

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 775**

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A61K 31/734 (2006.01)

A01N 43/90 (2006.01)

A01N 43/653 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/GB2012/052274**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13038197**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12766466 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 2755481**

54 Título: **Uso de oligómeros de alginato para reforzar los efectos de agentes antifúngicos**

30 Prioridad:

15.09.2011 GB 201116010

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

14.12.2020

73 Titular/es:

ALGIPHARMA AS (100.0%)

Industriveien 33

1337 Sandvika, NO

72 Inventor/es:

ONSØYEN, EDVAR;

DESSEN, ARNE;

THOMAS, DAVID WILLIAM;

HILL, KATJA ETEL;

SLETTA, HÅVARD;

TØNDERVIK, ANNE;

KLINKENBERG, GEIR y

MYRVOLD, ROLF

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 798 775 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

Uso de oligómeros de alginato para reforzar los efectos de agentes antifúngicos

5 La presente invención se refiere en general al uso de oligómeros de alginato para potenciar, o para reforzar o mejorar, la eficacia de un agente antifúngico, por ejemplo, un fármaco antifúngico o un fungicida, y en particular a la efectividad (o eficacia) de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de los hongos. En particular, se ha descubierto que combinando el uso de agentes antifúngicos con oligómeros, se puede reducir la cantidad usada o necesaria de antifúngico. Por consiguiente, se propone que los oligómeros de alginato puedan reducir la tolerancia o
10 aumentar la susceptibilidad de los hongos a los agentes antifúngicos. Al menos en algunas circunstancias, se cree que puede estar ocurriendo una sinergia entre oligómeros de alginato y agentes antifúngicos. Por consiguiente, la invención generalmente proporciona oligómeros de alginato para usar junto con (es decir, en combinación o conjunción con) un agente antifúngico, por ejemplo, un fármaco antifúngico o un fungicida, para combatir hongos, por ejemplo, en el contexto de una colonización fúngica no deseada (p. ej., contaminación) en cualquier sitio o en el contexto de tratar o prevenir una infección o enfermedad fúngica (p. ej. una micosis), ya sea en un sujeto animal o en una planta. Por lo tanto, se proporcionan usos y métodos tanto médicos como no médicos.

Los hongos son miembros de un reino de organismos eucariotas que se consideran distintos de las plantas y los animales. A diferencia de las células vegetales y animales, estos se caracterizan por la presencia de una pared celular que contiene quitina. Los hongos son ubicuos en la naturaleza y aunque muchos hongos son benignos, muchas enfermedades de plantas y animales se atribuyen a sus actividades, ya sea a través de la infección de un hospedador o mediante la producción de metabolitos tóxicos. Por lo tanto, los medios para controlar las poblaciones de hongos proporcionan tratamientos para ciertas enfermedades y afecciones de animales y plantas, y es importante para la salud y el bienestar de los seres humanos y las plantas y animales que crían. La capacidad de controlar las poblaciones de hongos en las plantas es de particular importancia en el campo de la agricultura, donde las plantas económicamente valiosas pueden perderse a causa de enfermedades fúngicas. El costo humano de perder un cultivo alimentario por enfermedades fúngicas también puede ser alto si se restringe el acceso a fuentes alternativas de alimentos. Los hongos también son responsables del deterioro de los alimentos para animales y otros materiales, lo que genera desperdicio y la necesidad de reparar o reemplazar materiales comprometidos. El control de hongos en estas áreas minimizaría los costos económicos significativos asociados con el deterioro.

Por lo tanto, existe una necesidad continua de encontrar estrategias alternativas o mejoradas para combatir los hongos, tanto en plantas como en animales, pero también en un entorno más amplio. Los documentos WO9633164 y EP 0807631 divulgan entidades químicas novedosas que tienen propiedades antifúngicas.

Se buscan especialmente estrategias alternativas o mejoradas para tratar enfermedades e infecciones fúngicas en animales debido a que ciertas similitudes inherentes entre las células fúngicas y animales ha dificultado la identificación de moléculas quimioterapéuticas específicas para hongos. Como resultado, actualmente hay muy pocos fármacos antifúngicos efectivos disponibles y los que causan efectos secundarios a dosis altas debido a su falta de especificidad por las células fúngicas, lo que limita su uso sistémico. Por lo tanto, una estrategia que puede mejorar la efectividad (o eficacia) de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de los hongos será útil porque se pueden reducir las dosis del agente antifúngico y minimizar los efectos secundarios.

Los alginatos son polímeros lineales de ácido β -D-manurónico (M) con uniones (1-4) y/o su epímero en C-5 el ácido α -L-glucurónico (G). La estructura primaria de los alginatos puede variar enormemente. Los restos M y G se pueden organizar como bloques homopoliméricos de restos M o G contiguos, ya que se pueden encontrar bloques de restos M y G alternos y restos M o G individuales que intercalan estas estructuras de bloques. Una molécula de alginato puede comprender algunas o todas estas estructuras y dichas estructuras podrían no estar distribuidas uniformemente en todo el polímero. En el extremo, existe un homopolímero de ácido gularónico (poliguluronato) o un homopolímero de ácido manurónico (polimanuronato).

Los alginatos se han aislado de algas pardas marinas (p. ej. determinadas especies de *Durvillea*, *Lessonia* y *Laminaria*) y bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii*. Otras pseudomonas (p. ej. *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, y *Pseudomonas mendocina*) conservan la capacidad genética para producir alginatos, pero en la naturaleza no producen niveles detectables de alginato. Por mutación se puede inducir a estas pseudomonas no productoras para que produzcan establemente grandes cantidades de alginato.

El alginato se sintetiza como polimanuronato y los restos G se forman por acción de epimerasas (específicamente epimerasas C-5) en los restos M del polímero. En el caso de los alginatos extraídos de algas, los restos G están organizados predominantemente como bloques G porque las enzimas implicadas en la biosíntesis de alginato en las algas introducen con preferencia el G al lado de otro G, convirtiendo así tramos de restos M en bloques de G. La elucidación de estos sistemas biosintéticos ha permitido la producción de alginatos con estructuras primarias específicas (documento WO 94/09124, Gimmestad, M et al, Journal of Bacteriology, 2003, Vol 185(12) 3515-3523 y el documento WO 2004/011628).

Los alginatos se aíslan normalmente de fuentes naturales como polímeros grandes de alto peso molecular (por

ejemplo, un peso molecular promedio en el intervalo de 300.000 a 500.000 Daltons). Se sabe, sin embargo, que tales polímeros de alginato grandes pueden degradarse o descomponerse, p. ej. por hidrólisis química o enzimática para producir estructuras de alginato de menor peso molecular. Los alginatos que se usan industrialmente normalmente tienen un peso molecular medio en el intervalo de 100.000 a 300.000 Daltons (tales alginatos todavía se consideran polímeros grandes) aunque en productos farmacéuticos se han usado alginatos de un peso molecular medio de aproximadamente 35.000 Daltons.

Se ha propuesto que los oligómeros de alginato se usen para combatir biopelículas (WO 2009/068841).

Ahora se ha descubierto que los oligómeros de alginato tienen la capacidad de potenciar, o reforzar o mejorar, la eficacia de un agente antifúngico, p. ej., un fármaco antifúngico o un fungicida, y en particular la efectividad (o eficacia) de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de los hongos. Por consiguiente, el uso de oligómeros de alginato junto con (o en combinación o conjunción con) un agente antifúngico, por ejemplo, un fármaco antifúngico o un fungicida, constituye un enfoque especialmente eficaz para combatir la colonización por hongos (p. ej., contaminación), infección y enfermedad.

En un aspecto la invención proporciona un método *in vitro* para combatir la colonización de un sitio con un hongo, que no está en una biopelícula, comprendiendo dicho método poner en contacto el sitio y/o el hongo, que no está en una biopelícula, con un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G junto con al menos un agente antifúngico, en donde

- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
- (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
- (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
- (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
- (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol, voriconazol o terbinafina; o
- (vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,

y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.

En otro aspecto la invención proporciona un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G para usar junto con al menos un agente antifúngico en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, en donde el hongo no está en una biopelícula, en donde

- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
- (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
- (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
- (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
- (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol, voriconazol o terbinafina; o
- (vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,

y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.

En otro aspecto la invención proporciona un producto que contiene un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G y un agente antifúngico como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, en donde el hongo no está en una biopelícula, en donde

- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
- (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
- (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
- (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
- (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol,

voriconazol o terbinafina; o

(vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,

5 y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.

10 En el presente documento también se describe un método para mejorar la eficacia de un agente antifúngico contra un hongo, y en particular la efectividad (o eficacia) de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de un hongo, (que incluye la inhibición del crecimiento y/o la viabilidad de una población de hongos), comprendiendo dicho método usar dicho agente antifúngico junto con (o en combinación o conjunción con) un oligómero de alginato.

15 Dicho método puede implicar poner en contacto dicho hongo, o un sitio en el que dicho hongo puede existir o existe, con un oligómero de alginato junto con (o en conjunción o combinación con) el agente antifúngico.

20 Por lo tanto, se apreciará que, además de mejorar la acción del agente antifúngico cuando un hongo está realmente presente (es decir, en presencia de infección fúngica o colonización fúngica de cualquier sitio), el método también puede usarse profilácticamente para inhibir (por ejemplo, prevenir, reducir o retrasar) la infección o colonización por hongos, por ejemplo en sitios o en sujetos susceptibles o en riesgo de colonización o infección por hongos.

25 La etapa de contacto puede comprender poner en contacto el hongo (más particularmente los hongos) o el sitio con el oligómero de alginato al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo que, antes de poner en contacto el hongo o sitio con el agente antifúngico en una cantidad eficaz para mejorar la eficacia del agente antifúngico contra el hongo y, en particular, la efectividad (o eficacia) del agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad del hongo (o población de hongos).

30 El término "contacto" abarca cualquier medio de administrar el oligómero de alginato al hongo o sitio, ya sea directa o indirectamente, y por lo tanto cualquier medio de aplicar el oligómero de alginato al hongo o sitio, o exponer el hongo o sitio al oligómero de alginato, p. ej. aplicando el oligómero de alginato directamente al hongo o sitio. Como se explica a continuación más detalladamente, se incluyen expresamente dentro del alcance de la invención los métodos que no se llevan a cabo en o sobre el cuerpo humano o de un animal no humano, o en relación con, o en o sobre un dispositivo o material total o parcialmente contenido en o sobre el cuerpo humano o no humano.

35 Por "colonización" se entiende la presencia de un hongo en un sitio o localización particular. En particular, la colonización no deseada, p. ej. contaminación, está abarcada por este término.

Por lo tanto, la colonización puede verse como el establecimiento de un hongo una localización y la expansión de los números de ese organismo mediante la replicación o el reclutamiento de hongos adicionales, que pueden ser del mismo o diferente tipo. Esta colonia puede considerarse una población de hongos.

40 También se describe en el presente documento un método para combatir un hongo (que incluye una población de hongos, así como un individuo u hongo individual o célula fúngica), comprendiendo dicho método poner en contacto dicho hongo, o un sitio en el que dicho hongo esté o pueda estar localizado, con (particularmente con una cantidad eficaz de) un oligómero de alginato junto con (particularmente junto con una cantidad eficaz de) al menos un agente antifúngico. Tal método puede ser particularmente un método *in vitro* o *ex vivo*.

45 Una población de hongos puede ser homogénea (es decir, contener un solo tipo de hongo) o puede ser heterogénea (es decir, contener una pluralidad de tipos de hongos y/u otros microorganismos). Algunos o todos los hongos en la población pueden ser patógenos. La población puede ser una población establecida o ser una población parcialmente establecida. En otras palabras, la localización a tratar ha sido colonizada previamente por al menos un hongo que ha multiplicado o reclutado a otros hongos para establecer la población.

50 Por "usar junto" o "junto con" (o en combinación o conjunción con) se entiende particularmente que una cantidad eficaz del oligómero de alginato y una cantidad eficaz del agente antifúngico se administren/apliquen de tal manera que se tenga como resultado que el hongo (más particularmente los hongos) o el sitio se pongan en contacto con el oligómero de alginato al mismo tiempo, o sustancialmente al mismo tiempo, o antes de ponerse en contacto con el agente antifúngico.

55 En el contexto de los tratamientos farmacéuticos, las cantidades eficaces serán cantidades farmacéuticamente eficaces. Se puede emplear cualquier régimen de dosificación clínicamente aceptable para lograr este "usar junto". El experto podría tener en cuenta cualquier factor variable relevante (por ejemplo, las vías de administración, la biodisponibilidad y la farmacocinética del oligómero y el agente antifúngico que se utiliza, el estado físico del sujeto, la localización del hongo, etc.) para diseñar un régimen de dosificación apropiado para un sujeto en particular. En una realización, se administra una cantidad farmacéuticamente eficaz del oligómero de alginato al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo que o antes de administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del agente antifúngico. En otras realizaciones, el oligómero se administra por separado de y después del agente antifúngico. El experto podría diseñar fácilmente su régimen de dosificación para maximizar la mejora en la eficacia del agente

antifúngico contra hongos e infecciones fúngicas. También podría seleccionar combinaciones óptimas de los dos agentes activos dependiendo de la situación clínica particular a la que se enfrente.

