumera en la Tabla B. El ejemplo de polialilbiguanida es como se muestra a continuación:



En caso de polialilbiguanidina, L₃ y L₄ son idénticos, G₄ y G₅ son similares, así la polialilbiguanida se puede simplificar como sigue.



El ejemplo de poli(alilcarbamoilguanidino-co-alilamina) es como se muestra a continuación



Los polímeros para su uso en la invención generalmente tendrán contraiones asociados a ellos. Los contraiones adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: haluro (por ejemplo cloruro), fosfato, lactato, fosfonato, sulfonato, amino carboxilato, carboxilato, hidroxí carboxilato, organofosfato, organofosfonato, organosulfonato y organosulfato.

30 Los polímeros para su uso en la invención pueden ser o bien mezclas heterogéneas de polímeros de diferente número "n" o bien fracciones homogéneas que comprenden números "n" especificados purificados por métodos de purificación convencionales. Como se indica anteriormente, los polímeros también pueden ser cíclicos y además pueden estar ramificados.

Los números preferidos para "n" incluyen 2-250, 2-100, 2-80 y 2-50.

35

Tabla A. Ejemplos de polímero análogos que resultan de la fórmula 1a.

Nombre	L ₁	G ₁	L ₂	G ₂
Polihexametilenbiguanida (PHMB)	(CH ₂) ₆	Biguanida	(CH ₂) ₆	Biguanida
Polietilenbiguanida (PEB)	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₂	Biguanida
Polietilentetrametilenbiguanida	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₄	Biguanida
Polietilenhexametilenbiguanida (PEHMB)	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₆	Biguanida
Polipropilenbiguanida, poliaminopropilbiguanida (PAPB)	(CH ₂) ₃	Biguanida	(CH ₂) ₃	Biguanida
Poli-[cloruro de 2-(2-etoxi)-etoxietil]-biguanida] (PEEG)	(CH ₂ CH ₂ O CH ₂ CH ₂ OC H ₂ CH ₂)	Biguanida	(CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂)	Biguanida
Polipropilenhexametilenbiguanida	(CH ₂) ₃	Biguanida	(CH ₂) ₆	Biguanida
Polietilenoctametilenbiguanida	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₈	Biguanida
Polietilendecametilenbiguanida	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₁₀	Biguanida
Polietilendodecametilenbiguanida	(CH ₂) ₂	Biguanida	(CH ₂) ₁₂	Biguanida
Politetrametilenhexametilenbiguanida	(CH ₂) ₄	Biguanida	(CH ₂) ₆	Biguanida
Politetrametilenbiguanida	(CH ₂) ₄	Biguanida	(CH ₂) ₄	Biguanida
Polipropilenoctametilenbiguanida	(CH ₂) ₃	Biguanida	(CH ₂) ₈	Biguanida
Politetramilenoctametilenbiguanida	(CH ₂) ₄	Biguanida	(CH ₂) ₈	Biguanida
Polihexametilendietilentriaminabiguanida	(CH ₂) ₆	Biguanida	CH ₂ -CH ₂ -NH- CH ₂ -CH ₂	Biguanida
Polihexametilenguanida (PHMG)	(CH ₂) ₆	guanidina	(CH ₂) ₆	guanidina
Polietilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₂	guanidina
Polietilentetrametilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₄	guanidina
Polietilenhexametilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₆	guanidina
Polipropilenguanida, poliaminopropilguanida (PAPB)	(CH ₂) ₃	guanidina	(CH ₂) ₃	guanidina
Poli-[2-(2-etoxi)-etoxietil]-guanida	(CH ₂ CH ₂ O CH ₂ CH ₂ OC H ₂ CH ₂)	guanidina	(CH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₂)	guanidina
Polipropilenhexametilenguanida	(CH ₂) ₃	guanidina	(CH ₂) ₆	guanidina
Polietilenoctametilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₈	guanidina
Polietilendecametilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₁₀	guanidina
Polietilendodecametilenguanida	(CH ₂) ₂	guanidina	(CH ₂) ₁₂	guanidina
Politetrametilenhexametilenguanida	(CH ₂) ₄	guanidina	(CH ₂) ₆	guanidina
Polipropilenoctametilenguanida	(CH ₂) ₃	guanidina	(CH ₂) ₈	guanidina
Politetrametilenguanida	(CH ₂) ₄	guanidina	(CH ₂) ₄	guanidina
Polihexametilendietilentriaminaguanida	(CH ₂) ₆	guanidina	CH ₂ -CH ₂ -NH- CH ₂ -CH ₂	guanidina

Números CAS para los compuestos de ejemplo que resultan de la fórmula 1a

Polímero	Número CAS
Clorhidrato de polihexametilenbiguanida (PHMB)	27083-27-8 32289-58-0
Clorhidrato de polihexametilenguanidina (PHMG)	57028-96-3
Poli-[cloruro de 2-(2-etoxi)-etoxietil]-guanidinio] (PEEG)	374572-91-5

Tabla B. Ejemplos de análogos de polímero que resultan de la fórmula 1b.

Nombre	L ₃	G ₄	L ₄	G ₅	x
Polialilbiguanida	(CH ₂ -CH)	Biguanida	(CH ₂ -CH)	Biguanida	CH ₂
poli(alilbiguanidino-co-alilamina)	(CH ₂ -CH)	amina	(CH ₂ -CH)	biguanida	CH ₂
poli(alilcarbamoilguanidino-co-alilamina)	(CH ₂ -CH)	amina	(CH ₂ -CH)	Carbamoilguanidina	CH ₂
polivinilbiguanida	(CH ₂ -CH)	Biguanida	(CH ₂ -CH)	biguanida	ausente

5 El polímero usado en el método de la invención puede comprender moléculas lineales, ramificadas o dendrímeras. El polímero puede comprender una combinación de moléculas lineales, ramificadas o dendrímeras. El polímero puede comprender una o cualquier combinación de moléculas de fórmula 1a o fórmula 1b, por ejemplo como se ha descrito anteriormente.

10 Por ejemplo, el polímero puede comprender uno o más de polihexametilenbiguanida (PHMB), polihexametilenmonoguanida (PHMG), polietilenbiguanida (PEB), politetrametilenbiguanida (PTMB) o polietilhexametilenbiguanida (PEHMB). Algunos ejemplos se enumeran en la Tabla A y B.

Así, el polímero puede comprender mezclas homogéneas o heterogéneas de uno o más de polihexametilenbiguanida (PHMB), polihexametilenmonoguanida (PHMG), polietilenbiguanida (PEB), politetrametilenbiguanida (PTMB), polietilhexametilenbiguanida (PEHMB), polimetilenbiguanidas (PMB), poli(alilbiguanidino-co-alilamina), poli(N-vinilbiguanida), polialilbiguanida.

15 El polímero más preferido comprende polihexametilenbiguanida (PHMB).

20 Las nanopartículas se pueden formar con y/o en presencia de terbinafina. Se pueden usar diversos métodos para formar las nanopartículas y se prevé que las nanopartículas se formen como un complejo de polímero y agente antifúngico, en donde el polímero comprende una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, análogo o su derivado y el agente antifúngico comprende terbinafina. Sin embargo, las nanopartículas de polímero se pueden formar independientemente y luego se incuban con terbinafina de manera que se absorban o unan a las nanopartículas de tal forma que retengan su eficacia contra los hongos.

25 En una realización de la presente invención, un agente antifúngico normalmente administrado por vía sistémica está presente en una cantidad de dosificación dentro de la composición que es inferior a la dosis sistémica terapéuticamente eficaz de terbinafina. Como la composición tópica puede administrar más eficazmente el agente antifúngico al sitio de infección, se puede reducir la dosificación y esto puede reducir los posibles problemas toxicológicos con algunos agentes.

30 Será evidente para el destinatario experto que la composición puede comprender además uno o más de los siguientes componentes: tampones, excipientes, aglutinantes, aceites, agua, emulsionantes, glicerina, antioxidantes, conservantes y fragancias, o cualquier componente adicional normalmente encontrado en cremas y pomadas tópicas. Además, la composición podría estar en varias formas tales como una pasta o una suspensión para su uso con un dispositivo de pulverización, o formularse para su uso conjuntamente con un sistema de administración de matrices de micro-agujas. Si se emplea una matriz de micro-agujas, entonces se puede incorporar en un parche adhesivo.

35 Para ciertas aplicaciones, la composición puede comprender además un agente de permeación para permitir la administración del agente antifúngico al área infectada. Por ejemplo, se puede usar urea para permitir que las nanopartículas blanqueen la uña de un individuo que padece una infección fúngica de las uñas donde la infección está debajo o en la propia uña.