En un contexto no farmacéutico, se puede emplear cualquier régimen de aplicación ambientalmente aceptable (por ejemplo, agrícola) para lograr este "usar junto". Sin embargo, dichos regímenes también pueden ser farmacéuticamente aceptables y/o fisiológicamente aceptables. El experto podría tener en cuenta cualquier factor variable relevante (por ejemplo, las vías de aplicación, la biodisponibilidad y la longevidad ambiental del oligómero y el agente antifúngico que se utiliza, la localización del hongo, el contexto ambiental más amplio de la localización a tratar, etc.) para diseñar un régimen de aplicación apropiado para una ubicación particular a tratar. En una realización, se administra una cantidad ambientalmente eficaz del oligómero de alginato al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo que o antes de administrar una cantidad ambientalmente eficaz del agente antifúngico. En otras realizaciones, el oligómero se administra por separado de y después del agente antifúngico. El experto podría diseñar fácilmente su régimen de aplicación para maximizar la mejora en la eficacia del agente antifúngico contra hongos. También podría seleccionar combinaciones óptimas de los dos agentes activos dependiendo de la situación ambiental particular a la que se enfrente.

"Uso junto/junto con" no implica que los agentes respectivos estén necesariamente presentes en la misma formulación o composición, y por consiguiente si se usan, o administran, al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo, no es necesario que el oligómero de alginato y el agente antifúngico estén presentes, de hecho, lo más probable es que no estén presentes en la misma composición o formulación, pero pueden administrarse por separado. Por lo tanto, el uso/administración "separado" incluye el uso/administración al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo, o en diferentes momentos, p. ej. secuencialmente, o en diferentes intervalos de tiempo de acuerdo con la dosis deseada o el régimen de uso.

La expresión "infectado con" (o "infectado por" o "una infección fúngica de un sujeto") se usa ampliamente en el presente documento para indicar que el sujeto puede comprender, contener o portar, el hongo en cuestión, es decir, que el hongo puede simplemente estar presente en o sobre el sujeto, y esto puede incluir cualquier sitio o localización en o sobre el cuerpo del sujeto. No es necesario que la infección del sujeto se manifieste como una enfermedad clínica (es decir, que la infección provoque síntomas clínicos en el sujeto), aunque esto, por supuesto, está incluido. Un sujeto sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección puede ser un sujeto que ha estado expuesto al hongo o un sujeto infectado, o un sujeto que presenta signos o síntomas clínicos de infección (en el caso de una sospecha de infección), o un sujeto que es susceptible a la infección, ya sea en general (por ejemplo, debido al estado clínico del sujeto) o particularmente al hongo en cuestión. La expresión "infección fúngica de una planta" debe interpretarse de acuerdo con esto.

También se divulga en el presente documento el uso de un oligómero de alginato para la fabricación de un medicamento para usar con al menos un agente antifúngico en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, o para aumentar la eficacia de dicho agente antifúngico contra un hongo o una infección fúngica de un sujeto.

El medicamento puede comprender además el agente antifúngico (o agentes antifúngicos). El medicamento puede estar en forma de una composición o formulación única que comprende el oligómero de alginato y el o los agentes antifúngicos o se pueden preparar y usar composiciones o formulaciones separadas, conteniendo cada una el oligómero de alginato o el agente o agentes antifúngicos, respectivamente.

Por lo tanto, en el presente documento se divulga más particularmente el uso de un oligómero de alginato y al menos un agente antifúngico para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, o para aumentar la eficacia de dicho agente antifúngico contra un hongo o una infección fúngica de un sujeto.

Tal como se ha indicado anteriormente, el agente antifúngico se puede aplicar o administrar por separado del oligómero de alginato.

De acuerdo con los diversos aspectos de la invención, el agente antifúngico se puede aplicar o administrar simultáneamente con el oligómero de alginato o secuencialmente. Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización, el agente antifúngico se administra al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo que el oligómero de alginato, y en otra realización se administra después del oligómero de alginato. En otras realizaciones, el oligómero se administra por separado de y después del agente antifúngico. Dentro del alcance de "sustancialmente al mismo tiempo" se incluye la aplicación o administración del agente antifúngico inmediatamente o casi inmediatamente antes o después del oligómero de alginato. La expresión "casi inmediatamente" puede interpretarse que incluye una aplicación o administración en una hora desde la aplicación o administración anterior, preferentemente en 30 minutos. Sin embargo, el agente antifúngico puede aplicarse o administrarse al menos 1 hora, al menos 3 horas, o al menos 6 horas o más después del oligómero de alginato. En estas realizaciones, el agente antifúngico puede aplicarse o administrarse con o sin una aplicación adicional de un oligómero de alginato. El oligómero de alginato puede aplicarse o administrarse en una pluralidad de aplicaciones antes o con el agente antifúngico, incluyendo como se indicó anteriormente, una aplicación o administración inmediatamente o casi inmediatamente después del agente antifúngico.

En otras realizaciones, el o los agentes antifúngicos pueden aplicarse o administrarse convenientemente antes del oligómero de alginato, p. ej. al menos 1 hora, al menos 3 horas, al menos 6 horas antes del oligómero de alginato. En estas realizaciones, el oligómero de alginato puede aplicarse o administrarse con o sin una aplicación adicional del agente antifúngico. El agente antifúngico puede aplicarse o administrarse en una pluralidad de aplicaciones antes de o con, el oligómero de alginato.

También de acuerdo con ciertos aspectos de la invención, puede haber una etapa anterior de identificar a un sujeto como infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, o una etapa de diagnosticar a un sujeto como infectado o en riesgo de infección, con un hongo. En otros aspectos, puede haber una etapa anterior de identificar un sitio como colonizado, sospechoso de ser colonizado o en riesgo de colonización, con un hongo.

Tal como se ha indicado anteriormente, los alginatos normalmente se encuentran como polímeros de peso molecular medio de al menos 35.000 Daltons, es decir, de aproximadamente 175 a aproximadamente 190 restos de monómeros, aunque normalmente mucho mayores, y un oligómero de alginato se puede definir como un material obtenido por fraccionamiento (es decir, reducción de tamaño) de un polímero de alginato, generalmente un alginato natural. Un oligómero de alginato se puede considerar que es un alginato de un peso molecular medio de menos de 35.000 Daltons (es decir, menos de aproximadamente 190 o menos de aproximadamente 175 restos de monómeros), en particular un alginato de peso molecular medio de menos de 30.000 Daltons (es decir, menos de aproximadamente 175 o menos de aproximadamente 150 restos de monómeros) más en particular un peso molecular medio de menos de 25.000 o 20.000 Daltons (es decir, menos de aproximadamente 135 o 125 restos de monómeros o menos de aproximadamente 110 o 100 restos de monómeros).

Visto de forma alternativa, un oligómero en general comprende 2 o más unidades o restos y un oligómero de alginato para usar según la invención normalmente contendrá de 2 a 50, más preferentemente de 2 a 40, de 2 a 35 o de 2 a 30 restos. Por lo tanto, un oligómero de alginato puede tener un peso molecular medio de 350 a 20.000 Daltons, preferentemente de 350 a 15.000 Daltons, preferentemente de 350 a 10.000 Daltons y más preferentemente de 350 a 8.000 Daltons, de 350 a 7.000 Daltons, o de 350 a 6.000 Daltons.

De forma alternativa, el polímero de alginato puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (Dpn) de 2 a 50, más preferentemente de 2 a 40, de 2 a 35, de 2 a 30, de 2 a 28, de 2 a 25, de 2 a 22, de 2 a 20, de 2 a 18, de 2 a 17, de 2 a 15 o de 2 a 12.

Otros intervalos representativos (ya sea por el número de restos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 a uno cualquiera de 50, 45, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13 o 12.

Otros intervalos representativos (ya sea por el número de restos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 a uno cualquiera de 50, 45, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17 o 16.

Otros intervalos representativos (ya sea por el número de restos, DP o DPn) incluyen uno cualquiera de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o de 18 a uno cualquiera de 50, 45, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 o 19.

Un oligómero de alginato contendrá (o comprenderá), como se ha señalado anteriormente, restos o unidades de guluronato o ácido gulurónico (G) y/o manuronato o ácido manurónico (M). Un oligómero de alginato según la invención estará compuesto preferentemente solo, o sustancialmente solo (es decir, consiste esencialmente en) de restos de uronato/ácido urónico, más particularmente solo o sustancialmente solo de restos G y/o M. De forma alternativa a lo expresado, en el oligómero de alginato de uso en la presente invención, al menos el 80 %, más particularmente al menos el 85, 90, 95 o 99 % de los restos de monómero pueden ser restos de uronato/ácido urónico, o, más particularmente, restos G. En otras palabras, preferentemente el oligómero de alginato no comprenderá otros restos o unidades (p. ej. otros restos de sacárido, o más particularmente otros restos de ácido urónico/uronato).

El oligómero de alginato es preferentemente un oligómero lineal.

Al menos el 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de los restos de monómero son guluronato. En una realización, el oligómero de alginato puede ser un oligoguluronato (es decir, un homooligómero de G, o 100 % de G)

En una realización preferida adicional, los alginatos descritos anteriormente de la invención tienen una estructura primaria en donde la mayoría de los restos G están en los llamados bloques G. Preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o 75 % y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90, 92 o 95 % de los restos G están en bloques G. Un bloque G es una secuencia contigua de al menos dos restos G, preferentemente al menos 3 restos G contiguos, más preferentemente al menos 4 o 5 restos G contiguos, lo más preferentemente al menos 7 restos G contiguos.

En particular al menos el 90 % de los restos G están unidos mediante uniones 1-4 a otro resto G. Más particularmente

al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 % y, lo más preferentemente, al menos el 99 % de los restos G del alginato están unidos mediante uniones 1-4 otro resto G.

El oligómero de alginato de uso en la invención es preferentemente un oligómero de 3 a 35 restos, más preferentemente de 3 a 28 restos, en particular de 4 a 25 restos, p. ej. de 5 a 20 restos, especialmente de 6 a 22 restos, en particular de 8 a 20 restos, especialmente de 10 a 15 restos, que tiene p. ej. un peso molecular en el intervalo de 350 a 6.400 Daltons o de 350 a 6.000 Daltons, preferentemente de 550 a 5.500 Daltons, preferentemente de 750 a 5.000 Daltons, y especialmente de 750 a 4.500 Daltons o de 2.000 a 3.000 Daltons o de 900 a 3.500 Daltons. Otros oligómeros de alginato representativos incluyen, como se ha mencionado anteriormente, oligómeros con 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o de 12 a 50, 45, 40, 35, 28, 25, 22 o 20 restos.

Puede ser un solo compuesto o puede ser una mezcla de compuestos, p. ej. de un intervalo de grados de polimerización. Tal como se ha indicado anteriormente, los restos monoméricos en el oligómero de alginato, pueden ser iguales o diferentes y no es necesario que lleven todos grupos con carga eléctrica, aunque se prefiere que la mayoría (por ejemplo, al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 % más preferentemente al menos el 90 %) la lleven. Se prefiere que una mayoría sustancial, p. ej. al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 90 % de los grupos cargados tengan la misma polaridad. En el oligómero de alginato, la relación entre grupos hidroxilo y grupos cargados es preferentemente al menos 2:1, más especialmente al menos 3:1.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 3-28, 4-25, 6-22, 8-20 o 10-15, o 5-18 o 7-15 u 8-12, especialmente 10.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 5-50, 5-40, 5-35, 5-30, 5-28, 5-25, 5-22, 5-20, 5-18, 5-16 o 5-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 8-50, 8-40, 8-35, 8-30, 8-28, 8-25, 8-22, 8-20, 8-18, 8-16 u 8-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 9-50, 9-40, 9-35, 9-30, 9-28, 9-25, 9-22, 9-20, 9-18, 9-16 o 9-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 10-50, 10-40, 10-35, 10-30, 10-28, 10-25, 10-22, 10-20, 10-18, 10-16 o 10-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 12-50, 12-40, 12-35, 12-30, 12-28, 12-25, 12-22, 12-20, 12-18, 12-16 o 12-14.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 15-50, 15-40, 15-35, 15-30, 15-28, 15-25, 15-22, 15-20, 15-18 o 15-16.

El oligómero de alginato de la invención puede tener un grado de polimerización (DP) o un grado de polimerización medio en número (DP_n), de 18-50, 18-40, 18-35, 18-30, 18-28, 18-25, 18-22 o 18-20.

Preferentemente, el oligómero de alginato de la invención está sustancialmente exento, preferentemente esencialmente exento, de oligómeros de alginato que tienen un grado de polimerización fuera de los intervalos divulgados en el presente documento. Esto se puede expresar en términos de la distribución de pesos moleculares del oligómero de alginato de la invención, p. ej., el porcentaje de cada mol de oligómero de alginato que se usa de acuerdo con la invención que tiene un DP fuera del intervalo relevante. La distribución de pesos moleculares es preferentemente tal que no más del 10 %, preferentemente no más del 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % en moles tienen un DP de tres, dos o uno mayor que el límite superior relevante para el DP_n . Igualmente se prefiere que no más del 10 %, preferentemente no más del 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % en moles tenga un DP inferior a un número tres, dos o uno menor que el límite inferior relevante para el DP_n .

Los oligómeros de alginato adecuados se describen en los documentos WO2007/039754, WO2007/039760, WO 2008/125828, y WO2009/068841.

Los oligómeros de alginato adecuados representativos tienen un DP_n en el intervalo de 5 a 30, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20, y al menos el 95 % en moles de DP de no más de 25.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 7 a 15 (preferentemente de 8 a 12), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,85 (preferentemente al menos 0,90), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15 (preferentemente no más de 0,10), y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 17 (preferentemente menos de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 5 a 18

(especialmente de 7 a 15), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80 (preferentemente al menos 0,85, especialmente al menos 0,92), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20 (preferentemente no más de 0,15, especialmente no más de 0,08), y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 20 (preferentemente menos de 17).

5 Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 5 a 18, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08, y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 20.

10 Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 5 a 18 (preferentemente de 7 a 15, más preferentemente de 8 a 12, especialmente aproximadamente 10), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80 (preferentemente al menos 0,85, más preferentemente al menos 0,90, especialmente al menos 0,92, lo más especialmente al menos 0,95), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20 (preferentemente no más de 0,15, más preferentemente no más de 0,10, especialmente no más de 0,08, lo más
15 especialmente no más de 0,05), y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 20 (preferentemente menos de 17, más preferentemente menos de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 7 a 15 (preferentemente de 8 a 12), una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92 (preferentemente al
20 menos 0,95), una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08 (preferentemente no más de 0,05), y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 17 (preferentemente menos de 14).

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 5 a 18, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,80, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,20,
25 y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 20.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 7 a 15, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,85, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15,
30 y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 17.

Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 7 a 15, una fracción de guluronato/galacturonato (F_G) de al menos 0,92, una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,08,
y que tiene al menos 95 % en moles con un grado de polimerización de menos de 17.

35 Otros oligómeros de alginato adecuados tienen un grado de polimerización medio en número en el intervalo de 5 a 20, una fracción de guluronato (F_G) de al menos 0,85 y una fracción de manuronato (F_M) de no más de 0,15.

Por lo tanto, se verá que una clase particular de oligómeros de alginato favorecidos de acuerdo con la presente
40 invención son oligómeros de alginato definidos como los llamados oligómeros de "alto contenido en G" o "bloques G", es decir, que tienen un alto contenido de restos G o bloques G (p. ej. en donde al menos el 80 % de los restos de monómeros son G, preferentemente dispuestos en bloques de G). Sin embargo, existen otros tipos de oligómero de alginato, incluyendo en particular oligómeros de "alto contenido en M" o "bloques M" u oligómeros de bloques MG, como se describe adicionalmente a continuación. Los oligómeros en donde al menos el 80 % de los restos de monómero en el oligómero son restos G con uniones 1-4 con otro resto G, o más preferiblemente al menos el 85, 90,
45 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de los restos de monómeros del oligómero son restos G con uniones 1-4 a otro resto G se pueden usar de acuerdo con la invención. Esta unión 1-4 de dos restos G se puede expresar como alternativa como una unidad gulurónica unida a una unidad gulurónica adyacente.

En otros oligómeros de alginato al menos, o más particularmente más del 50 % de restos de monómeros del oligómero
50 de alginato pueden ser restos M (es decir, manuronato o ácido manurónico). En otras palabras, dichos oligómeros de alginato pueden contener al menos o como alternativa más del 50 % de restos de manuronato (o ácido manurónico). Los ejemplos específicos incluyen por lo tanto oligómeros con (que contienen p. ej.) del 50 al 70 % de restos M (manuronato) o p. ej. del 70 al 100 % de restos de M (manuronato). Otros ejemplos específicos también incluyen oligómeros que contienen del 71 al 85 % de restos M o del 85 al 100 % de restos M. Por lo tanto, un oligómero de
55 alginato puede contener más del 70 % de restos M (es decir, más del 70 % de restos de monómeros del oligómero de alginato serán restos M).

En otros ejemplos al menos el 50 % o 60 %, más particularmente al menos el 70 % o 75 %, incluso más
60 particularmente al menos el 80, 85, 90, 95 o 99 % de los restos de monómero son manuronato. En un ejemplo, el oligómero de alginato puede ser un oligoguluronato (es decir, un homooligómero de M, o el 100 % de M).

En otro ejemplo los alginatos descritos anteriormente de la invención tienen una estructura primaria en donde la
mayoría de los restos M están en los llamados bloques M. En dichos ejemplos preferentemente, al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o 75 %, y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90 o 95 % de los restos M
65 están en bloques M. Un bloque M es una secuencia contigua de al menos dos restos M, preferentemente al menos 3 restos M contiguos, más preferentemente al menos 4 o 5 restos M contiguos, lo más preferentemente al menos 7

restos M contiguos.

En particular, al menos el 90 % de los restos M están unidos mediante uniones 1-4 a otro resto M. Más particularmente al menos el 95 %, más preferentemente al menos el 98 % y, lo más preferentemente, al menos el 99 % de los restos M del alginato están unidos mediante uniones 1-4 otro resto M.

Otros oligómeros son oligómeros de alginato en donde al menos el 70 % de los restos de monómero en el oligómero son restos M con uniones 1-4 con otro resto M, o más preferentemente al menos el 75 %, y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de los restos de monómeros del oligómero son restos M con uniones 1-4 a otro resto M. Esta unión 1-4 de dos restos M se puede expresar como alternativa como una unidad manurónica unida a una unidad manurónica adyacente.

En otra realización adicional, los oligómeros de alginato de la invención comprenden una secuencia de restos M y G alternantes. Una secuencia de al menos tres, preferentemente al menos cuatro, restos M y G alternantes representa un bloque MG. Preferentemente, los oligómeros de alginato de la invención comprenden un bloque MG. Expresado más específicamente, un bloque MG es una secuencia de al menos tres restos contiguos que consisten en restos G y M y en donde cada resto G no terminal (interno) en la secuencia contigua está unido mediante uniones 1-4 y 4-1 a un resto M, y cada resto M no terminal (interno) en la secuencia contigua está unido mediante uniones 1-4 y 4-1 a un resto G. Preferentemente el bloque MG tiene al menos 5 o 6 restos contiguos, más preferentemente al menos 7 u 8 restos contiguos.

En una realización adicional, el uronato minoritario en el oligómero de alginato (es decir, manuronato o guluronato) se encuentra predominantemente en los bloques MG. En esta realización preferentemente, al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 o 75% y lo más preferentemente al menos el 80, 85, 90 o 95 % de los monómeros de uronato minoritarios en el oligómero de alginato de bloques MG están presentes en los bloques MG. En otra realización, el oligómero de alginato está dispuesto de modo que al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 99 %, p. ej. el 100 % de los restos G y M en el oligómero de alginato están dispuestos en bloques MG.

Los oligómeros de alginato que contienen bloques MG pueden contener al menos 1 %, pero menos de 100 %, de restos de guluronato (ácido gulurónico), aunque generalmente los oligómeros de alginato que contienen bloques MG contendrán al menos 30 % (o al menos 35, 40 o 45 % o 50 % de G) pero menos de 100 % de G. Ejemplos específicos por lo tanto incluyen oligómeros de alginato que contienen bloques MG con (p. ej. que contienen) de 1 a 30 % de restos G (guluronato), de 30 a 70 % de restos G (guluronato) o de 70 a 99 % de restos G (guluronato). Por lo tanto, los oligómeros de alginato que contienen bloques MG pueden contener más del 30 %, pero menos del 70 %, de restos G (es decir, más del 30 %, pero menos del 70 %, de los restos de monómeros del oligómero de alginato que contiene bloques MG serán restos G).

Preferentemente más del 30 %, más particularmente más del 35 % o 40 %, incluso más particularmente más del 45, 50, 55, 60 o 65 %, pero en cada caso menos del 70 %, de los restos de monómero de un oligómero de alginato que contiene bloques MG será guluronato. Como alternativa, menos del 70 %, más preferentemente menos del 65 % o 60 %, incluso más preferentemente más del 55, 50, 45, 40 o 35 %, pero en cada caso más del 30 % de los restos de monómero de un oligómero de alginato que contiene bloques MG será guluronato. Se puede elegir cualquier intervalo formado por cualquier combinación de estos valores. Por lo tanto, por ejemplo, el oligómero de alginato que contiene bloques MG puede tener p. ej. entre 35 % y 65 %, 40 % y 60 % o 45 % y 55 % de restos G.

En otro ejemplo un oligómero de alginato que contiene bloques MG puede tener cantidades aproximadamente iguales de restos G y M (p. ej., relaciones entre 65 % G/35 % M y 35 % G/65 % M, por ejemplo 60 % G/40 % M y 40 % G/60 % M; 55 % G/45 % M y 45 % G/55 % M; 53 % G/47 % M y 47 % G/53 % M; 51 % G/49 % M y 49 % G/51 % M; p. ej. aproximadamente 50 % G y aproximadamente 50 % M) y estos restos están dispuestos predominantemente, preferentemente enteramente o de forma tan completa como sea posible, en un patrón MG alternante (p. ej. al menos el 50 % o al menos el 60, 70, 80, 85, 90 o 95 % o 100 % de los restos M y G están en una secuencia MG alternante).

En determinadas realizaciones, los restos de ácido urónico terminales de los oligómeros de uso en la invención, no tienen un doble enlace, en especial un doble enlace situado entre los átomos C₄ y C₅. Dichos oligómeros se pueden describir como que tienen restos de ácido urónico terminales saturados. El experto podrá preparar oligómeros con restos de ácido urónico terminales saturados sin demasado trabajo. Esto puede ser mediante el uso de técnicas de producción que dan dichos oligómeros, o convirtiendo (saturando) oligómeros producidos por procesos que dan oligómeros con restos de ácido urónico terminales insaturados.

El oligómero de alginato normalmente llevará una carga y por lo tanto los contraiones del oligómero de alginato pueden ser cualquier ion fisiológicamente tolerable, en especial aquellos usados habitualmente en fármacos cargados, por ejemplo sodio, potasio, amonio, cloruro, mesilato, meglumina, etc. También se pueden usar iones que promueven la gelificación del alginato, p. ej. iones de metales del grupo 2.

Aunque el oligómero de alginato puede ser un material sintético generado a partir de la polimerización de números

adecuados de restos de guluronato y manuronato, los oligómeros de alginato de uso en la invención pueden obtenerse, producirse o derivarse convenientemente de fuentes naturales tales como las mencionadas anteriormente, concretamente de materiales de fuentes de alginato naturales.

5 La escisión de polisacárido a oligosacárido para producir el oligómero de alginato que se puede usar de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo usando técnicas de lisis de polisacáridos convencionales tales como digestión enzimática e hidrólisis ácida. En una realización favorecida, se usa la hidrólisis ácida para preparar los oligómeros de alginato de uso en la invención. En otras realizaciones, se usa la digestión enzimática con una etapa o etapas de procesamiento adicionales para saturar los ácidos urónicos terminales de los oligómeros.

10 A continuación, los oligómeros se pueden separar de los productos de rotura de los polisacáridos por cromatografía usando una resina de intercambio iónico o por precipitación fraccionada o solubilización o filtración. Los documentos US 6.121.441 y WO 2008/125828 describen un proceso adecuado para la preparación de oligómero de alginato de uso en la invención. Más información adicional y detalles se puede encontrar por ejemplo en "Handbooks of Hydrocolloids", Ed. Phillips and Williams, CRC, Boca Raton, Florida, EE.UU., 2000.

15 Los oligómeros de alginato también se pueden modificar químicamente, incluyendo, pero sin limitación, la modificación para añadir grupos cargados (tales como glicanos carboxilados o carboximetilados) y oligómeros de alginato modificados para alterar la flexibilidad (p. ej., oxidación por peryodato).

20 Los oligómeros de alginato (por ejemplo ácidos oligogulurónicos) adecuados para usar de acuerdo con la invención se pueden producir de forma convencional por hidrólisis ácida de ácido algínico a partir de, pero sin limitación, *Laminaria hyperbora* y *Lessonia nigrescens*, disolución a pH neutro, adición de ácido mineral para reducir el pH a 3,4 para precipitar el oligómero de alginato (ácido oligogulurónico), lavado con ácido débil, resuspensión a pH neutro y liofilización.

25 Los alginatos para la producción de oligómeros de alginato de uso en la invención también se pueden obtener directamente a partir de fuentes bacterianas adecuadas, p. ej. de *Pseudomonas aeruginosa* o *Azotobacter vinelandii*.

30 En realizaciones en las que se requieren oligómeros de alginato que tienen estructuras primarias en las que la mayoría de los restos G están dispuestos en bloques G en lugar de como restos individuales, se espera que las fuentes de algas sean más adecuadas teniendo en cuenta el hecho de que los alginatos producidos en estos organismos tienden a tener estas estructuras. Las fuentes bacterianas pueden ser más adecuadas para obtener oligómeros de alginato de diferentes estructuras.

35 El aparato molecular implicado en la biosíntesis de alginato en *Pseudomonas fluorescens* y *Azotobacter vinelandii* se ha clonado y caracterizado (documento WO 94/09124; Ertesvag, H., et al, Metabolic Engineering, 1999, Vol 1, 262-269; documento WO 2004/011628; Gimmestad, M., et al (*supra*), Remminghorst and Rehm, Biotechnology Letters, 2006, Vol 28, 1701-1712; Gimmestad, M. et al., Journal of Bacteriology, 2006, Vol 188(15), 5551-5560) y se pueden obtener fácilmente alginatos de estructuras primarias hechas a medida manipulando estos sistemas.