40 La composición de la invención también se puede administrar por vía intranasal o por inhalación y se puede administrar convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de espray en aerosol de un recipiente presurizado, bomba, espray o nebulizador con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo

- diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado, bomba, espray o nebulizador puede contener una disolución o suspensión de la composición, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que además puede contener un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla en polvo de la composición de la invención y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.
- Las formulaciones de aerosol o en polvo seco están preferentemente dispuestas de manera que cada dosis medida o "descarga" contenga al menos 1 µg de la composición para administración al paciente. Se apreciará que la dosis diaria total con un aerosol variará de paciente a paciente, y se puede administrar en una dosis única o, más normalmente, en dosis divididas a lo largo del día.
- Alternativamente, la composición de la invención se aplica por vía tópica en forma de una loción, disolución, crema, pomada o polvo para espolvorear. La composición de la invención también se puede administrar por vía transdérmica, por ejemplo, usando un parche para la piel.
- Para uso oftálmico, la composición de la invención se puede formular usando sistemas de nanopartículas o como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica de pH ajustado o, preferentemente, como disoluciones en solución salina estéril isotónica de pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de bencilalconio. Alternativamente, se pueden formular en una pomada tal como petrolato.
- Para administración por vía tópica a la piel, la composición de la invención se pueden formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspendidos o disueltos en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina filante, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, se pueden formular como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.
- La composición tópica como se describe anteriormente en el presente documento se puede usar para tratar varias infecciones fúngicas. Sin embargo, es particularmente apta para tratar infección fúngica de las uñas, pie de atleta u otros tipos de infección fúngica de la piel / infecciones por dermatofitos (tales como tiña de la ingle (*Tinea cruris*), tiña del cuerpo (*Tinea corporis*), tiña del cuero cabelludo (*Tinea capitis*), otras infecciones de tipo "tiña"). La invención también será apta para tratar infecciones por levadura tales como, pero no se limitan a, intertrigo, pitiriasis versicolor y candidiasis (*Candida albicans*).
- El agente antifúngico empleado está por supuesto ampliamente controlado por su eficacia contra los hongos causantes de la infección. El agente antifúngico puede comprender uno o más agentes adicionales seleccionados del siguiente grupo: Nistatina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina.
- La infección fúngica puede comprender una infección dermatofítica. Sin embargo, la presente invención también se puede usar para tratar infecciones y/o colonización por levaduras.
- En la presente invención, se proporciona un medicamento tópico que comprende una combinación en nanopartículas de polihexametilenbiguanida y un agente antifúngico, terbinafina, para el tratamiento de una infección fúngica.
- Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de polihexametilenbiguanida (PHMB) para formar una o más nanopartículas con, o asociadas a, terbinafina en la preparación de un medicamento tópico. Las nanopartículas se usarán como el vehículo de administración para el agente antifúngico a un área infectada y también forma un efecto sinérgico cuando se tratan infecciones fúngicas. Será evidente para el destinatario experto que el uso de PHMB será para formar una composición como se describe anteriormente en el presente documento con referencia al primer aspecto de la invención.
- Según todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método de producción de una composición tópica para el tratamiento de una infección fúngica que comprende mezclar un polímero, en donde el polímero comprende una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, análogo o su derivado, capaz de formar nanopartículas con terbinafina en condiciones adecuadas para permitir la formación de nanopartículas. Otra vez, será evidente que el método se empleará para producir una composición como se describe anteriormente en el presente documento.
- En todavía un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una combinación de una composición que comprende un polímero capaz de formar nanopartículas y un agente antifúngico, en donde el polímero comprende una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica y el agente antifúngico comprende terbinafina, y una matriz de micro-agujas para su uso en el tratamiento de una infección fúngica de las uñas. La

matriz de micro-agujas se puede incorporar en un parche adhesivo. Las micro-agujas pueden ser inferiores a 2 mm de longitud. Más preferentemente, las micro-agujas son inferiores a 1,5 mm de longitud. Lo más preferentemente, las micro-agujas son inferiores a 1 mm de longitud. Preferentemente, menos de 500 μm de las micro-agujas se insertan en la piel. Más preferentemente, menos de 400 μm de las micro-agujas se insertan en la piel. Lo más preferentemente, aproximadamente 300 – 200 μm de las micro-agujas se insertan en la piel. Preferentemente, las micro-agujas administran la composición a la dermis y/o epidermis.

Descripción detallada de la invención

Ahora se describirán las realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo solo, con referencia a los siguientes experimentos y figuras adjuntas, en las que:

10 La Figura 1 es un gráfico que muestra la reducción en la concentración mínima inhibitoria (CMI) de antifúngicos contra *Saccharomyces cerevisiae* *EBY100*, cuando se combinan con PHMB. Los cuadrados rellenos representan CMI de fármaco solo y los círculos rellenos representan CMI de fármaco cuando se combina con PHMB. La reducción en veces en CMI de cada fármaco es: nistatina - 2 veces, anfotericina B - 4 veces, berberina - 2 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina - 8 veces;

15 la Figura 2 es un gráfico que muestra la CMI de antifúngicos contra *Saccharomyces cerevisiae* *NOD 24*, cuando se combinan con PHMB. Los cuadrados rellenos representan CMI de fármaco solo y los círculos rellenos representan CMI de fármaco cuando se combina con PHMB. La reducción en veces en CMI de cada fármaco es: nistatina - 4 veces, anfotericina B - 16 veces, berberina - 16 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina - 16 veces;

20 la Figura 3 es un gráfico que muestra la reducción en CMI de antifúngicos contra *Candida albicans*, cuando se combina con PHMB. Los cuadrados rellenos representan CMI de fármaco solo y los círculos rellenos representan CMI de fármaco cuando se combina con PHMB. La reducción en veces en CMI de cada fármaco es: nistatina - 2 veces, anfotericina B - 2 veces, berberina - 2 veces, ketoconazol - 4 veces y terbinafina - 4 veces;

25 las Figuras 4A - 4E son gráficos que muestran los cambios en la fluorescencia / absorbancia de agentes antifúngicos cuando se combinan con PHMB. Se probaron los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de los compuestos fluorescentes en presencia y ausencia de PHMB. Disminuyó la fluorescencia de ketoconazol (Fig. 4A), anfotericina B (Fig. 4B), berberina (Fig. 4C) y nistatina (Fig. 4D) (extinción de fluorescencia). Se probaron los cambios en la absorbancia de terbinafina en presencia y ausencia de PHMB y se encontró que aumentó (efecto hipercrómico) (Fig. 4E);

30 la Figura 5 (a) y (b) son gráficos que muestran la distribución de tamaño de partículas formadas probadas usando dispersión dinámica de luz. La Figura 5 (a) muestra la distribución del tamaño de partículas (tamaño medio = $22,22 \pm 1,591$ nm) formadas cuando se combinó berberina con PHMB en la relación 1:3, mientras que la Figura 5 (b) muestra la distribución del tamaño de partículas formada cuando se combinó ketoconazol con PHMB en la relación 1:3. Tamaño promedio del pico 1 = $1,15 + 0,017$, tamaño promedio del pico 2 = $5,88 \pm 0,71$ y tamaño promedio del pico 3 = $498,9 + 65,2$;

35 la Figura 6 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de *C. albicans* que muestran la potenciada administración de berberina cuando se combina con PHMB. A = *C. albicans* sin tratar teñida con DAPI, por tanto el núcleo es azul. B = *C. albicans* tratada con $1 \mu\text{g/mL}$ de berberina solo que muestra fluorescencia verde dentro del citoplasma debido a la liberación de una pequeña cantidad de berberina. C = *C. albicans* tratada con $1 \mu\text{g/mL}$ de berberina y $1,25 \mu\text{g/mL}$ de PHMB que muestra fluorescencia verde potenciada del citoplasma que indica elevada administración de berberina. Barra = $5 \mu\text{m}$;

45 la Figura 7 es un gráfico que muestra el análisis de citometría de flujo de células de *C. albicans* positivas para berberina cuando se tratan con berberina sola y con combinación de berberina y PHMB. El % de células se representa como la media de triplicados \pm DE. Esta figura indica que como la concentración de PHMB aumenta desde $1,25$ hasta $5 \mu\text{g/mL}$, existe un aumento en la administración en células. Para cada concentración de berberina, las columnas son del siguiente modo: Berberina sola, $1,25 \mu\text{g/mL}$ de PHMB; $2,5 \mu\text{g/mL}$ de PHMB; y $5 \mu\text{g/mL}$ de PHMB;

la Figura 8 es un gráfico que muestra el tamaño de nanopartículas / concentración de nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

50 la Figura 9 es un gráfico que muestra el tamaño de nanopartículas / intensidad relativa de nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

la Figura 10 es un gráfico que muestra el gráfico 3D de tamaño de nanopartículas / intensidad relativa de nanopartículas producidas que comprenden terbinafina y PHMB;

la Figura 11 es un diagrama de vista en planta de un dedo con una uña que se va a tratar con un parche de micro-agujas para administrar la composición de la presente invención;

la Figura 12 es un diagrama en sección transversal de un dedo como se muestra en la Figura 11; y

la Figura 13 es un diagrama en sección transversal de un parche de micro-agujas.

El objetivo de los siguientes experimentos fue investigar si se podría potenciar la administración celular de antifúngicos usando un sistema de administración basado en nanotecnología con el polímero catiónico polihexametilenbiguanida (PHMB). Los experimentos también exploraron una nueva estrategia de combinar antifúngicos con PHMB que pueden formar nanopartículas con moléculas pequeñas. PHMB es un desinfectante y antiséptico barato fácilmente disponible usado comúnmente en apósitos, piscinas y disoluciones para lentillas. Se cree que su acción antiséptica funciona rompiendo las membranas celulares de organismos y provocando así la fuga del contenido celular. Los experimentos también evaluaron si la combinación de un agente antifúngico y PHMB permitiría una reducción en la dosis de fármaco, por consiguiente reducción en la toxicidad y/o aumento en la internalización del fármaco y agente y si hubo efecto sinérgico.

Los experimentos se centraron en antifúngicos que tienen dianas intracelulares para acción antifúngica y se usan actualmente en la clínica, pero son menos preferidos debido a problemas de solubilidad, toxicidad y resistencia. Junto con los antifúngicos clínicamente usados también se estudió un novedoso candidato, la berberina, con actividad antifúngica probada *in vitro* (Zhao et al., (2010) J. Therm. Analysis and Calorimetry, 102, 49-55). Los candidatos seleccionados se ilustran a continuación en la Tabla 1. Solo la terbinafina está en el alcance de las reivindicaciones.