40 El contenido de G de los alginatos (por ejemplo, un material de fuentes de algas) se puede aumentar por epimerización, por ejemplo con manuronano C-5 epimerasas de por ejemplo A. *vinelandii* u otras enzimas epimerasas. Por lo tanto, por ejemplo la epimerización *in vitro* se puede llevar a cabo con epimerasas aisladas de *Pseudomonas* o *Azotobacter*, p. ej. AlgG de *Pseudomonas fluorescens* o *Azotobacter vinelandii* o las enzimas AlgE (AlgE1 a AlgE7) de *Azotobacter vinelandii*. El uso de epimerasas de otros organismos que tienen la capacidad de producir alginato, en particular las algas, también está específicamente contemplado. La epimerización *in vitro* de alginatos con bajo contenido de G con epimerasas AlgE de *Azotobacter vinelandii* se describe en detalle en Ertesvag et al. (*supra*) y Strugala et al. (Gums and Stabilisers for the Food Industry, 2004, 12, The Royal Society of Chemistry, 84 - 94).

45 50 Para obtener alginatos u oligómeros de alginato que contienen bloques G, se prefiere la epimerización con una o más epimerasas AlgE de *Azotobacter vinelandii* distintas a AlgE4 ya que estas enzimas son capaces de producir estructuras de bloques G. Por otra parte, la epimerasa AlgE4 se puede usar para crear alginatos u oligómeros de alginato con tramos de secuencia M/G que alternan o estructuras primarias que contienen restos G individuales, ya que se ha descubierto que esta enzima parece que epimeriza con preferencia los restos M individuales para así producir restos G individuales unidos a restos M en lugar de producir bloques G. Se pueden obtener estructuras primarias particulares usando diferentes combinaciones de estas enzimas.

55 60 Las versiones mutadas de estas enzimas u homólogas de otros organismos también se contemplan específicamente para el uso. El documento WO 94/09124 describe enzimas manuronano C-5 epimerasas (enzimas AlgE) recombinantes o modificadas, por ejemplo, codificadas por secuencias de epimerasa en las que las secuencias de ADN que codifican los diferentes dominios o módulos de las epimerasas se han desordenado o eliminado y recombinado. Como alternativa, se pueden usar mutantes de enzimas epimerasa naturales, (AlgG o AlgE), obtenidas por ejemplo por mutagénesis dirigida al sitio o al azar de los genes AlgG o AlgE.

65 Un enfoque diferente es crear organismos *Pseudomonas* y *Azotobacter* que han mutado algunos o todos sus genes

de epimerasa de tal forma que esos mutantes producen alginatos de la estructura requerida para la posterior producción de oligómero de alginato, o incluso oligómeros de alginato de la estructura y tamaño (o peso molecular) requeridos. La generación de una serie de organismos *Pseudomonas fluorescens* con genes AlgG mutados se describe en detalle en el documento WO 2004/011628 y Gimmestad, M., *et al*, 2003 (*supra*). La generación de una serie de organismos *Azotobacter vinelandii* con genes AlgE mutados se divulga en Gimmestad, M., *et al*, 2006 (*supra*). El experto podrá usar esta enseñanza para producir mutantes nuevos que se puedan usar para dar lugar a oligómeros de alginato de uso en la invención sin demasiado trabajo.

Un enfoque adicional es eliminar o inactivar los genes de epimerasa endógenos de un organismo *Azotobacter* o de un organismo *Pseudomonas* y después introducir uno o más genes de epimerasa exógenos, que pueden estar o no mutados (es decir, pueden ser de tipo silvestre o modificados) y cuya expresión se puede controlar, por ejemplo, mediante el uso de promotores inducibles u otros "promotores controlables". Seleccionando las combinaciones de genes adecuadas, se pueden producir alginatos de estructura primaria predeterminada.

Un procedimiento adicional sería introducir parte o toda la maquinaria de biosíntesis de alginato de *Pseudomonas* y/o *Azotobacter* en un organismo no productor de alginato (p. ej. *E. coli*) e inducir la producción del alginato a partir de estos organismos genéticamente modificados.

Cuando se usan estos sistemas basados en cultivo, la estructura primaria de los productos de alginatos u oligómeros de alginato puede verse influenciada por las condiciones de cultivo. Está perfectamente dentro de las capacidades del experto ajustar los parámetros del cultivo tales como la temperatura, la osmolaridad, los niveles/fuentes de nutrientes y los parámetros atmosféricos, con el fin de manipular la estructura primaria de los alginatos producidos por un organismo particular.

Las referencias a "restos G/G" y "restos M/M" o a ácido gulurónico o ácido manurónico, o guluronato o manuronato deben interpretarse de forma intercambiable como referencias a ácido gulurónico/guluronato y ácido manurónico/manuronato (específicamente ácido α -L-gulurónico/guluronato y ácido β -D-manurónico/manuronato), e incluyen además derivados de los mismos en los cuales una o más cadenas laterales o grupos disponibles se han modificado sin dar como resultado una capacidad para mejorar la eficacia de un agente antifúngico contra un hongo y en particular la efectividad (o eficacia) de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o viabilidad de un hongo que es sustancialmente menor que la del oligómero no modificado. Los grupos modificados de sacáridos comunes incluirían grupos acetilo, sulfato, amino, desoxi, alcohol, aldehído, cetona, éster y anhídrido. Los oligómeros de alginato también se pueden modificar químicamente para añadir grupos cargados (tales como glicanos carboxilados o carboximetilados), y para alterar la flexibilidad (p. ej., oxidación por peryodato). El experto será consciente de otras modificaciones químicas adicionales más que se pueden hacer en las subunidades de monosacáridos de los oligosacáridos, y estas se pueden aplicar a los oligómeros de alginato de uso en la invención.

Un agente antifúngico es cualquier agente que tiene una actividad biocida/bioestática que es relativamente específica y selectiva para los hongos. De acuerdo con la invención, los agentes tales como antisépticos, desinfectantes y agentes de esterilización no se consideran "agentes antifúngicos" porque estos agentes tienen un amplio espectro de actividad biocida/bioestática en el sentido de que su actividad no muestra especificidad o selectividad apreciable por hongos sobre otros tipos de células (p. ej., bacterias, protozoos, animales, etc.).

Un agente antifúngico puede denominarse agente antimicótico y los términos se usan en el presente documento de manera intercambiable.

En ciertos contextos, p. ej. en ciertos contextos terapéuticos, médicos o clínicos, un agente antifúngico puede ser un fármaco antifúngico (o antimicótico), que puede considerarse que es un agente antifúngico que puede administrarse, incluyendo internamente, a un sujeto animal en cantidades suficientes para ejercer un antifúngico sin ser perjudicial para la salud física a largo plazo para el sujeto.

En otras realizaciones determinadas, p. ej. en un contexto ambiental, particularmente un contexto agrícola, de producción de alimentos o de ingeniería, un agente antifúngico puede ser un fungicida (o micocida), que puede considerarse un agente antifúngico que no está diseñado para ser tomado internamente por un animal y que en lugar de esto ejerce sus efectos antifúngicos en lugares y en sitios fuera del cuerpo de un animal, por ejemplo mediante la aplicación o incorporación a materiales inanimados (p. ej. abióticos), plantas, semillas, productos vegetales, alimentos etc., o sobre una superficie exterior no comprometida de un animal. Por lo tanto, en algunos casos, un fungicida como se define en el presente documento puede usarse en un contexto terapéutico, médico o clínico, por ejemplo para prevenir la infección/colonización por hongos en la piel de un sujeto o sobre las superficies de equipos e instrumentos médicos.

En ciertos casos, un agente antifúngico tampoco muestra actividad antibacteriana, es decir, una actividad biocida/bioestática que es relativamente específica y selectiva para las bacterias, p. ej. un antibiótico antibacteriano. En ciertas realizaciones, el agente antifúngico no es un oligómero de alginato como se define en el presente documento.

A modo de ejemplo, los agentes antifúngicos incluyen, pero sin limitación, antifúngicos polienos (p. ej. natamicina, rimocidina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina, perimicina); antifúngicos azoles (p. ej. antifúngicos imidazoles, en particular, miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol; antifúngicos triazoles, en particular, fluconazol, fosfluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol, albaconazol; antifúngicos tiazoles, en particular, abafungina); antifúngicos alilaminas (p. ej., terbinafina, naftifina, butenafina, amorolfina); antifúngicos equinocandinas (p. ej., anidulafungina, caspofungina, micafungina); ciclopirox; tolnaftato; y flucitosina. El fármaco antifúngico puede estar en cualquier forma conveniente, incluyendo cualquier sal o hidrato farmacéuticamente aceptable. Las referencias a los fármacos antifúngicos mencionados anteriormente se extiende a cualquier forma isomérica en la cual puede existir el compuesto, así como mezclas de dos o más isómeros, por ejemplo, mezclas racémicas.

Los agentes antifúngicos pueden ser un fármaco que puede administrarse por vía sistémica, p. ej., anfotericina B, hamicina, ketoconazol, fluconazol, fosfluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, terbinafina, antifúngicos equinocandinas (p. ej., anidulafungina, caspofungina, micafungina) y flucitosina.

Los agentes antifúngicos pueden ser un fármaco que normalmente se administra como un tratamiento no sistémico, p. ej. como un tratamiento tópico. Los ejemplos representativos de tales fármacos incluyen, pero sin limitación, natamicina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina, perimicina, miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, fosfluconazol, isavuconazol, ravuconazol, terconazol, albaconazol, abafungina, antifúngicos alilaminas (p. ej., terbinafina, naftifina, butenafina, amorolfina), ciclopirox y tolnaftato.

Los agentes antifúngicos pueden ser un compuesto polieno (p. ej. natamicina, rimocidina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina, perimicina), en particular nistatina o anfotericina B. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, una posible explicación para el efecto de potenciación (p. ej. sinérgica) de los oligómeros de alginato sobre los agentes antifúngicos polienos, p. ej. nistatina y anfotericina B, como se observa en los ejemplos, es que los oligómeros de alginato tienen un efecto disruptivo directo en la membrana celular fúngica, como los agentes antifúngicos polienos, y esta combinación de efectos disruptivos es especialmente perjudicial para la integridad de la célula fúngica. Además, la diana molecular del modo de acción de los agentes antifúngicos polienos (ergosterol, que es similar a los esteroides de las membranas celulares de los animales) es tal que los antifúngicos polienos están especialmente asociados con efectos secundarios tóxicos. Por tanto, los métodos para mejorar su eficacia serían especialmente valiosos ya que permitirían su uso en dosis más bajas.

Otros agentes antifúngicos también ejercen sus efectos antifúngicos a través de una acción indirecta sobre la membrana celular o la pared celular de los hongos. En el caso de los antifúngicos azoles y alilaminas, se inhibe la síntesis de ergosterol, agotando así la membrana celular fúngica de este componente esencial. De manera similar, los antifúngicos equinocandinas inhiben la síntesis de glucano en los hongos, que es un componente esencial de las paredes celulares fúngicas. Por lo tanto, se cree que los oligómeros de alginato pueden potenciar el efecto de tales otros agentes antifúngicos de una manera similar.

En ciertas realizaciones, el agente antifúngico no es terbinafina o un antifúngico alilamina (p. ej. naftifina, butenafina, amorolfina).

A modo de ejemplo, los fungicidas incluyen, pero sin limitación, fungicidas alifáticos nitrogenados (p. ej. butilamina, cimoxanilo, dodicina, dodina, guazatina, iminocetadina); fungicidas amidas (p. ej. carpropamida, cloraniformetano, ciflufenamid, diclocimet, dimoxiestrobina, fenoxanilo, flumetover, furametpir, isopirazam, mandipropamid, metominoestrobina, orisaestrobina, pentiopirad, procloraz, quinazamida, siltiofam, triforina, xiwojunan); fungicidas ácido acilamino (p. ej. benalaxilo, benalaxil-M, furalaxilo, metalaxilo, metalaxil-M, pefurazoato, valifenalato); fungicidas anilidas (por ejemplo, benalaxilo, benalaxil-M, bixafeno, boscalid, carboxina, fenhexamid, fluxapiraxad, isotianilo, metalaxilo, metalaxil-M, metsulfovax, ofurace, oxadixilo, oxicarboxina, penflufeno, piracarbolido, sedaxano, tifulzamida, tiadinilo, vanguard); fungicidas benzanilidas (p. ej., benodanilo, flutolanilo, mebenilo, mepronilo, salicilanilida, tecloftalam); fungicidas furanilidas (p. ej., fenfuram, furalaxilo, furcarbanilo, metfuroxam); fungicidas sulfonanilidas (p. ej. flusulfamida); fungicidas benzamidas (p. ej. ácido benzohidroxámico, fluopicolida, fluopiram, tioxyimid, triclamida, zarilamid, zoxamida); fungicidas furamidas (p. ej. ciclafuramida, furmeciclox); fungicidas fenilsulfamida (p. ej. diclofluanida, lolifluanida); fungicidas sulfonamidas (p. ej. amisulbrom, ciazofamida); fungicidas valinamidas (p. ej. bentiaalicarb, iprovalicarb); fungicidas antibióticos (p. ej. aureofungina, blastidina-S, cicloheximida, griseofulvina, kasugamicina, moroxidina, polioxinas, polioxorima, validamicina); fungicidas estrobilurinas (p. ej. fluoxastrobina); fungicidas metoxiacrilato estrobilurina (p. ej. azoxistrobina, bifujunzhi, coumoxistrobina, enestroburina, jiaxiangjunzhi, picoxistrobina, piraioxistrobina); fungicidas metoxicarbanilato estrobilurina (p. ej. lvdinjunzhi, piraclostrobina, piramostrobina); fungicidas metoxiaminoacetamida estrobilurina (p. ej. azoxistrobina, metominoestrobina, orisaestrobina, xiwojunan); fungicidas metoxiiminoacetato estrobilurina (p. ej. kreosim-metilo, trifloxistrobina); fungicidas aromáticos (p. ej. bifenilo, clorodinitronaftalenos, cloroneb, clorotalonilo, cresol, diclorán, fenjuntong, hexaclorobenceno, pentaclorofenol, quintoceno, pentaclorofenóxido de sodio, tecnazeno); fungicidas de arsénico (p. ej. asomato, urbacida); fungicidas aril fenil cetonas (p. ej. metrafenona, yriofenona); fungicidas benzimidazoles (p. ej. albendazol, benomilo, carbendazima, clorfenazol, cipendazol, debacarb, fuberidazol, mecarbinzida, rabenzazol,