Tabla 1

Fármacos	Clase	Mecanismo de acción	Motivos para la selección	Usos actuales
Nistatina	Polieno	Se une a ergosterol y provoca perturbación en la membrana celular, provocando así la fuga del contenido celular	Acción intracelular y toxicidad a dosis más altas	Infecciones por <i>Candida albicans</i> , auxiliar en el tratamiento de dermatitis
Anfotericina B			Acción intracelular, resistencia, toxicidad a dosis más altas y alta masa molecular que previene la penetración en la piel	Infecciones fúngicas sistémicas, infecciones de la piel por <i>Candida sp</i>
Terbinafina	Alil-amina		Acción intracelular, menos eficaz contra levadura común, por tanto se usa en combinación con azoles (Kontoyiannis y Lewis, 2002)	Infecciones fúngicas en perros que afectan a las garras tanto en las patas delanteras como traseras, usada contra <i>Malassezia sp</i> e infecciones por dermatofitos
Ketoconazol	Azol	Inhibe la enzima de citocromo P450 14- α -esterol-desmetilasa	Acción intracelular, resistencia y alta masa molecular que previene la penetración en la piel	Tratamiento sistémico de otitis y contra <i>Malassezia sp</i> , <i>Candida sp</i> , <i>Microsporum canis</i> y aspergilosis
Berberina	Alcaloide	Desconocido	Acción intracelular, posible candidato novedoso como antifúngico	No usado clínicamente como antifúngico

Se evaluó la susceptibilidad *in vitro* de una cepa clínica aislada de *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* NOD 24 y *S. cerevisiae* EBY 100 a la combinación del agente antifúngico y PHMB usando el ensayo en damero. También se evaluó la interacción entre los fármacos y PHMB, la formación de nanopartículas y la captación celular.

Antifúngicos

Se obtuvieron nistatina, terbinafina, ketoconazol y berberina como polvo de Sigma-Aldrich, RU. Se obtuvo anfotericina B de Sigma como disolución en agua desionizada. El sulfóxido de dimetilo (DMSO) también fue de Sigma. Se prepararon disoluciones madre de nistatina (5 mg/mL), terbinafina (15 mg/mL), ketoconazol (5 mg/mL) y anfotericina B (0,2 mg/mL) en DMSO. Se disolvió berberina en agua para preparar la disolución madre de 10 mg/mL. También se preparó la disolución madre de PHMB (5 mg/mL) en agua. Todas las disoluciones madre se prepararon en diferentes alícuotas de 500 μ L, se mantuvieron a -20 °C y se protegieron de la luz.

Cepas

Se estudiaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa clínica aislada de *Candida albicans*. Se obtuvo *S. cerevisiae* NOD 24 de Royal Veterinary College y *S. cerevisiae* EBY 100 de Allinson Bread®, RU. La cepa clínica aislada de *C. albicans* también se obtuvo de Royal Veterinary College.

5 Medios

Se obtuvo medio RPMI 1640 como polvo y se disolvió en agua destilada y se tamponó con ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) 0,165 M según el procedimiento convencional. Se ajustó el pH a 7 usando disolución 1 M de hidróxido sódico. Se obtuvo agar Sabouraud glucosa (SGA) como polvo. Todos los medios y productos químicos fueron de Sigma-Aldrich, RU.

10 Preparación de inóculo

Se preparó inóculo de levadura seleccionando cinco colonias de cultivo cultivadas durante 24 h en SGA y mezclando en RPMI 1640 con MOPS. La densidad óptica de la mezcla se ajustó espectrofotométricamente hasta 1 que es equivalente a 3×10^7 unidades formadoras de colonias de levadura/mL. Esta suspensión se diluyó adicionalmente en RPMI 1640 con MOPS para dar el tamaño de inóculo final de $0,5 \times 10^4$ UFC/mL.

15 Prueba de valoración en damero

Se llevó a cabo la prueba de valoración en damero en placas estériles de 96 pocillos según el procedimiento convencional recomendado por CLSI para probar el efecto antifúngico de fármacos solos y en combinación con PHMB. Se usó medio RPMI 1640 tamponado con MOPS como medio de prueba. Se prepararon diluciones de fármaco en el medio de prueba si la disolución madre se hizo en DMSO y en caso de disoluciones madre hechas en agua, se hicieron diluciones adicionales de fármaco en la propia agua. Las concentraciones probadas fueron: nistatina 0,000039 mg/mL a 0,02 mg/mL, anfotericina B 0,032 mg/mL a 0,0000625 mg/mL, berberina 0,01 mg/mL a 0,00002 mg/mL, ketoconazol 0,032 mg/mL a 0,0000625 mg/mL y terbinafina 0,16 mg/mL a 0,00031 mg/mL. Estuvo presente control de crecimiento y control de esterilidad en todas las placas. Todas las placas se prepararon por triplicado.

25 Incubación y cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) e índice de concentración fraccional inhibitoria (ICFI)

Se taparon las placas con lámina de parafina para prevenir la evaporación y se mantuvieron a 37 °C para *C. albicans* y 30 °C para *S. cerevisiae*. Se registró visualmente CMI, ayudado con el espectrofotómetro de microplacas universal PowerWave 340 (Biotek) después de 24 horas para *C. albicans* y *S. cerevisiae* NOD 24. Pero se registró después de 48 horas para *S. cerevisiae* EBY 100 ya que no hubo crecimiento incluso en los medios de control de crecimiento después de 24 horas. Se definió CMI como la concentración más baja a la que no existe crecimiento visible. Se usó ICFI para analizar las interacciones de fármaco *in vitro* y se calculó usando la ecuación dada a continuación:

$$ICFI = \frac{CMI \text{ de fármaco en combinación}}{CMI \text{ de fármaco solo}} + \frac{CMI \text{ de PHMB en combinación}}{CMI \text{ de PHMB solo}}$$

35 Se interpretaron los valores de ICFI según las normas recomendadas (ICFI $\leq 0,5$ es 'efecto sinérgico', $> 0,5$ pero ≤ 4 es 'sin interacción' y > 4 es 'efecto antagonista').

Estudios de fluorescencia y absorbancia

Se probó fluorométricamente la interacción de antifúngicos fluorescentes con PHMB. Se dejó interaccionar una concentración específica de cada fármaco con diferentes concentraciones de PHMB y se estudiaron los cambios en la intensidad de fluorescencia. El experimento se llevó a cabo en placas de cuarzo de fondo plano de 96 pocillos. Se mezclaron 150 µg/mL de berberina, 5 µg/mL de ketoconazol y 5 µg/mL de anfotericina B con PHMB en relaciones p/p 1:0 a 1:10. Se mezclaron 50 µg/mL de nistatina con PHMB en relaciones p/p 1:0 a 1:4. En el caso de la terbinafina que no es fluorescente, se estudiaron los cambios en la absorbancia. Se mezclaron 10 µg/mL de terbinafina con PHMB en relaciones p/p 1:0 a 1:5. Las disoluciones se prepararon a partir de disoluciones madre en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para todos los fármacos, excepto para berberina para la que se usó agua ya que precipitó en PBS a la concentración. La mezcla se mezcló completamente pipeteando y se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se probó para el cambio en la fluorescencia/absorbancia. Se probó la fluorescencia en Infinite M200 Pro Fluorometer (Tecan). Para probar la intensidad de fluorescencia, la longitud de onda de excitación y emisión fueron 320 nm y 410 nm para nistatina, 340 nm y 480 nm para anfotericina B, 350 nm y 550 nm para berberina, 260 nm y 375 nm para ketoconazol, respectivamente. En el caso de terbinafina, se estudiaron los cambios en la absorbancia usando el espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop). El pico de absorbancia para terbinafina estuvo en 272 nm. Se representaron los cambios en la absorbancia máxima a 272 nm contra la concentración de PHMB.

Formación de partículas y determinación del tamaño de partículas

Se usó la dispersión dinámica de luz (DLS) para estimar el tamaño de los complejos formados. Se basa en el principio de que midiendo la luz dispersada de partículas en movimiento se puede determinar su tamaño. Se mezclaron completamente antifúngicos (100 µg/mL) y PHMB en la relación p/p 1:3 en PBS y se mantuvieron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se determinó el tamaño de partículas usando Zetasizer S (Malvern instruments, RU).

Microscopía

Se detectó visualmente la administración celular de berberina y que el compuesto es lo suficientemente fluorescente para ser detectado por microscopía. Se trataron células de *C. albicans* con berberina solo y también con combinaciones de berberina y PHMB. Se mezclaron apropiadamente 50 µL de 1 µg/mL, 2 µg/mL y 3 µg/mL de disoluciones de berberina con 50 µL de 1 µg/mL y 2,5 µg/mL de PHMB en placas estériles de 96 pocillos pipeteando 3-4 veces y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 100 µL de células de *C. albicans* en RPMI 1640 a estos pocillos, a 100 µL de disoluciones de berberina sola y a 100 µL de PBS y se mantuvieron a 37 °C durante 1 hora. Se transfirieron los contenidos de cada pocillo a tubos de Eppendorf y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Después de retirar el sobrenadante, se añadieron 100 µL de 2,5 µg/mL de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI) a cada tubo para teñir el núcleo de los hongos. Se prepararon secciones en lecho de agarosa y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia vertical DM4000 (Leica microsystems) usando lente de inmersión en aceite.

Citometría de flujo

Se probó cuantitativamente la administración celular de berberina en *C. albicans* cuando se combina con PHMB usando citometría de flujo. En una placa de 96 pocillos se trataron células de levadura con 1 µg/mL-5 µg/mL de berberina sola y combinaciones de estas concentraciones con 1,25, 2,5, 5 µg/mL de PHMB. El procedimiento fue exactamente el mismo que el de la microscopía. Después de la centrifugación, se retiraron 100 µL de sobrenadante, se añadieron 400 µL de PBS y se probó para la administración de berberina usando filtro de FITC (isotiocianato fluoresceína) en el citómetro de flujo FACS Canto™ II (BD Biosciences). Se adquirieron datos usando el software FACS Diva y se analizaron usando el software Flowjo 5.6.5.

Análisis estadístico

Se usó la prueba del orden con signo de Wilcoxon para analizar estadísticamente cambios en las CMI de antifúngicos cuando se combinan con PHMB. Se consideró significativo el valor de p inferior a 0,05. El análisis estadístico se hizo usando el software SPSS versión 2.0.

Ensayo en damero

Se midió la susceptibilidad de hongos a antifúngicos seleccionados y se midió su combinación con el ensayo en damero de PHMB evaluando los cambios en las CMI de antifúngicos para saber si existe alguna reducción cuando PHMB y los fármacos están actuando juntos. Todos los fármacos mostraron una reducción significativa en CMI cuando se combinaron con PHMB (valor p =0,043). Las CMI de antifúngicos y valores de ICFI se resumen en la Tabla 2 a continuación. Solo terbinafina está en el alcance de las reivindicaciones.

Tabla 2

Organismo	Antifúngicos	CMI de antifúngicos solos (mg/mL)	CMI cuando se combinan con PHMB (mg/mL)	ICFI	Tipo de interacción
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NOD 24	PHMB	0,001	-	-	
	Nistatina	0,0025	0,000625	0,75	Sin interacción
	Anfotericina B	0,004	0,00025	0,56	Sin interacción
	Berberina	0,05	0,00056	0,56	Sin interacción
	Ketoconazol	0,016	0,001	0,5	Sinérgica
	Terbinafina	0,004	0,0025	0,312	Sinérgica
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY 100	PHMB	0,002	-	-	-
	Nistatina	0,005	0,0025	0,53	Sin interacción

Organismo	Antifúngicos	CMI de antifúngicos solos (mg/mL)	CMI cuando se combinan con PHMB (mg/mL)	ICFI	Tipo de interacción
	Anfotericina B	0,016	0,004	0,5	Sinérgica
	Berberina	0,05	0,025	0,75	Sin interacción
	Ketoconazol	0,00125	0,00031	0,263	Sinérgica
	Terbinafina	0,02	0,0025	0,14	Sinérgica
<i>Candida albicans</i>	PHMB	0,001	-	-	-
	Nistatina	0,005	0,0025	1	Sin interacción
	Anfotericina B	0,001	0,0005	0,53	Sin interacción
	Berberina	0,0625	0,03125	0,53	Sin interacción
	Ketoconazol	0,004	0,001	0,281	Sinérgica
	Terbinafina	0,004	0,001	0,5	Sinérgica

Se muestra la disminución en CMI en las Figuras 1 a 3. Todos los fármacos mostraron disminución en CMI contra todos los organismos en combinación con menos de 0,00005 mg/mL de PHMB. También hubo disminución significativa (valor de $p = 0,045$) en CMI de PHMB cuando se combinan con antifúngicos que se ilustra en la Tabla 3 a continuación.

5

Tabla 3

Organismo	CMI de PHMB (mg/mL)	Fármacos	CMI de PHMB con antifúngicos (mg/mL)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NOD 24	0,001	Nistatina	0,0005
		Anfotericina B	0,0005
		Berberina	0,0005
		Ketoconazol	0,0005
		Terbinafina	0,000062
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY 100	0,002	Nistatina	0,000062
		Anfotericina B	0,0005
		Berberina	0,0005
		Ketoconazol	0,000031
		Terbinafina	0,000031
<i>Candida albicans</i>	0,001	Nistatina	0,0005
		Anfotericina B	0,000031
		Berberina	0,000031
		Ketoconazol	0,000062
		Terbinafina	0,0005

Durante el ensayo en damero, los presentes inventores encontraron problemas de solubilidad con terbinafina en el medio. Pero esto se resolvió manteniéndola a 37 °C durante 10 minutos. Algunos de los antifúngicos mostraron sinergia. Hubo diferencia en las CMI de diferentes fármacos contra diferentes organismos como era de esperar. Se

10

observaron enormes disminuciones en las CMI de antifúngicos contra *S. cerevisiae* NOD 24. Se encontró fuerte sinergia con PHMB en caso de terbinafina y ketoconazol. En el caso de anfotericina B, se observó sinergia cuando se probó contra *S. cerevisiae* EBY 100. Los resultados del ensayo en damero indican que PHMB puede potenciar la acción de estos antifúngicos

5 Estudios de fluorescencia y absorbancia

Se probó la interacción entre PHMB y antifúngicos estudiando los cambios en su intensidad de fluorescencia. Los resultados se representan en la Figura 4. Hubo disminución en la fluorescencia de todos los compuestos. A relación 1:6 entre ketoconazol y PHMB, su fluorescencia disminuyó hasta casi 50 %. La fluorescencia de nistatina solo mostró una pequeña disminución. Durante el estudio se encontró que la berberina precipitó en PBS, por tanto se usó agua como disolvente. Hubo una disminución en la fluorescencia de berberina, pero entonces empezó a aumentar ligeramente pero nunca fue superior a la muestra con berberina sola. Fue similar la observación con anfotericina B. Esta disminución en la fluorescencia de muestra se denomina extinción de fluorescencia. En caso de terbinafina, se encontró que la absorbancia aumentaba ligeramente. Esto se denomina efecto hipercrómico. La extinción de fluorescencia y el efecto hipercrómico muestran que PHMB interacciona con antifúngicos.

15 Tamaño de partículas formadas

Se determinó el tamaño de los complejos formados entre PHMB y antifúngicos usando DLS. Se observaron nanopartículas en caso de ketoconazol y berberina (Figura 5). Pero en el caso de ketoconazol, también hubo varias partículas de mayor tamaño. En el caso de berberina (Figura 5 (a)), 64,5 % de las partículas tuvieron aproximadamente $22,2 \pm 1,5$ nm. Pero para ketoconazol (Figura 5 (b)) solo menos de 10 % de partículas fueron de tamaño inferior a 10 nm. El índice de polidispersidad fue más de un 1, que significa distribución más ancha del tamaño de partículas. En el caso de otros fármacos, se observaron partículas desde 50 hasta ≤ 1000 nm. Los resultados muestran que PHMB forma partículas con todos los antifúngicos y nanopartículas con terbinafina, ketoconazol y berberina.

Microscopía

Se probó la administración celular de berberina en *C. albicans* usando microscopía de fluorescencia. Hubo un considerable aumento en la fluorescencia de células cuando se combinó berberina con PHMB, en comparación con berberina sola como se representa en la Figura 6. También se observó un aumento en la fluorescencia cuando la concentración de PHMB aumentó para la misma concentración de berberina. La Figura 6 representa solo una concentración de berberina, pero se observaron resultados similares para toda la concentración estudiada. Los resultados indican que con la adición de PHMB hay un aumento en la entrada de berberina en las células en comparación con berberina sola. Esto demuestra cualitativamente que PHMB puede potenciar la administración de berberina en hongos.

Citometría de flujo

Se cuantificó la potenciada administración de berberina en *C. albicans* usando citometría de flujo. Se usó filtro de FITC ya que el pico de emisión de berberina entra dentro del espectro de absorción de FITC. Hubo un claro aumento en el número de células positivas para berberina cuando se combinaron con PHMB como se representa en la Figura 7. La observación fue similar a microscopía, es decir, aumento en las células positivas para berberina con el aumento en la concentración de PHMB. También se observó un ligero aumento con mayor concentración de berberina sola. Estos resultados indican que PHMB aumenta la administración celular de berberina en *C. albicans*.

40 Resultados

PHMB es un antiséptico clínicamente seguro de baja toxicidad, y los experimentos muestran una administración potenciada de antifúngicos combinándolos con este polímero catiónico. Se probaron los fármacos para cambios en su actividad antifúngica contra *C. albicans* y *S. cerevisiae* cuando se combinaron con PHMB. Se probó la interacción entre el polímero y los fármacos usando estudios de fluorescencia/absorbancia y dispersión dinámica de luz. Se estudió la administración celular de berberina usando citometría de flujo y microscopía de fluorescencia.

Los experimentos muestran que existe una reducción significativa (valor de $p = 0,043$) en las CMI de todos los fármacos cuando se combinan con PHMB. También se alteraron la intensidad de fluorescencia y la absorbancia de todos los fármacos estudiados en presencia de PHMB que indica interacción. Se confirmaron interacciones fármaco - PHMB por dispersión dinámica de luz. Se observaron nanopartículas en el caso de berberina, terbinafina y ketoconazol. Se visualizó la elevada administración celular de berberina en *C. albicans* usando microscopía y se cuantificó mediante citometría de flujo.

PHMB potencia la acción de antifúngicos, forma nanopartículas y potencia la administración celular de berberina y se prevé que el uso de nanopartículas en combinación con y agentes antifúngicos mejorará las actividades antifúngicas *in vivo*.

PHMB potenció la acción antifúngica de todos los fármacos estudiados ya que hubo una disminución en las CMI de todos los fármacos que se ilustran en la Tabla 2. Se observó efecto sinérgico para ketoconazol, terbinafina y anfotericina B.

5 Se supuso que PHMB forma nanopartículas con los antifúngicos seleccionados. No se detectaron nanopartículas cuando nistatina, terbinafina y anfotericina B se combinaron con PHMB en la relación 1:3. Se detectaron partículas de mayor tamaño dentro del intervalo de tamaño de 500 a 1000 nm. Esto podría ser debido a agregación o precipitación. Sin embargo, se cree que combinar los fármacos y PHMB en diferentes relaciones daría como resultado la formación de nanopartículas, además de alterar la temperatura a la que se forman las partículas, cambiando el medio/disolvente de reacción y ajustando el pH.

10 La técnica de administración alternativa de fármacos explorada en este estudio tiene sus posibles aplicaciones en infecciones fúngicas intracelulares y tópicas, e infecciones con hongos altamente resistentes. Las infecciones por hongos intracelulares como *Histoplasma capsulatum* y *Cryptococcus neoformans* son difíciles de tratar debido a la dificultad en el transporte a través de las membranas celulares y la reducida actividad dentro de las células. El sistema de administración de fármacos basado en PHMB ofrece una solución menos cara en comparación con las existentes y permite usar dosis más bajas de agentes antifúngicos.