eucariota con una pared celular que contiene quitina, o cualquier organismo clasificado como perteneciente al reino taxonómico Fungi. Más específicamente un hongo puede ser un miembro de los filos taxonómicos Ascomycota (es decir, la clase taxonómica Neoelectromycetes, Pneumocystidomycetes, Schizosaccharomycetes, Taphrinomycetes, Arthoniomycetes, Dothideomycetes, Geoglossomycetes, Eurotiomycetes, Laboulbeniomycetes, Lecanoromycetes, Leotiomyces, Lichinomycetes, Orbiliomycetes, Pezizomycetes, Sordariomycetes, Saccharomycetes); Basidiomycota (es decir de la clase taxonómica Agaricomycetes, Dacrymycetes, Tremellomycetes, Agaricostilbomycetes, Attractiellomycetes, Classiculomycetes, Cryptomycocolacomycetes, Cystobasidiomycetes, Microbotryomycetes, Mixiomycetes, Pucciniomycetes, Ustilaginomycetes, o Exobasidiomycetes); Chytridiomycota (es decir de la clase taxonómica Chytridiomycetes o Monoblepharidomycetes); Glomeromycota (es decir de la clase taxonómica Glomeromycetes); Zygomycota (es decir de la clase taxonómica Trichomycetes o Zygomycetes); Microsporidia (es decir de la clase taxonómica Aquasporidia, Marinosporidia o Terresporidia); Blastocladiomycota (es decir de la clase taxonómica Blastocladiomycetes); y Neocallimastigomycota (es decir de la clase taxonómica Neocallimastigomycetes). El término "hongo" se extiende a las esporas que pueden producir ciertas especies de hongos, por ejemplo, el "hongo" puede ser una esporangiospora, una zigospora, una acospora, una basidiospora, una aeciospora, una urediospora, una teliospora, una conidiospora, o una mitospora.

Un hongo puede ser una especie unicelular o una especie que puede existir en forma unicelular en algún momento de su ciclo de vida. Por lo tanto, un hongo puede ser una levadura. Un hongo puede ser una especie que existe como parte de una hifa o micelio multicelular o una especie que puede existir como parte de una hifa o micelio multicelular en algún momento de su ciclo de vida. Las hifas o micelios multicelulares pueden ser microscópicos o macroscópicos. Por lo tanto, un hongo puede ser un moho o una seta. Cabe destacar los hongos que son dimórficos, es decir, pueden existir en forma unicelular (levadura) en ciertas condiciones (por ejemplo, con ciertos niveles de nutrientes, dióxido de carbono, oxígeno, pH, temperatura, etc.) y pueden existir como parte de hifas multicelulares o micelio en ciertas otras condiciones o en diferentes niveles de las condiciones mencionadas anteriormente. Es común que un hongo que es un patógeno animal exista en el medio ambiente como parte de una hifa o micelio multicelular, pero en forma unicelular en el animal. Por el contrario, es común que un hongo que es un patógeno vegetal exista en el medio ambiente en forma unicelular, pero como parte de una hifa o micelio multicelular en la planta.

Un hongo puede ser un patógeno animal y/o vegetal, un parásito animal y/o vegetal, o estar involucrado en el deterioro o descomposición de materiales orgánicos (por ejemplo, alimentos y productos a base de celulosa). Un hongo puede ser un patógeno oportunista, ya que generalmente es benigno para sujetos sanos con un sistema inmunitario no comprometido, pero dicho hongo puede establecer una infección en sujetos cuyo sistema inmunitario está comprometido de alguna manera. Un hongo también puede ser un hongo que produce una micotoxina que afecta a los animales, normalmente envenenándolos o induciendo reacciones alérgicas.

A modo de ejemplo, un hongo puede ser el agente causante de una aspergilosis (es decir, hongos del género taxonómico *Aspergillus*, p. ej. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*); una candidiasis (es decir, hongos del género taxonómico *Candida*, p. ej. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*); una coccidioidomicosis (p. ej. *Coccidioides immitis*, *Coccidioides posadasii*) una criptococcosis (p. ej. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*); una histoplasmosis (p. ej. *Histoplasma capsulatum*, *Histoplasma duboisii*); una blastomicosis (p. ej. *Blastomyces dermatitidis*); un micetoma (p. ej. *Actinomyces pelletieri*, *Acremonium strictum*, *Actinomyces madurae*, *Aspergillus nidulans*, *Noetastroma rosatii*, *Phaeoacremonium kraidenii*, *Pseudallescheria boydii*, *Curvularia lunata*, *Exophiala jeanseimeii*, *Leptosphaeria senegalensis*, *Leptosphaeria tompkinsii*, *Madurella grisea*, *Madurella mycetomatis*, *Pyrenochaeta romeroi*); una paracoccidioidomicosis (p. ej. *Paracoccidioides brasiliensis*); una neumocistosis (p. ej. *Pneumocystis jirovecii*); una fusariosis (p. ej. el Complejo *Fusarium solani*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*, una feohifomicosis (p. ej. hongos del género *Alternaria*, *Exophiala jeanseimeii*); una alternariosis (es decir, hongos del género *Alternaria*, p. ej. *Alternaria alternata*); una rinosporidiosis (p. ej. *Rhinosporidium seeberii*) una microsporidiosis (p. ej. *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*) una basidiobolomicosis (p. ej. *Basidiobolus ranarumy* es decir, hongos de los géneros *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton*, p. ej. *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium audouinii*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton interdigitale/mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Trichophyton canis*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton schoenleinii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton concentricum*); una piedra (p. ej. *Hortaea werneckii*, *Piedraia hortae*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon spp.*, *Trichosporon beigeli*); una foliculitis por *Pityrosporum* / foliculitis por *Malassezia* (es decir, hongos de los géneros *Malassezia*, p. ej. *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*). Otras especies de hongos capaces de actuar como un patógeno animal incluyen, *Malassezia pachydermatis*, *Scedosporium prolificans*, *Acremonium kiliense*, y *Paecilomyces lilacinus*.

- Preferentemente un hongo es una especie del género taxonómico *Candida*, p. ej. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida rugosa*, en particular *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida lusitanae*, y lo más particularmente *Candida albicans*.
- 5 Preferentemente un hongo es una especie del género taxonómico *Aspergillus*, p. ej. *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus* y *Aspergillus terreus*, en particular *Aspergillus flavus*.
- 10 Preferentemente un hongo es una especie del género taxonómico *Cryptococcus*, p. ej. *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, en particular *Cryptococcus neoformans*.
- 15 Preferentemente un hongo es una especie de los géneros taxonómicos *Malassezia* (p. ej. *Malassezia pachydermatis* o *Malassezia furfur*), *Trichosporon* (p. ej. *Trichosporon cutaneum*), *Fusarium* (p. ej. el complejo *Fusarium solani*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*), *Acremonium* (p. ej. *Acremonium kiliense*, *Acremonium strictum*), *Paecilomyces* (p. ej. *Paecilomyces lilacinus*), *Rhizopus* (p. ej. *Rhizopus oryzae*), *Mucor* (p. ej. *Mucor indicus*), *Scedosporium* (p. ej. *Scedosporium prolificans*) y *Absidia* (p. ej. *Absidia corymbifera*).
- 20 A modo de ejemplo adicional, un hongo puede ser el agente causante de los cancros/antracnosis (p. ej., el cancro de la manzana, *Nectria galligena*; el cancro del nogal blanco, *Sirococcus clavignenti-juglandacearum*; el cancro del ciprés, *Seiridium cardinale*; la antracnosis del cerezo silvestre, *Discula destructiva*; el cancro de la falsa acacia, *Thyronectria austro-americana*; el cancro de la morera, *Gibberella baccata*; el cancro del roble, *Diplodia quercina*; el cancro resinoso del pino, *Fusarium pini*; la antracnosis del plátano occidental, *Apiognomonina veneta*; el cancro del tallo de la colza, *Leptosphaeria maculans*; el cancro de la rosa, *Leptosphaeria coniothyrium* y *Cryptosporella umbrina*; el cancro de Scleroderris, *Gremmeniella abietina*; la antracnosis del sauce, *Marssonina saicicocia*), la podredumbre parda de las frutas de hueso (p. ej. *Monilinia fructicola*); la excoriosis de la vid (p. ej. *Phomopsis viticola*); kole-roga (p. ej. *Phytophthora palmivora*); la podredumbre de Botrytis (p. ej. *Botrytis cinerea*); el moho negro (p. ej. *Aspergillus niger*) y la podredumbre amarga (p. ej. *Glomerella cingulata*); la pudrición / pudrición blanda por *Cladosporium* (p. ej. *Cladosporium cladosporioides*) y podredumbre del grano / fusariosis del maíz (p. ej. *Fusarium sporotrichioides*); la podredumbre amarga (p. ej. *Geotrichum candidum*); mancha foliar de la fresa (*Pestalotia iongisetua*); roya (p. ej. hongos de las familias Chaetomiaceae, Coleosporiaceae, Cronartiaceae, Melampsoraceae, Mikronegeriaceae, Phakopsoraceae, Phragmidaceae, Pileolariaceae, Pucciniaceae, Pucciniosiraceae, Pucciniastraceae, Raveneliaceae, Sphaerophragmiaceae, Uropyxidaceae, en particular, *Gymnosporangium juniperivirginianae*, *Cronartium ribicola*, *Hemileia vastatrix*, *Puccinia graminis*, *Puccinia coronata*, *Phakopsora meibomia*, *Phakopsora pachyrhizi*, *Uromyces phaseoli*, *Puccinia hemerocallidis*, *Puccinia persistens* subsp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Puccinia graminis*, *Uromyces appendiculatus*) y la sarna del manzano (p. ej. *Venturia inaequalis*); la sarna negra (p. ej. *Synchytrium endobioticum*); la fusariosis de la espiga (p. ej. hongos del género *Fusarium*, en particular *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium nivale*); la mancha negra de la pera, (p. ej. *Venturia pirina*, *Fusicladium pyrorum*); la costra de la flor de pascua (p. ej. *Sphaceloma poinsettiae*); el oídio (p. ej. hongos de la familia Erysiphaceae, en particular *Erysiphe necator*, *Blumeria graminis*, *Leveillula taurica*, *Podosphaera leucotricha*, *Podosphaera fusca*, *Microsphaera syringae*, *Podosphaera aphanis*, *Sawadea tulasnei*); la Sigatoka negra (p. ej. *Mycosphaerella fijiensis*); la Sigatoka amarilla (p. ej. *Mycosphaerella musicola*), el tizón de la caña de azúcar (p. ej. *Sporisorium scitamineum*); el tizón del maíz (p. ej. *Ustilago maydis*); el carbón desnudo de la cebada (p. ej. *Ustilago nuda*); el carbón desnudo del trigo (p. ej. *Ustilago tritici*); el carbón cubierto de la cebada (p. ej. *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago hordei*); la enfermedad TCK (p. ej. *Tilletia controversa*); el falso carbón del arroz (p. ej. *Ustilagoideae virens*); el carbón desnudo de la avena (p. ej. *Ustilago avenae*); la mancha foliar en forma de ojo de rana (p. ej. *Botryosphaeria obtusa*); el añublo de la vaina (p. ej. *Rhizoctonia solani*); o la explosión de arroz (p. ej. *Pyricularia grisea* o *Magnaporthe grisea*).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50 Muchos patógenos de plantas se encuentran en los géneros *Fusarium*, *Ustilago*, *Alternaria*, y *Cochliobolus*. Los ejemplos de especies de plantas patógenas dentro de esos géneros incluyen, pero sin limitación *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium poae*, *Fusarium nivale*, *Ustilago maydis*, *Ustilago nuda*, *Ustilago tritici*, *Ustilago hordei*, *Ustilagoideae virens*, *Ustilago avenae*, *Alternaria alternate*, *Alternaria arborescens*, *Alternaria arbusti*, *Alternaria blumeae*, *Alternaria brassica*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria brunsi*, *Alternaria carotiincultae*, *Alternaria conjuncta*, *Alternaria euphorbiicola*, *Alternaria gaisen*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria japonica*, *Alternaria panax*, *Alternaria petroselinii*, *Alternaria radicina*, *Alternaria raphani*, *Alternaria saponariae*, *Alternaria selini*, *Alternaria solani*, *Alternaria smyrnii*, *Cochliobolus carbonum*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus lunatus* y *Cochliobolus stenospilus*.
- 55
- 60 A modo de ejemplo adicional, un hongo puede ser un hongo de descomposición de la madera (p. ej. *Serpula lacrymans*, *Meruliporia incrassata* (desecamiento de la raíz), *Fibroporia vaillantii* (hongo de mina), y *Coniophora puteana* (hongo de bodega), *Phellinus contiguus*, una podredumbre por *Penicillium* (p. ej. *Penicillium chrysogenum*), moho negro del pan (*Rhizopus stolonifer*) o podredumbre blanda/moho azul (p. ej. *Penicillium expansum*).
- 65 Los hongos productores de mictoxina incluyen aquellos que producen una aflatoxina (p. ej. especies de *Aspergillus*, en particular, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*), una ocratoxina (p. ej. especies de *Aspergillus* y *Penicillium*,

en particular, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus carbonarius* y *Penicillium viridicatum*), una citrinina (p. ej. especies de *Aspergillus*, *Monascus* y *Penicillium* species, en particular, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium camemberti*), un alcaloide del cornezuelo del centeno (p. ej. especies de *Claviceps*, en particular, *Claviceps africana*, *Claviceps fusiformis*, *Claviceps paspali*, *Claviceps purpurea*), una patulina (p. ej. especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, en particular, *Penicillium expansum*), un tricoteceno (p. ej. *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, y *Stachybotrys* species), o una toxina de *Fusarium*, que incluye fumonisinas, tricotecenos, zearalenona, beauvercina y eniatinas, butenolida, equisetina, y fusarin-espatulina (p. ej. especies de *Fusarium*).