15 Se prevé que PHMB (o de hecho polímeros similares capaces de formar nanopartículas) se pueda combinar con agentes antifúngicos para el direccionamiento de los hongos enumerados en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

GÉNERO	ESPECIE
Trichophyton	mentagrophytes
Trichophyton	rubrum
Epidermophyton	floccosum

20 Formación de nanopartículas con terbinafina y PHMB

Se realizaron experimentos para formar nanopartículas formadas con terbinafina y PHMB.

Se disolvió terbinafina en DMSO hasta una concentración de disolución madre de 10 mg/mL. Entonces se diluyó más hasta una concentración 1 mg/mL en agua ultrapura (se añadieron 20 ul de 10 mg/mL de terbinafina a 180 ul de H₂O) y se mezclaron bien por agitación con vórtex).

25 Se calentó PHMB (1 mg/mL en agua) durante 20 min a 60 °C y luego se dejó enfriar hasta temperatura ambiente antes de uso.

La relación de PHMB:Terbinafina se mantuvo constante a 3:1 ya que esta proporcionó el tamaño de nanopartículas óptimo y números en las condiciones probadas hasta la fecha.

Formulación de nanopartículas de PHMB/Terbinafina:

30 Se enrasó una formulación de nanopartículas de diez veces de 30:10 (ug/mL de PHMB : Terbinafina) en 300 ul. Se añadieron 288 µL de PBS a un tubo estéril de 1,5 mL. Se añadieron 9 µL de 1 mg/mL de PHMB y se mezclaron por pipeteado arriba y abajo 5 veces. Entonces se añadieron lentamente 3 ul de 1 mg/mL de terbinafina y se mezclaron por pipeteado arriba y abajo 5 veces. Entonces se dejó la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de PHMB para formar nanopartículas.

35 Entonces se diluyó adicionalmente la disolución diez veces con PBS para la medición en la máquina de dimensionado de nanopartículas Nanosight LM10 (para dar una concentración final de 3 ug/mL de PHMB y 1 ug/mL de terbinafina).

Las mediciones se leyeron en la máquina Nanosight LM10 (obtenida de Nanosight Limited, Wiltshire, RU) durante 1 minuto a 20 °C, nivel de cámara 9, ganancia de la pantalla 10 y un umbral de detección 6.

40 Los resultados de Nanosight se muestran en las Figuras 8 a 10 y se resumen a continuación en la Tabla 5:

Tabla 5

Distribución de tamaños: Media: 119 nm, Modo: 126 nm, DE: 18 nm
Datos acumulados (nm): D10: 90, D50: 121, D90: 141, D70: 130
Líneas de usuario: 0 nm, 0 nm
Concentración Total: 1,27 partículas / marco, 0,14E8 partículas / mL
Concentración seleccionada: 0,00 partículas / marco, 0,00E8 partículas / mL
Curva ajustada: Media: 0 nm, DE: 0
Pistas completadas: 27
Velocidad de deriva: 1331 nm/s

5 Como se muestra en las Figuras 8 - 10, se produjeron nanopartículas que comprenden PHMB y terbinafina y PHMB que luego se pudieron usar en la preparación de un medicamento tópico para el posterior tratamiento de una variedad de posibles infecciones fúngicas.

Parche de micro-agujas

10 Se han usado desde hace tiempo parches transdérmicos para la administración de fármacos lipófilos de molécula pequeña que pueden ser fácilmente absorbidos a través de la piel. Esta vía de administración no invasiva es ventajosa para la administración de muchos fármacos incompatibles con la administración oral, ya que permite la absorción directa del fármaco en la circulación sistémica, atravesando tanto los sistemas digestivo como portal hepático que también puede reducir espectacularmente la biodisponibilidad de muchos fármacos. La administración transdérmica también vence muchos de los retos asociados a la inyección subcutánea, reduciendo enormemente la molestia del paciente, ansiedad a las agujas, riesgo de lesión accidental por pinchazos con aguja al administrador y problemas que rodean la eliminación de objetos punzocortantes.

15 A pesar de estas muchas ventajas, la administración transdérmica de fármacos se confina a las clases de moléculas compatibles con la absorción a través de la piel. La administración de sales de molécula pequeña y proteínas terapéuticas no son normalmente viables con la administración transdérmica tradicional, ya que la piel proporciona una barrera protectora eficaz a estas moléculas, incluso en presencia de excipientes potenciadores de la absorción. Sin embargo, se puede emplear la tecnología de micro-agujas para administrar las nanopartículas que contienen agentes antifúngicos directamente a la epidermis, dermis y la matriz ungueal (donde la uña y la piel se encuentran en el eponiquio). Administrando la composición de la invención de esta forma, las nanopartículas entrarán en la matriz ungueal y el sistema capilar y administrarán la composición antifúngica de nanopartículas al lecho ungueal, bajo la placa ungueal dura, y dentro de los hongos. De esta forma, los potentes agentes antifúngicos pueden ser directamente administrados al sitio de acción, reduciéndose así el tiempo de tratamiento y potenciando la potencia.

25 Las Figuras 11 y 12 muestran diagramas de un dedo 10 al que se puede aplicar un parche de micro-agujas (ilustrado en la Figura 13) a un dedo dentro del área de tratamiento 12 mostrada por una línea de puntos. El área de tratamiento 12 está formada de la dermis detrás de la uña 14 y también en la matriz ungueal (eponiquio) 16 donde se encuentran la uña y la piel. La raíz de la uña 18 se localiza en el área debajo de la dermis detrás de la uña y, por tanto, se va a tratar eficazmente aplicando un parche de micro-agujas para administrar la composición de la presente invención. Por supuesto, el parche de micro-agujas se podría usar para las uñas del pie, además de las uñas de las manos.

35 La Figura 13 muestra un diagrama de un parche de micro-agujas que se puede usar para aplicar la composición de la presente invención a un individuo que padece una infección fúngica de las uñas. El parche de micro-agujas 20 está formado de una banda flexible de material 22 que tiene un adhesivo 24 aplicado en su cara inferior. Centralmente situada en la cara inferior de la banda flexible está una matriz de micro-agujas 26 que se extienden hacia abajo que tienen una pluralidad de puntos 30. Los puntos se pueden formar como agujas que tienen conductos que están conectados a un depósito 28 que contiene la composición o simplemente tienen sus puntos recubiertos en la composición. En una configuración alternativa, un depósito 28 puede expulsar la composición a través de orificios dispuestos alrededor de las matrices de micro-agujas tal que la composición pueda recubrir continuamente los puntos de la matriz durante un periodo de tiempo predeterminado. Será evidente para el destinatario experto que actualmente están disponibles varios parches de micro-agujas diferentes y que la composición de la presente invención se podría adaptar para su uso con un intervalo de ellas.

40 Las micro-agujas pueden ser inferiores a 2 mm de longitud, y preferentemente se insertarán aproximadamente 250 µm en la piel con molestia mínima al paciente y, dado el pequeño orificio creado, con riesgo mínimo de infección

post-inyección, hemorragia, o riesgo de inyección IV involuntaria para una administración intradérmica. Además, las micro-agujas reducen el riesgo al administrador de la inyección, ya que la punción accidental de la piel es casi imposible con estas pequeñas proyecciones.

5 Se prevé que el parche de micro-agujas se pueda usar para un único tratamiento donde todo lo que tiene que hacer el paciente es sacar el parche de un envoltorio y aplicarlo a la parte apropiada del dedo de la mano o del pie durante un periodo de tiempo dado. Alternativamente, el parche de micro-agujas se podría vender en combinación con la composición y el paciente recubriría una cantidad de la composición sobre la superficie de las micro-agujas y aplicaría el parche al cuerpo en el modo prescrito. El parche podría venir con marcas en su exterior tal que ayuden al
10 paciente o médico a alinear correctamente las micro-agujas con la localización correcta sobre el dedo de la mano o del pie a tratar.

Aerosol

15 La composición de la invención también se puede formular en una formulación en aerosol. En este ejemplo de trabajo, se forman nanopartículas de PHMB con caspofungina (un lipopéptido antifúngico) y se secan. Las nanopartículas secadas se añaden entonces a un propulsor. El propulsor proporciona la fuerza para generar la nube de aerosol y también es el medio en el que se suspenden o disuelven el componente activo de las nanopartículas de caspofungina.

Se puede usar una variedad de propulsores, pero en términos generales deben tener:

- un punto de ebullición en el intervalo -100 a +30 °C
- una densidad de aproximadamente 1,2 a 1,5 g cm⁻³ (aproximadamente la del fármaco a suspender o
20 disolver)
- una presión de vapor de 40 a 80 psig
- ninguna toxicidad para el paciente
- ser no inflamable
- ser capaces de disolver aditivos comunes. Los principios activos deben ser o bien completamente solubles
25 o completamente insolubles.

Serán particularmente adecuados los propulsores que se usan en los inhaladores para el asma, tales como hidrofluoroalcanos (HFA): ya sea HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano) o HFA 227 (1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano) o sus combinaciones. Además, o alternativamente, se pueden utilizar fosfolípidos que potencian la penetración y biodisponibilidad.

30 Las nanopartículas se reconstituirán cuando se añada humedad, por ejemplo, cuando la preparación se pulverice en el entorno húmedo de los pulmones. Se prefiere que la preparación esté contenida en un recipiente de aleación de aluminio que está internamente recubierto con fluoropolímero y sellado con una válvula dosificadora de manera que se pueda dispensar una dosis medida. Si se requiere, también se puede acoplar una boquilla atomizadora y tapa guardapolvo.

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica para el tratamiento de una infección fúngica de las uñas o de la piel que comprende un polímero y un agente antifúngico, en donde el polímero comprende una polimonoguanida/poliguanidina, polibiguanida lineal y/o ramificada o cíclica, y el agente antifúngico comprende terbinafina.
- 5 2. La composición tópica según la reivindicación 1, en donde el polímero comprende polihexametilenbiguanida (PHMB).
3. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde el agente antifúngico está presente en una cantidad de dosis dentro de la composición que es inferior a la dosis sistémica terapéuticamente eficaz del agente antifúngico.
- 10 4. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición comprende además uno o más de los siguientes componentes: tampones, excipientes, aglutinantes, aceites, agua, emulsionantes, glicerina, antioxidantes, conservantes y fragancias, y opcionalmente, comprende además urea.
5. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde la infección fúngica de la piel comprende pie de atleta o una infección dermatofítica y/o por levadura.
- 15 6. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde el agente antifúngico comprende uno o más agentes adicionales seleccionados del siguiente grupo: Nistatina, ketoconazol, anfotericina B, itraconazol o berberina.
7. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición está en forma de una crema, pomada, spray o polvo.
- 20 8. La composición tópica según cualquier reivindicación precedente, en donde la composición se administra por una matriz de micro-agujas, que opcionalmente, se incorpora en un parche adhesivo.
9. Un método de producción de una composición tópica para el tratamiento de una infección fúngica de las uñas o de la piel que comprende mezclar un polímero que comprende una polimonoguanida/poliguanidina, lineal y/o ramificada o cíclica y un agente antifúngico que comprende terbinafina, en condiciones adecuadas para permitir la formación de nanopartículas.
- 25 10. Un método según la reivindicación 9, en donde el método se usa para producir una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
11. La composición tópica según las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición se usa en combinación con una matriz de micro-agujas, la matriz de micro-agujas se incorpora en un parche adhesivo.