"Mejorar la eficacia del agente antifúngico" incluye cualquier aspecto de mejorar o reforzar el efecto antifúngico del agente antifúngico, por ejemplo, de modo que el efecto antifúngico del agente antifúngico se incrementa o refuerza de cualquier manera respecto al efecto antifúngico del agente antifúngico visto en ausencia del oligómero de alginato. Esto puede verse, por ejemplo, en un efecto más fuerte del agente antifúngico en la inhibición del crecimiento y/o la viabilidad de los hongos, un requisito de menos agente antifúngico para lograr el mismo efecto observado en ausencia de oligómero de alginato, o una mayor eficacia observada como una mayor velocidad o tasa de acción, un efecto inhibitorio observado en menos tiempo que en ausencia de oligómero.

Por consiguiente en determinadas realizaciones de los diversos aspectos anteriores de la invención, la cantidad de agente antifúngico (por ejemplo, usado) es menor que la cantidad en ausencia del oligómero de alginato. Por lo tanto, para lograr el mismo (o un efecto antifúngico equivalente o comparable, etc.) se usa o se requiere menos agente antifúngico. Una ventaja de la presente invención es, por lo tanto, que la dosis del agente antifúngico puede reducirse en comparación con la dosis utilizada en ausencia del oligómero de alginato.

Las referencias a "mejorar la eficacia de un agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de un hongo", etc., pueden por consiguiente incluir que el oligómero de alginato de como resultado un agente antifúngico, al menos dos, o al menos cuatro veces, al menos ocho veces, al menos dieciséis veces o al menos treinta y dos veces más eficaz en inhibir el crecimiento fúngico (por ejemplo, actuando como un agente fungistático). Dicho de otra manera, el oligómero puede al menos duplicar, al menos cuadruplicar, al menos octuplicar, al menos aumentar dieciséis veces o al menos treinta y dos veces la eficacia del agente antifúngico para inhibir el crecimiento de los hongos. El efecto inhibitorio del agente antifúngico contra un hongo en particular se puede medir evaluando la concentración mínima inhibidora (MIC) de ese agente antifúngico para ese hongo (Jorgensen et al., *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1999; 1526-43), es decir, esa concentración de agente antifúngico que inhibe completamente el crecimiento de ese hongo. Una reducción a la mitad de la MIC corresponde a una duplicación del efecto inhibitorio del agente antifúngico. Una reducción a la cuarta parte de la MIC corresponde a una cuadruplicación del efecto inhibitorio. Como se puede ver en los ejemplos, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos tienen un efecto combinatorio, por ejemplo, sinérgico, que hace que los hongos sean más susceptibles a ese agente antifúngico. En una realización, el oligómero de alginato reducirá considerablemente el valor MIC del agente antifúngico para el hongo, por ejemplo, el valor MIC será al menos el 50 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 2 % o 1 % del valor MIC del agente antifúngico para el hongo antes del tratamiento de acuerdo con la invención.

Esta invención también permite reducir la concentración del agente antifúngico administrado a un sujeto o aplicado a un sitio o localización manteniendo la misma eficacia. Esto puede ser beneficioso si el agente antifúngico es costoso o está asociado con efectos secundarios (tal como suele ser el caso con los fármacos antifúngicos). También es deseable minimizar el uso de agentes antifúngicos para minimizar el desarrollo de resistencia. De acuerdo con la invención, el uso de un oligómero de alginato como se ha descrito anteriormente, por ejemplo al mismo tiempo o antes de administrar el agente antifúngico permite usar el agente antifúngico a una concentración que es menos del 50 %, menos del 25 %, menos del 10 % o menos del 5% de la cantidad normalmente administrada/aplicada para lograr un nivel particular de inhibición del crecimiento de hongos en ausencia del oligómero de alginato.

Por lo tanto, el uso de oligómeros de alginato de acuerdo con la presente invención puede potenciar el efecto de un agente antifúngico (o aumentar o mejorar su eficacia) y, por lo tanto, puede permitir que un agente antifúngico ya conocido como eficaz contra un hongo particular se use a una dosis reducida. También puede hacer que se pueda usar (o que sea eficaz) un agente antifúngico que anteriormente se pensaba que no era utilizable/eficaz contra un hongo en particular, o un agente antifúngico que normalmente no es efectivo contra un hongo determinado. Dicho de otra manera, puede superar la resistencia de un hongo a un agente antifúngico.

A este respecto, se puede considerar que la divulgación del presente documento proporciona lo siguiente:

Un método para superar la resistencia a al menos un agente antifúngico en un hongo, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho hongo con (particularmente con una cantidad eficaz de) un oligómero de alginato junto con (particularmente con una cantidad eficaz de) el agente antifúngico. Este método puede ser un método *in vitro* o *ex vivo*.

Un oligómero de alginato para usar junto con al menos un agente antifúngico en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo que es resistente a dicho agente antifúngico para superar la resistencia al agente antifúngico en dicho hongo.

Uso de un oligómero de alginato para la fabricación de un medicamento para usar junto con al menos un agente antifúngico en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo que es resistente a dicho agente antifúngico para superar la resistencia al agente antifúngico en dicho hongo.

Un producto que contiene un oligómero de alginato y un agente antifúngico como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo que es resistente a dicho agente antifúngico para superar la resistencia al agente antifúngico en dicho hongo.

Un método para combatir la colonización de un sitio con un hongo que es resistente a un agente antifúngico, comprendiendo dicho método poner en contacto dicho sitio y/o dicho hongo con (particularmente con una cantidad eficaz de) un oligómero de alginato junto con (particularmente con una cantidad eficaz de) el agente antifúngico al que dicho hongo es resistente. Tal método puede ser particularmente un método *in vitro* o *ex vivo*.

Un método para combatir un hongo que es resistente a un agente antifúngico (que incluye una población de hongos, así como un individuo u hongo individual o célula fúngica), comprendiendo dicho método poner en contacto dicho hongo o un sitio en el cual dicho hongo está o puede estar localizado (particularmente con una cantidad eficaz de) un oligómero de alginato junto con (particularmente con una cantidad eficaz de) el agente antifúngico al que dicho hongo es resistente. Dicho método puede ser particularmente un método *in vitro*.

En estos métodos puede haber una etapa en la cual se determina (por ejemplo, se verifica o se identifica) que el hongo es resistente a un agente o agentes antifúngicos en particular. En una etapa en lugar de, o además de, la etapa previamente descrita, puede haber una etapa en la cual se determina que el hongo es un hongo que ya se sabe que es resistente a un agente antifúngico. Aquí puede usarse cualquier prueba adecuada, por ejemplo, las descritas a continuación, o cualquier técnica para identificar hongos conocidos y caracterizados (por ejemplo, hongos ya identificados como resistentes a un agente antifúngico). En una etapa adicional se puede verificar si se adquiere o no una resistencia particular o si es intrínseca, por ejemplo, por comparación con hongos típicos o de tipo silvestre de la misma especie.

Por "crecimiento de un hongo" se entiende tanto un aumento en el tamaño de un hongo como en la cantidad y/o volumen de los constituyentes de un hongo (por ejemplo, la cantidad de ácido nucleico, la cantidad de proteínas, el número de núcleos, el número o tamaño de orgánulos, el volumen del citoplasma) y un aumento en el número de hongos, es decir, un aumento en la replicación del hongo.

Normalmente el crecimiento de un hongo se acompaña del aumento de tamaño del organismo. El crecimiento de los hongos se puede medir con técnicas de rutina. Por ejemplo, se puede usar el examen microscópico de la morfología celular a lo largo del tiempo, o ensayos para medir cambios en las cantidades de proteína o ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en general, o los cambios en las cantidades de proteínas específicas o ácidos nucleicos. El experto podría fácilmente seleccionar marcadores adecuados para seguir. Convenientemente, se pueden controlar los denominados genes constitutivos (p. ej. α -actina, GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), SDHA (succinato deshidrogenasa), HPRT1 (hipoxantina fosforibosil transferasa 1), HBS1L (proteína similar a HBS1), AHSP (proteína estabilizadora de alfa-hemoglobina), y β 2M (beta-2-microglobulina)) y ARN 16S.

Por "replicación de un hongo" se entiende el acto por el cual el hongo se reproduce. Normalmente esto es por fisión binaria donde una célula se divide en dos. Para facilitar la división de la célula en dos, la fisión binaria normalmente está precedida por el agrandamiento de la célula en división y un aumento en la cantidad y/o volumen de los constituyentes celulares. La replicación da como resultado un aumento en el número de células y, por lo tanto, puede ser seguido por cualquier método para evaluar el número de células en una población. Otra opción es seguir el proceso en tiempo real mediante un examen visual con un microscopio. El tiempo que tarda la célula en replicarse (es decir, producir otra versión de sí mismo) es el tiempo de generación. El tiempo de generación dependerá de las condiciones en las cuales se encuentre el hongo. La tasa de replicación puede expresarse en términos del tiempo de generación.

Por "inhibición del crecimiento de un hongo" se entiende que se reduce el crecimiento medible (por ejemplo, la replicación) de un hongo, o la tasa del mismo. el crecimiento medible (por ejemplo, la replicación) de un hongo, o la tasa del mismo, se reduce en al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, por ejemplo, al menos un 95 %. Preferentemente, se detiene el crecimiento medible (por ejemplo, la replicación). El crecimiento en términos de aumento o expansión etc. del tamaño celular puede inhibirse independientemente de la replicación y viceversa.

La expresión "viabilidad de un hongo" significa la capacidad de un hongo para sobrevivir en determinadas condiciones. La supervivencia puede considerarse equivalente a permanecer vivo. Se puede determinar la viabilidad de un hongo utilizando las técnicas detalladas a continuación para medir la muerte celular (y la viabilidad) de los microorganismos.

Por lo tanto, "inhibir la viabilidad" de un hongo puede incluir cualquier efecto que reduzca la viabilidad de un hongo, o que lo haga menos propenso a sobrevivir o que no sea viable. En particular, esta expresión abarca matar o destruir

un hongo.

La expresión "matar un hongo" se refiere al acto de causar que un hongo deje de estar vivo, es decir, que muera. Se considera que un hongo está vivo si se le puede inducir a replicarse y/o crecer, o al menos mostrar cambios morfológicos, cuando se coloca en un medio que normalmente facilitaría el crecimiento de ese hongo y/o el hongo está metabolizando nutrientes para liberar energía para apoyar las funciones celulares. Normalmente, un hongo puede considerarse muerto si pierde la integridad de la membrana celular.

Muchos ensayos de rutina están disponibles para determinar si un hongo está vivo (viable) o muerto. Una opción es colocar el hongo en condiciones que normalmente facilitarían el crecimiento de ese hongo y controlar el crecimiento del hongo por los medios convencionales apropiados, por ejemplo, controlando el tamaño del hongo, la morfología del hongo, el número de hongos en la colonia a lo largo del tiempo, el consumo de nutrientes en los medios de cultivo, etc.

Otra opción es evaluar las células fúngicas para determinar las morfologías características de la muerte celular, por ejemplo, cuerpos necróticos o apoptóticos, ampollas de membrana, condensación nuclear y escisión de ADN en fragmentos de tamaño regular, paredes o membranas celulares rotas y fugas del contenido celular al entorno extracelular.

Otros métodos explotan la pérdida característica de integridad de la membrana celular en células fúngicas muertas. Los colorantes impermeables a la membrana (por ejemplo, azul de tripano y yoduro de propidio) se usan rutinariamente para evaluar la integridad de la membrana. Estos colorantes se excluyen de las células fúngicas intactas, por lo que no se produce tinción en dichos hongos. Si la integridad de la membrana celular se ve comprometida, estos colorantes pueden acceder a las células fúngicas y teñir los componentes intracelulares. Como alternativa, o además, se usan colorantes que solo tiñen las células fúngicas con membranas intactas para tener una indicación de la viabilidad de la célula. El ensayo Live/Dead de Invitrogen Ltd es un ensayo que utiliza dos colorantes, uno para teñir las células muertas, y el otro para teñir las células vivas. Otro enfoque para evaluar la integridad de la membrana es detectar la liberación de componentes celulares en los medios de cultivo, p. ej. lactato deshidrogenasa.