30

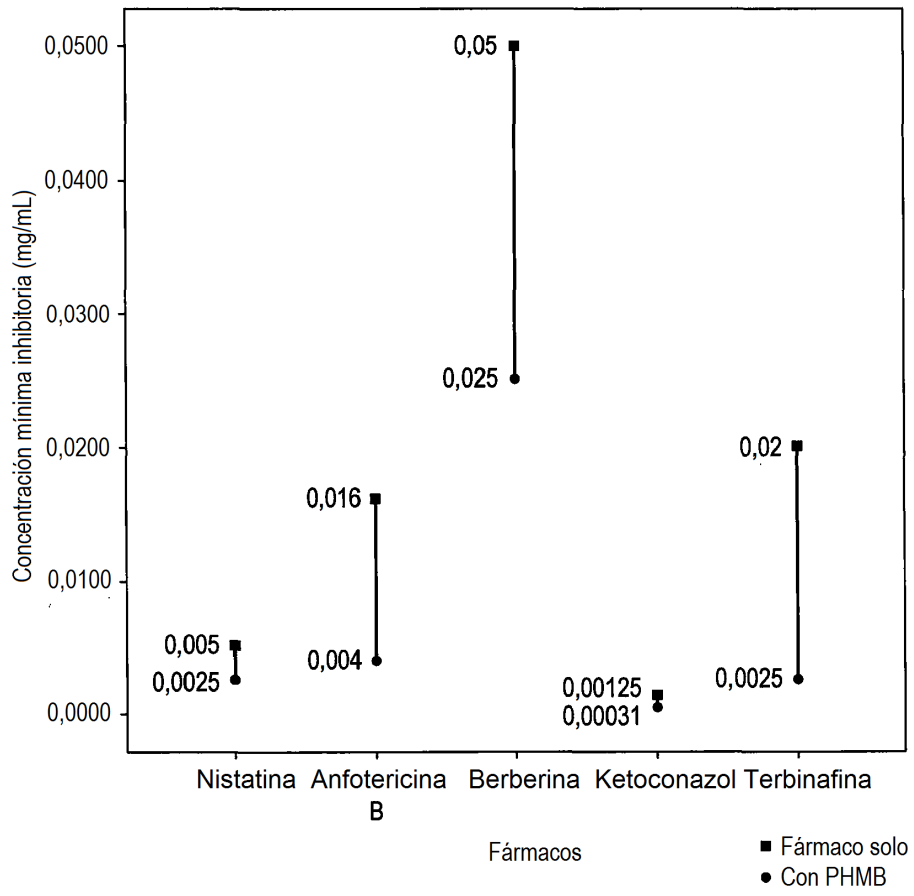


FIG. 1

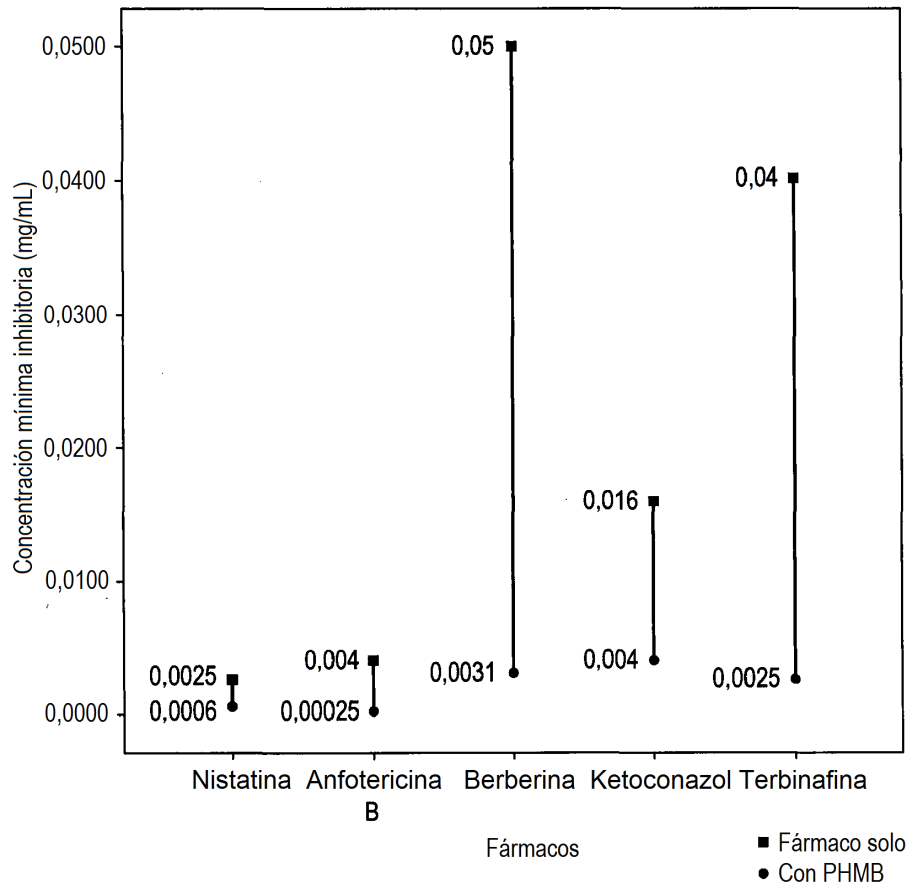


FIG. 2

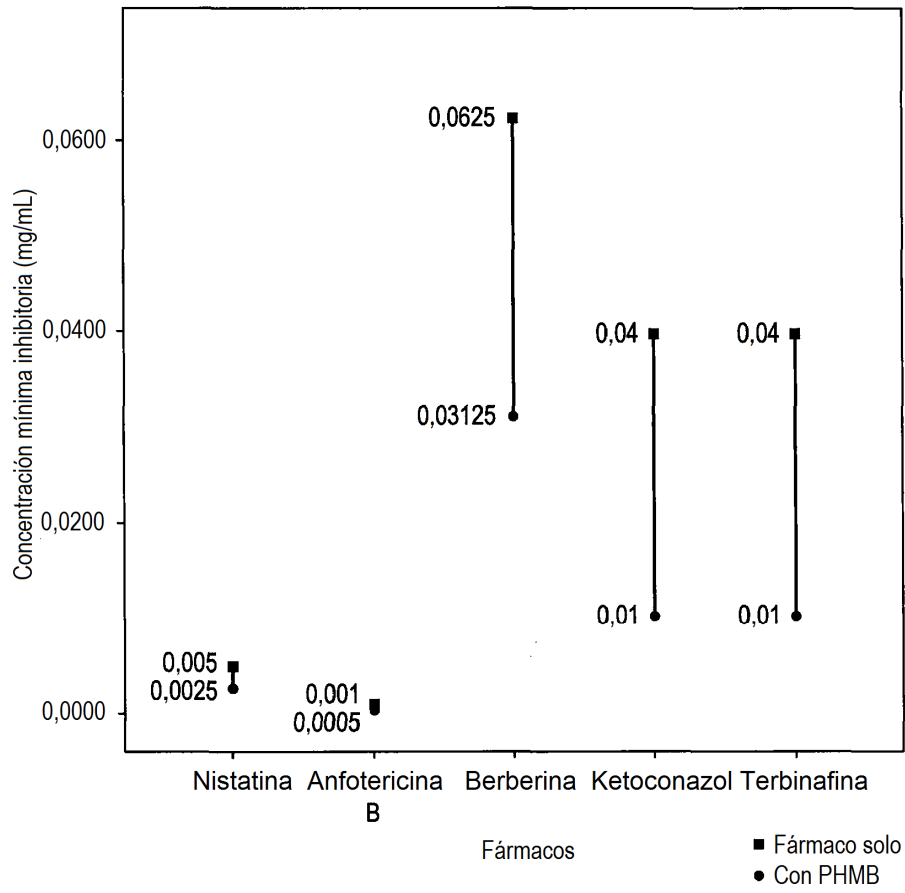


FIG. 3

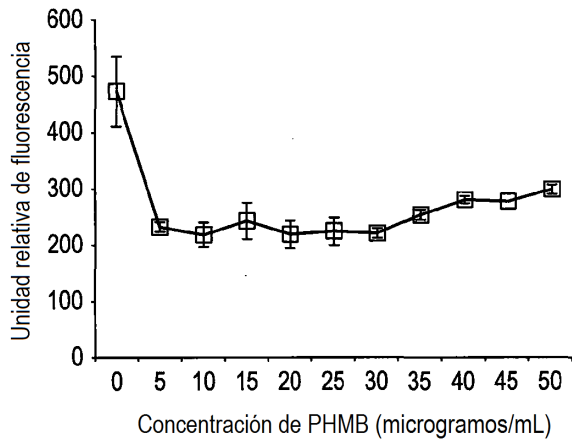


FIG. 4A

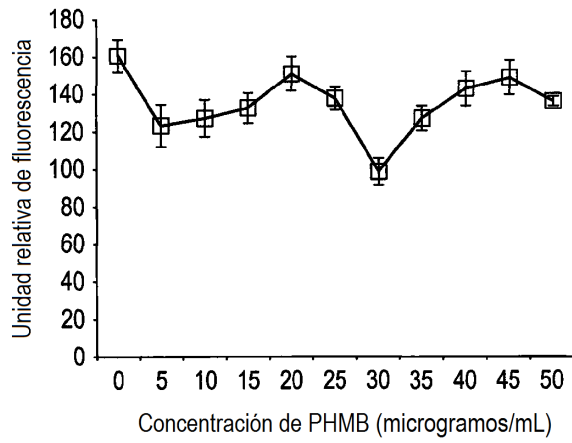


FIG. 4B

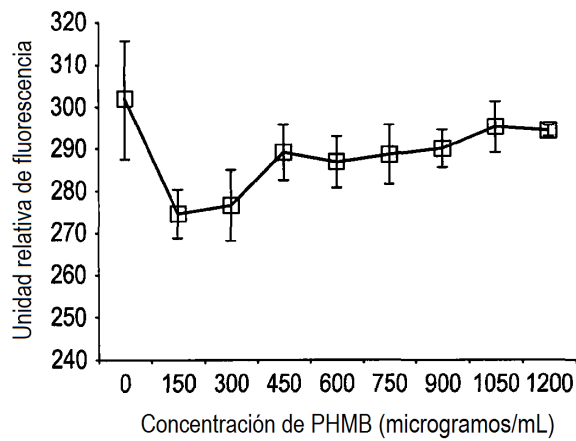


FIG. 4C

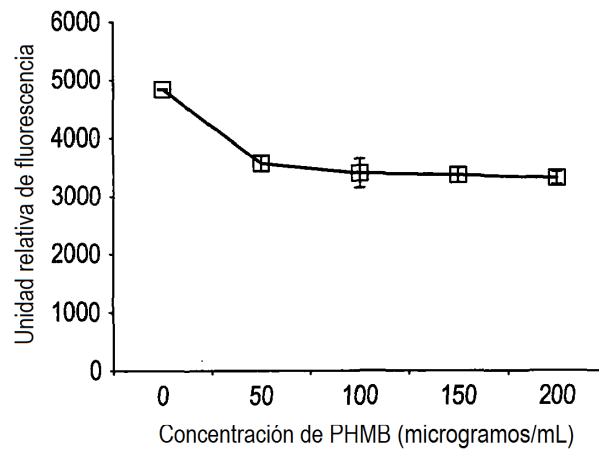


FIG. 4D

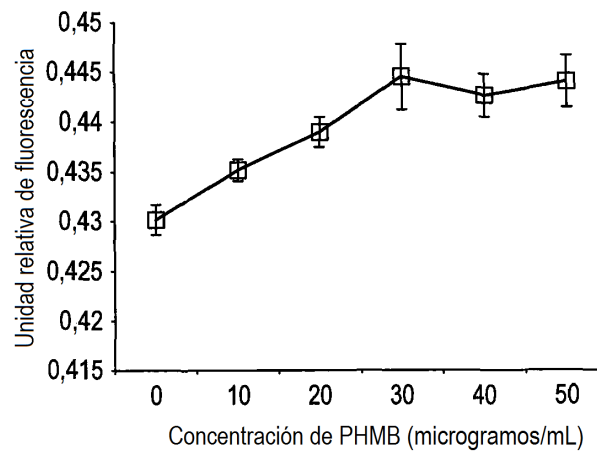


FIG. 4E

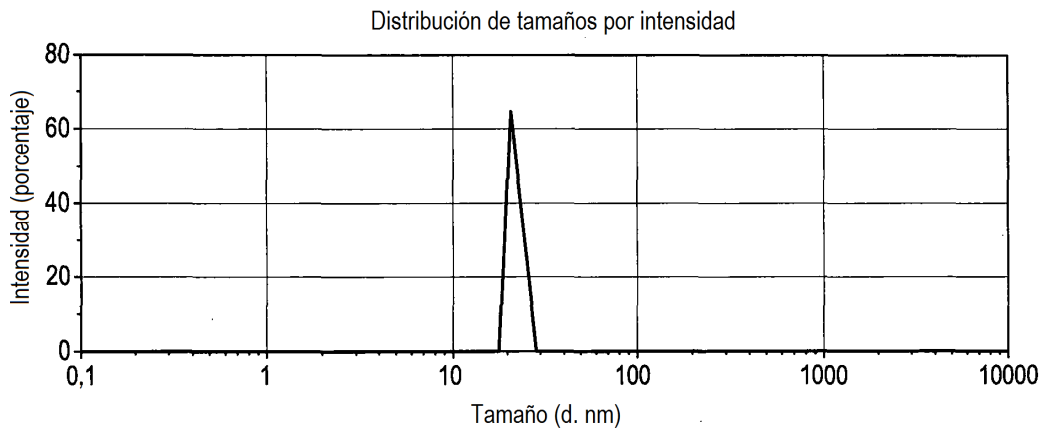


FIG. 5A

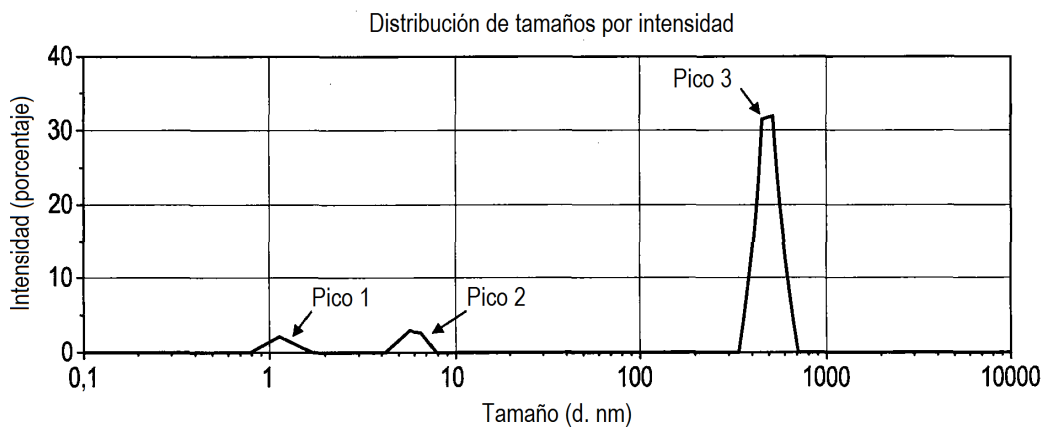


FIG. 5B

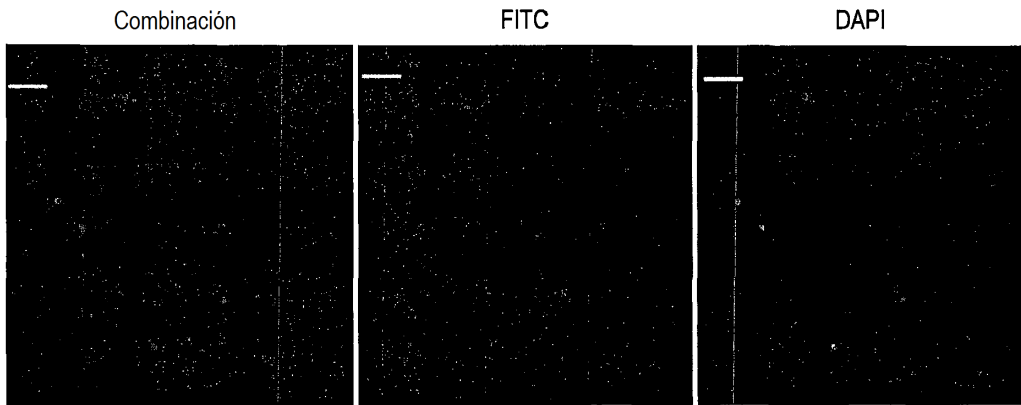


FIG. 6A

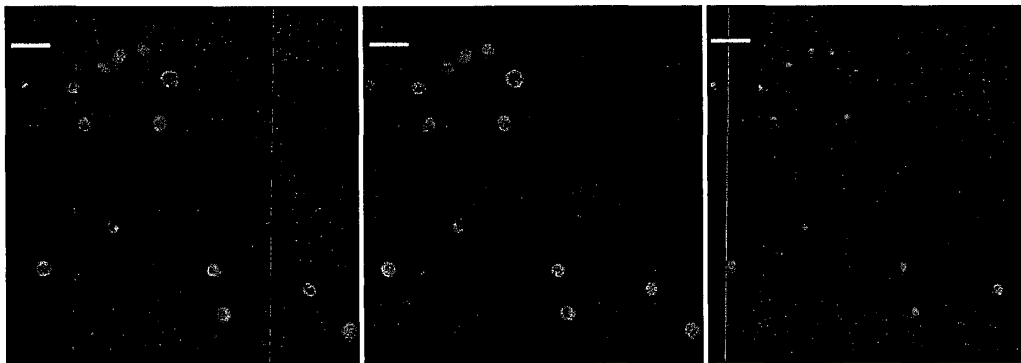


FIG. 6B

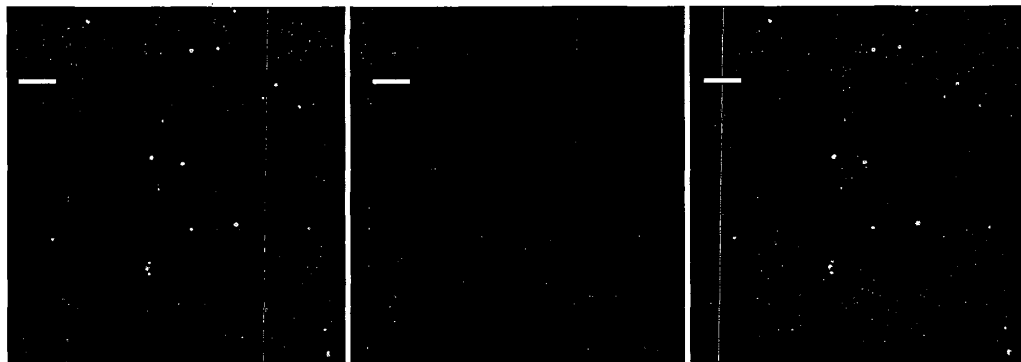


FIG. 6C

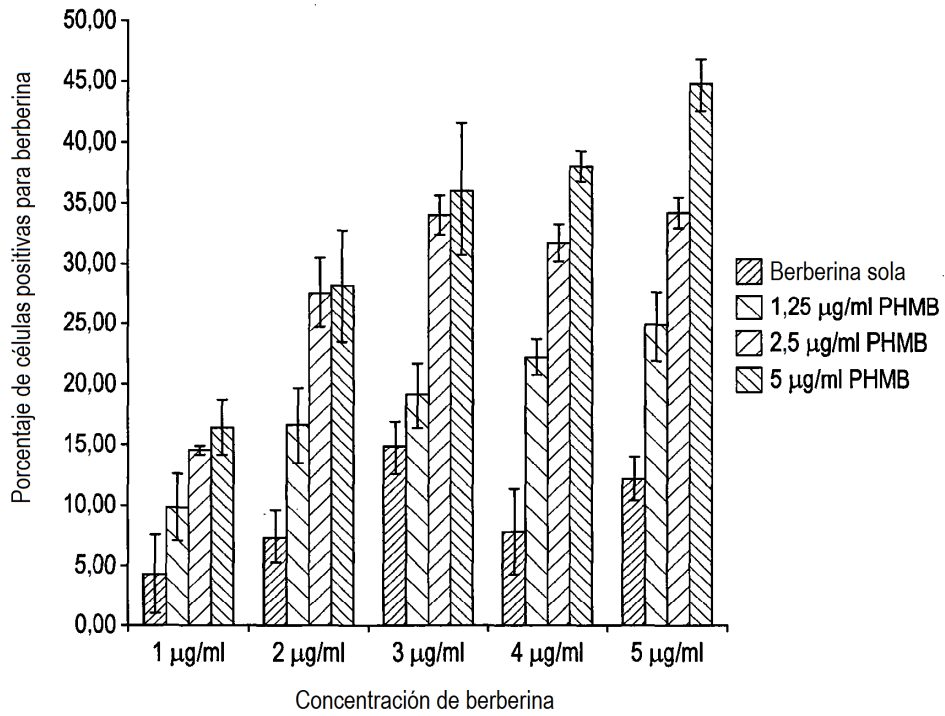


FIG. 7

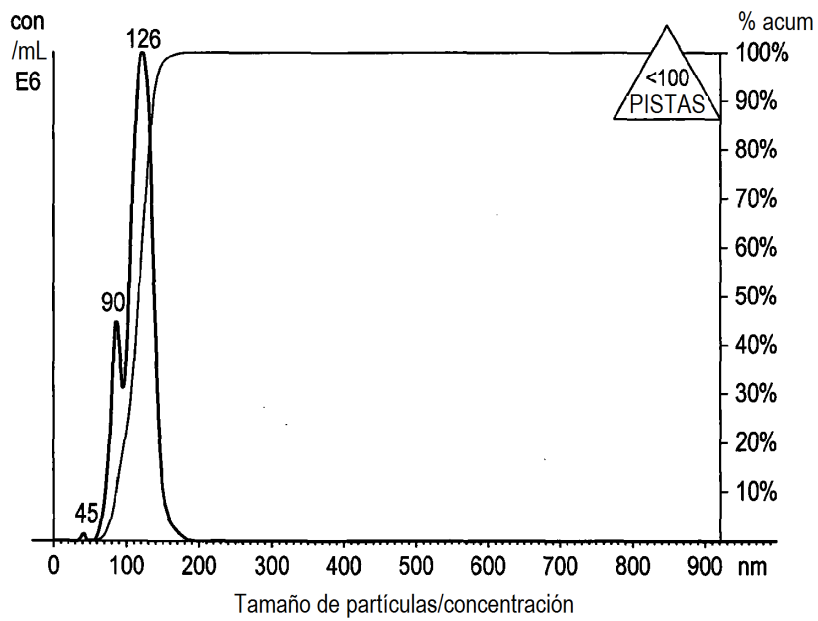


FIG. 8

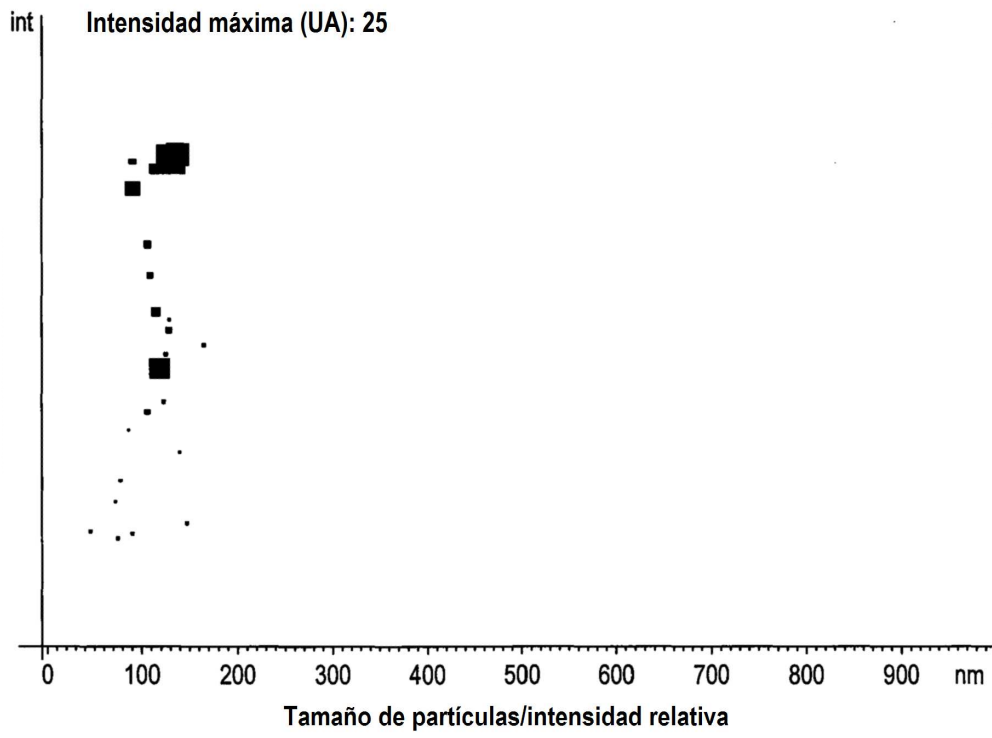


FIG. 9

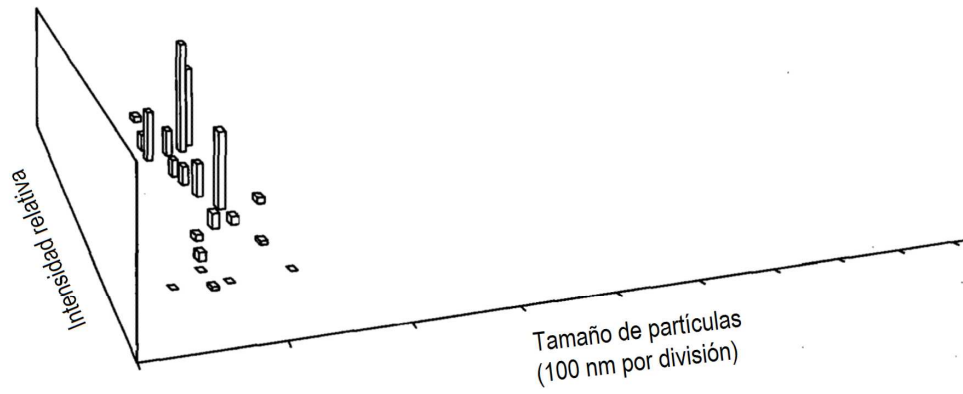


Gráfico 3D de tamaño de partículas/intensidad relativa

FIG. 10

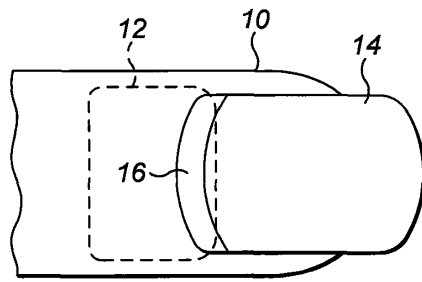


FIG. 11

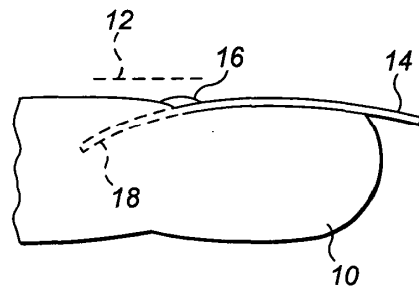


FIG. 12

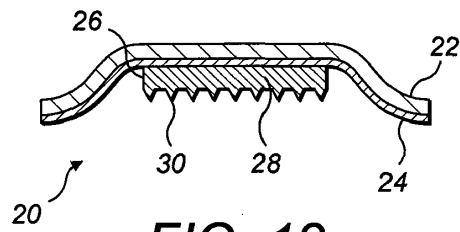


FIG. 13