Otra opción adicional es medir el metabolismo de las células fúngicas. Esto se puede hacer de manera rutinaria de varias maneras. Por ejemplo, se pueden medir los niveles de ATP. Solo las células vivas con membranas intactas pueden sintetizar ATP y debido a que el ATP no se almacena en las células, los niveles de ATP disminuyen rápidamente con la muerte celular. Por lo tanto, el control de los niveles de ATP da una indicación del estado de la célula fúngica. Una opción adicional más es medir el potencial reductor de la célula fúngica. Las células fúngicas viables que metabolizan nutrientes utilizan reacciones reductoras, al administrar un marcador que proporciona diferentes resultados, ya sea en forma reducida u oxidada (por ejemplo, un colorante fluorescente) a la célula fúngica, se puede evaluar el potencial reductor de la célula fúngica. Las células fúngicas que carecen de la capacidad de reducir el marcador pueden considerarse muertas. Los ensayos MTT y MTS son ejemplos convenientes de este tipo de ensayo.

Por "resistente a un agente antifúngico" se entiende que el hongo muestra una tolerancia sustancialmente mayor (susceptibilidad reducida) a un agente antifúngico en comparación con un hongo de referencia sensible al agente antifúngico o una versión típica o de tipo silvestre del hongo. Tal tolerancia sustancialmente mayor puede ser una disminución estadísticamente significativa en la susceptibilidad al agente antifúngico, medido, por ejemplo, en ensayos estándar, tal como en ensayos de la MIC. En algunos casos, un hongo puede no verse afectado por la exposición a un agente antifúngico. En este caso, el hongo puede considerarse completamente resistente a ese agente antifúngico.

Un hongo de referencia adecuado es *Saccharomyces cerevisiae* aunque en la técnica existen disponibles otros muchos otros. Versiones típicas, o de tipo silvestre, de un hongo se pueden obtener fácilmente de laboratorios y colecciones de cultivos en todo el mundo.

La susceptibilidad (y al contrario resistencia y tolerancia) a un agente antifúngico se puede medir de cualquier manera conveniente, por ejemplo, con pruebas de susceptibilidad de dilución y/o pruebas de difusión de disco. El experto apreciaría que la extensión de la diferencia en tolerancia/susceptibilidad suficiente para constituir resistencia variará dependiendo del agente antifúngico y el organismo a prueba y la prueba utilizada. Sin embargo, un hongo resistente será preferentemente al menos dos veces, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 10, 20 o 50 veces más tolerante al agente antifúngico que el hongo de referencia sensible al agente antifúngico o una versión típica o de tipo silvestre del hongo. Preferentemente, la resistencia de un hongo particular a un agente antifúngico se determina usando hongos que no están en una biopelícula o que no tienen un fenotipo de biopelícula.

El ensayo de la concentración mínima inhibidora (MIC) es una prueba de susceptibilidad de dilución conveniente para usar. Este ensayo mide la tolerancia relevante de un hongo a los agentes antifúngicos mediante la determinación de la concentración más baja de agente antifúngico que causa la inhibición completa del crecimiento. Un hongo resistente a un agente antifúngico tendrá un valor de MIC sustancialmente mayor para el agente antifúngico que el del hongo de referencia sensible al agente antifúngico o una versión típica, o de tipo silvestre, del hongo, por ejemplo, el hongo resistente tendrá un valor MIC para el agente antifúngico que es al menos dos veces o al menos cuatro veces, al

menos ocho veces, al menos dieciséis veces, al menos treinta y dos veces o al menos sesenta y cuatro veces mayor. Dicho de otra manera, el valor MIC del hongo resistente para el agente antifúngico será al menos el doble, al menos el cuádruple, al menos el óctuple, al menos dieciséis o al menos treinta y dos veces el valor MIC del hongo de referencia sensible al agente antifúngico o una versión típica o de tipo silvestre del hongo.

5 Visto como alternativa y en el contexto de un uso *in vivo* (por ejemplo, el tratamiento de una infección fúngica) en donde el hongo es resistente a un agente antifúngico, un hongo puede considerarse resistente a un agente antifúngico si el hongo tiene un valor MIC para el agente antifúngico que es mayor que la concentración circulante segura máxima del agente antifúngico en el sujeto (que puede ser determinado fácilmente por el experto). Más funcionalmente, se
10 puede considerar que un hongo es resistente a un agente antifúngico si una infección asociada con ese hongo no responde (es decir, no hay cambio en los indicios clínicos de la infección) a la dosis máxima segura del agente antifúngico.

15 El hongo objetivo de los métodos o usos de la invención puede ser resistente a más de un agente antifúngico, o más particularmente, puede ser resistente a más de una clase de agente antifúngico, por ejemplo, el hongo puede ser resistente a al menos 2 o 3, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 agentes antifúngicos o clases de los mismos. Aquellos hongos que son resistentes a más de 3 clases de agentes antifúngicos son "resistentes a múltiples fármacos (MDR)" o "tienen un fenotipo MDR".

20 La "superación de la resistencia" debe interpretarse en consecuencia como una reducción medible en los indicadores de resistencia descritos anteriormente (o un aumento medible en la susceptibilidad o una disminución medible en la tolerancia) al agente antifúngico exhibida por el hongo. Por lo tanto, "superar la resistencia" puede expresarse de forma alternativa como "reducir la resistencia". Es una referencia al fenotipo observado del hongo objetivo y no debe considerarse necesariamente que equivale a una reversión, en cualquier medida, al nivel mecanicista de cualquier
25 mecanismo de resistencia particular. Los efectos de los oligómeros de alginato en la superación de la resistencia a uno o varios agentes antifúngicos o en la potenciación (etc.) de los agentes antifúngicos pueden verse independientemente del mecanismo de resistencia al agente antifúngico en cuestión.

30 En una realización, el oligómero de alginato reducirá considerablemente el valor MIC del hongo resistente para el agente antifúngico, por ejemplo, el valor MIC será al menos el 50 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 2 % o 1 % del valor MIC para el agente antifúngico antes del tratamiento de acuerdo con la invención. En otros ejemplos, el oligómero de alginato supera la resistencia a al menos dos, por ejemplo, al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o a todos los agentes antifúngicos estructuralmente y/o funcionalmente diferentes o clases de agentes antifúngicos, a los que el hongo es resistente. Sin embargo, no se requiere, ni está implícito, que se supere toda la resistencia de una cepa resistente
35 dada. El oligómero de alginato puede, por ejemplo, ser eficaz para superar la resistencia a ciertos agentes antifúngicos o clases de los mismos en una cepa resistente dada (por ejemplo, a polienos y/o alilaminas y/o azoles y/o equinocandinas) y esto puede ser útil, aunque puede seguir existiendo resistencia a otros agentes antifúngicos. Este ejemplo implicará preferentemente el uso de una pluralidad de agentes antifúngicos correspondientes en número e identidad a algunas o todas las resistencias antifúngicas superadas.

40 En otros ejemplos, el método de la invención supera la resistencia en un hongo a al menos un agente antifúngico que es un tratamiento convencional de ese hongo. Dicho de otra manera, el oligómero de alginato puede superar la resistencia de un hongo a un agente antifúngico al que ese hongo ha adquirido o desarrollado resistencia. En estos ejemplos, el oligómero de alginato supera al menos una resistencia adquirida en un hongo que ha adquirido resistencia
45 a al menos uno, por ejemplo al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 agentes antifúngicos estructural y/o funcionalmente diferentes o clases de los mismos. Preferentemente, se supera toda la resistencia adquirida del hongo al agente antifúngico. Será claro para el lector experto que la presente divulgación por lo tanto hace posible el tratamiento de un hongo con un agente antifúngico que se había vuelto ineficaz en el tratamiento de ese hongo. Sin embargo, como se ha señalado anteriormente, no se puede adquirir toda la resistencia en un fenotipo resistente y la divulgación no se limita a esto. Por lo tanto, la presente divulgación puede usarse en el tratamiento de hongos que son resistentes de
50 forma innata a un agente antifúngico.

La localización del hongo objetivo en cualquier aspecto de la presente invención no está restringida y, por lo tanto, como se indicó anteriormente, no solo están cubiertos los usos terapéuticos, sino también los usos no terapéuticos o
55 no clínicos donde el hongo o el sitio o localización en riesgo de infección o contaminación no está presente en o dentro del cuerpo de un animal humano o no humano (por ejemplo, un sujeto clínico/paciente), pero puede estar presente, por ejemplo, en un sitio o localización abiótico (por ejemplo, inanimado) o un sitio o localización biótico no clínico (por ejemplo, en una planta o una parte de la misma) es decir la invención se puede llevar a cabo *in vitro* (término que se considera que incluye el uso en relación con los materiales bióticos *ex vivo*). Por lo tanto, los métodos de la invención
60 tal como se exponen anteriormente no se practican ni se llevan a cabo en ciertas realizaciones en o sobre el cuerpo humano o animal (por ejemplo, en donde la etapa de usar el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico no se produce en o sobre el cuerpo humano o animal). En el contexto de esta invención, cualquier método que no sea un método practicado sobre o en el cuerpo humano o un animal (por ejemplo, mediante terapia o cirugía) puede ser visto como un método *in vitro*. Por el contrario, los métodos *in vivo* son métodos llevados a cabo sobre o en el cuerpo
65 humano o animal no humano, los cuales incluyen el tratamiento de materiales inanimados contenidos (por ejemplo, implantados en) el cuerpo de un animal humano o no humano. Para disipar cualquier duda, los métodos de la invención

que implican el tratamiento de plantas, partes de las mismas (incluidas semillas, frutas y flores), productos vegetales y otras superficies/materiales bióticos que no están sobre o en un cuerpo humano o animal vivo en el punto de tratamiento son métodos *in vitro*.

5 El hongo puede estar presente sobre una superficie. La superficie no está limitada e incluye cualquier superficie en la que pueda existir un hongo. La superficie puede ser biótica o abiótica, y las superficies inanimadas (o abióticas) incluyen cualquier superficie que pueda estar expuesta a contacto fúngico o colonización (por ejemplo, contaminación). Por lo tanto, se incluyen particularmente superficies en equipos médicos o maquinaria, por ejemplo, maquinaria industrial, o cualquier superficie expuesta a un ambiente acuático (por ejemplo, equipo marino, o barcos o embarcaciones o sus partes o componentes), o cualquier superficie expuesta a cualquier parte del medio ambiente, por ejemplo tuberías o en edificios. Dichas superficies inanimadas expuestas al contacto o colonización microbiana incluyen en particular cualquier parte de: maquinaria o equipo de procesamiento, preparación, almacenamiento o dispensación de alimentos o bebidas, aparatos de aire acondicionado, maquinaria industrial, por ejemplo, en plantas de procesamiento químico o biotecnológico, tanques de almacenamiento, equipos médicos o quirúrgicos y equipos de cultivo de células y tejidos. Cualquier aparato o equipo para llevar, transportar o suministrar materiales es susceptible a la contaminación por hongos. Dichas superficies incluirán particularmente tuberías (término que se usa ampliamente en el presente documento para incluir cualquier conducto o línea). Las superficies inanimadas o abióticas representativas incluyen, pero sin limitación, equipos o superficies de procesamiento, almacenamiento, dispensación o preparación de alimentos, tanques, cintas transportadoras, suelos, drenajes, refrigeradores, congeladores, superficies de equipamiento, paredes, válvulas, correas, tuberías, conductos de aire acondicionado, aparatos de refrigeración, líneas de dispensación de alimentos o bebidas, intercambiadores de calor, cascos de botes o cualquier parte de la estructura de un bote que esté expuesta al agua, conductos de agua de las unidades dentales, conductos de perforación de petróleo, lentes de contacto y estuches.

25 Tal como se ha indicado anteriormente, los equipos o dispositivos médicos o quirúrgicos representan una clase particular de superficie sobre la cual puede ocurrir la colonización por hongos. Esto puede incluir cualquier tipo de línea, incluidos los catéteres (por ejemplo, catéteres venosos centrales y urinarios), dispositivos protésicos (por ejemplo, válvulas cardíacas, articulaciones artificiales, dientes falsos, coronas dentales, fundas dentales e implantes de tejidos blandos (por ejemplo, implantes mamarios, de glúteos y labios). Se incluye cualquier tipo de dispositivo médico implantable (o "interno") (por ejemplo, stents, dispositivos intrauterinos, marcapasos, tubos de intubación (por ejemplo, tubos endotraqueales o de traqueotomía), prótesis o dispositivos protésicos, líneas o catéteres). Un dispositivo médico "interno" puede incluir un dispositivo en el que cualquier parte del mismo está contenido dentro del cuerpo, es decir, el dispositivo puede ser total o parcialmente interno.

35 La superficie puede estar hecha de cualquier material. Por ejemplo puede ser de metal, por ejemplo, aluminio, acero, acero inoxidable, cromo, titanio, hierro, aleaciones de los mismos, y similares. La superficie también puede ser de plástico, por ejemplo, poliolefina (p. ej. polietileno, polietileno (peso molecular ultra alto), polipropileno, poliestireno, poli(met)acrilato, acrilonitrilo, butadieno, ABS, acrilonitrilo butadieno, etc.), poliéster (p. ej. tereftalato de polietileno, etc.), y poliamida (p. ej. nylon), combinaciones de los mismos y similares. Otros ejemplos incluyen copolímero de acetal, polifenilsulfona, polisulfona, politermida, policarbonato, polieteretercetona, fluoruro de polivinilideno, poli(metacrilato de metilo) y poli(tetrafluoroetileno). La superficie también puede ser de ladrillo, baldosa, cerámica, porcelana, madera, vinilo, linóleo o moqueta, combinaciones de los mismos y similares. Las superficies también pueden ser alimentos, por ejemplo, ternera, ave de corral, cerdo, hortalizas, frutas, pescado, marisco, combinaciones de los mismos y similares. La presente invención abarca el "tratamiento" de cualquiera de dichas superficies (es decir, la aplicación a cualquiera de dichas superficies de un oligómero de alginato junto con un agente antifúngico) para combatir la infección o colonización por un hongo.

50 En una infección por un hongo, que puede tratarse de acuerdo con la presente invención, el hongo puede ocurrir en o sobre una superficie en un sujeto humano o animal no humano o planta. Asimismo, fuera del contexto del tratamiento médico, los hongos también pueden aparecer en superficies bióticas. Por lo tanto, la invención incluye el tratamiento de superficies bióticas. Una superficie biótica o animada puede incluir cualquier superficie o interfaz en o sobre un cuerpo animal o vegetal o partes del mismo, por ejemplo extremidades, órganos, semillas, flores, frutas, raíces, corteza y hojas. Por consiguiente, puede considerarse como una superficie "fisiológica" o "biológica". Puede ser cualquier superficie interna o externa del cuerpo, incluido cualquier tejido u órgano, que, en el caso de un cuerpo animal, puede incluir tejido hematológico o hematopoyético (por ejemplo, sangre). El tejido muerto o moribundo (por ejemplo, necrótico) o dañado (por ejemplo, inflamado, destruido o roto) es particularmente susceptible a la colonización por hongos, y dicho tejido está englobado por el término "animado" o "biótico". La superficie puede ser una superficie mucosa o no mucosa. Los productos animales y vegetales, p. ej. pieles, cuero, pellejo, lana, madera, algodón, lino, yute, seda, bambú, corcho, etc. también pueden considerarse bióticos. El suelo, especialmente el suelo cultivado, también puede considerarse un material biótico debido a su contenido de material orgánico.

65 En el contexto del cuerpo animal humano o no humano, las superficies bióticas representativas incluyen, pero sin limitación, cualquier superficie en la cavidad oral (p. ej. dientes, encías, grietas gingivales, bolsa periodontal), el tracto reproductivo (por ejemplo, cuello uterino, útero, trompas de Falopio), el peritoneo, oído medio, próstata, tracto urinario, íntima vascular, el ojo (es decir, el tejido ocular, p. ej. la conjuntiva, tejido corneal, conducto lacrimal, glándula lacrimal, párpado), el tracto respiratorio, tejido pulmonar (p. ej., bronquial y alveolar), válvulas cardíacas, el tracto

gastrointestinal, la piel, el cuero cabelludo, las uñas y el interior de las heridas, particularmente las heridas crónicas y las heridas quirúrgicas, las cuales pueden ser heridas tóxicas o internas. Otras superficies incluyen el exterior de los órganos, particularmente aquellos susceptibles de trasplante, por ejemplo, corazón, pulmones, riñón, hígado, válvula cardíaca, páncreas, intestino, tejido corneal, injertos arteriales y venosos y piel.

En el contexto del cuerpo vegetal, que puede ser, por ejemplo, una briofita (p. ej. un musgo, una hepática, un antocero), un helecho, una gimnosperma o una angiosperma (p. ej. una monocotiledónea o una dicotiledónea), las superficies bióticas representativas incluyen, pero sin limitación, cualquier superficie de las raíces, rizomas, frondas, tallos, ramas, hojas, acículas, espinas, semillas, cáscaras de semillas, vainas de semillas, bulbos, conos, frutas, bayas, drupas, folículos, legumbres, cápsulas, granos, esporangios, brotes, vainas, flores, pétalos, carpelos, estambres, estigmas, estilos, anteras, filamentos, cortezas y zarcillos. Preferentemente la planta será una planta de cultivo, especialmente aquellas que son o proporcionan alimentos para animales, por ejemplo, seres humanos, más especialmente cereales (p. ej. avena, cebada, maíz, arroz, trigo, sorgo, mijo, triticale, fonio, alforfón, quinoa), caña de azúcar, plantas oleaginosas (p. ej. colza, soja, palma, girasol, cacahuete, algodón, coco, oliva, ricino), manzana, pera, ciruela, melocotón, nectarina, fresa, frambuesa, grosella negra, grosella roja, grosella blanca, grosella espinosa, arándano, arándano rojo, ciruela verde, kiwi, mango, fruta de la pasión, melón, tomate, patata, zanahoria, plátano, cacao, lima, limón, naranja, pomelo, mandarina, tangerina, satsuma, clementina, piña, té, café, uva, almendra, nuez, anacardo, avellana, lenteja, guisante, judía, repollo, cebolla, lechuga, pimienta, pepino, espárrago, brócoli, coliflor y batata. En otras realizaciones, la planta proporcionará materiales no comestibles. Por ejemplo, la planta será una fuente de productos de madera procesada o madera (p. ej. roble, pino, nogal, haya, abedul, picea, abeto, alcornoque, balsa), algodón, lino, caucho de látex o bambú.

La localización también puede ser una localización que no es una superficie. En otras palabras, el hongo se puede encontrar dentro de un material, así como sobre su superficie. El material puede ser químicamente heterogéneo así como químicamente homogéneo. El material también puede estar construido o formado por o comprender diferentes partes o componentes. El material puede ser parte de un material o entidad más grande. El material puede ser o comprender los materiales a partir de los cuales se forman las superficies mencionadas anteriormente. En algunos casos, el material puede considerarse como un objeto, cuyo término cubre volúmenes de líquidos dondequiera que se encuentren. El material puede comprender cualquiera de las superficies descritas anteriormente. El material puede ser abiótico o biótico (inanimado o animado) como se ha discutido anteriormente en relación con las superficies. Por ejemplo, el material podría ser, completamente o en parte, un sólido, un líquido, un semisólido, un gel o un gel-sol.

Por lo tanto, por ejemplo, el hongo puede estar presente en los fluidos corporales de un animal (p. ej. sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, contenido del tracto GI, semen, esputo y otras secreciones pulmonares); tejidos animales (p. ej. suprarrenal, hepático, renal, pancreático, hipofisario, tiroideo, inmunitario, ovárico, testicular, prostático, endometrial, ocular, mamario, adiposo, epitelial, endotelial, neuronal, muscular, pulmonar, epidérmico, óseo); partes vegetales (p. ej. las raíces, rizomas, frondas, tallos, ramas, hojas, acículas, espinas, semillas, cáscaras de semillas, vainas de semillas, bulbos, conos, frutas, bayas, drupas, folículos, legumbres, cápsulas, granos, esporangios, brotes, vainas, flores, pétalos, carpelos, estambres, estigmas, estilos, anteras, filamentos, corteza, zarcillos, xilema y floema), fluidos del cuerpo de la planta (savia del xilema y sabia del floema); medios de cultivo celular y de tejidos; medios de cultivo vegetal; cultivos de células y de tejidos; cultivos vegetales; materiales de desecho clínicos/científicos (que pueden comprender cualquiera de los materiales anteriores); tierra; abono; productos farmacéuticos (p. ej. comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles, pulverizaciones, composiciones para su uso en nebulizadores, pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles); alimentos para animales o seres humanos (p. ej. carne, pescado, marisco, frutas, hortalizas, cereales, productos lácteos, zumos de frutas, zumos de verduras, salsas, caldos, sopas, dulces, bebidas alcohólicas, condimentos); productos para la higiene personal (p. ej. pasta de dientes, enjuague bucal, champú, jabón, desodorante, gel de ducha); cosméticos (p. ej. brillo de labios, sombra de ojo, base); suministros de agua potable; suministros de aguas residuales; suministros agrícolas y suministros de agua; formulaciones insecticidas, pesticidas y herbicidas; lubricantes industriales; materiales de ingeniería (p. ej. madera, productos de madera procesada, madera no procesada, papel, hormigón, cemento, arena, porcelana, piedra, cerámica, escayola, pintura, barniz, selladores de silicona, lechada, mortero, ladrillos, plástico) etc. Cabe destacar líquidos, semisólidos, geles o geles-soles. Los fluidos y tejidos corporales animales pueden ser tratados *in vitro* o *in vivo* siendo también posible tratar los mismos *in vivo*.

De acuerdo con la invención, el hongo no estará en una biopelícula (por ejemplo, crecerá de forma planctónica o en un micelio o una hifa). Dicho de otra manera, el hongo no estará en un modo de crecimiento de biopelícula; o estará en un modo de crecimiento sin biopelícula. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los métodos de la invención pueden también comprender una etapa en la cual se determinará si los hongos objetivo están, o como alternativa no están, o implican, una biopelícula.

Por "biopelícula" se entiende una comunidad de microorganismos caracterizada por una predominancia de células sésiles que están unidas a un sustrato o interfase o entre sí (también pueden estar presentes algunas células móviles) y que están incrustadas en una matriz de polímeros extracelulares (más específicamente polímeros extracelulares que han producido) caracterizada por que los microorganismos de esta colonia presentan un fenotipo alterado con respecto a la velocidad de crecimiento y la transcripción génica (por ejemplo, comparado con sus homólogos "no biopelículas",

o de libre flotación, planctónicos, miceliales o hifales). Por "en una biopelícula" se entiende que el hongo está dentro (completamente o en parte), sobre o asociada con la matriz de biopolímero de una biopelícula. Visto de forma diferente, los hongos que "no están en una biopelícula" son organismos que están en forma aislada, p. ej. planctónica, o en una agregación de una pluralidad de organismos, esta agregación no está organizada y/o carece de la matriz característica de una biopelícula, por ejemplo, un micelio o una hifa. En cada caso, los hongos individuales no presentan un fenotipo alterado que se observa en sus homólogos que residen dentro de la biopelícula.

Una biopelícula en la cual se puede observar un hongo, puede contener una población homogénea de hongos (es decir, contiene un solo tipo de hongo) o puede contener una población heterogénea (es decir, contiene una pluralidad de tipos de hongos y/u otros microorganismos). Los ejemplos de posibles especies de hongos que pueden estar presentes se han mencionado anteriormente, pero una biopelícula también puede comprender cualquier otro organismo microbiano, es decir, cualquier organismo que sea microscópico, concretamente demasiado pequeño para ser visto a simple vista. En particular como se utiliza en el presente documento el término incluye virus, así como los organismos más usualmente considerados microorganismos, particularmente bacterias, hongos, arqueas, algas y protistas. Por lo tanto, el término incluye particularmente organismos que son normalmente unicelulares, pero que pueden tener la capacidad de organizarse en colonias o estructuras cooperativas simples como filamentos, hifas o micelios (pero no tejidos verdaderos) en ciertas condiciones. El microorganismo puede ser procariota o eucariota, y puede ser de cualquier clase, género o especie de microorganismo. Los ejemplos de microorganismos procariotas incluyen, pero sin limitación, bacterias, incluyendo los micoplasmas, (p. ej. bacterias gram positivas, bacterias gram negativas o bacterias no sensibles a la prueba de Gram) y arqueobacterias. Los microorganismos eucariotas incluyen hongos, algas y otros que se clasifican, o se han clasificado en el reino taxonómico Protista o que son considerados protistas, e incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, protozoos, diatomeas, protófitos y mohos similares a hongos. El microorganismo puede ser aerobio o anaerobio. El microorganismo puede ser patógeno o no patógeno, o que produce putrefacción o un microorganismo indicador. En realizaciones preferidas particulares, el microorganismo es patógeno.

En las realizaciones médicas (por ejemplo, terapéuticas) de la invención, el sujeto puede ser cualquier sujeto animal humano o no humano, pero más particularmente puede ser un vertebrado, p. ej. un animal seleccionado de mamíferos, aves, anfibios, peces y reptiles. El animal puede ser ganado o un animal doméstico o un animal de valor comercial, incluyendo animales de laboratorio o un animal en un zoológico o en un parque recreativo. Los animales representativos por lo tanto incluyen perros, gatos, conejos, ratones, cobayas, hámsteres, caballos, cerdos, ovejas, cabras, vacas, pollos, pavos, pintadas, patos, gansos, loros, periquitos, palomas, salmón, trucha, bacalao, eglefino, lubina y carpa. De este modo están cubiertos los usos veterinarios de la invención. El sujeto puede considerarse como un paciente. Preferentemente el sujeto es un ser humano.

La expresión "en un sujeto" se usa ampliamente en el presente documento para incluir sitios o localizaciones dentro de un sujeto o sobre un sujeto, por ejemplo, una superficie externa del cuerpo, y puede incluir en particular la infección de un dispositivo médico, por ejemplo, un dispositivo médico implantado o "interno". La expresión "en un paciente" debe interpretarse de manera coherente con esto.

La localización de la infección del sujeto no está restringida y puede ser cualquiera de los sitios o localizaciones en un sujeto descrito anteriormente. La administración del oligómero de alginato y el agente antifúngico al sujeto preferentemente da como resultado que la localización infectada se ponga en contacto con un oligómero de alginato y un agente antifúngico en cantidades suficientes para tratar la infección.

La infección del sujeto puede ser aguda o, como alternativa, crónica, por ejemplo, una infección que ha persistido durante al menos 5 o al menos 10 días, particularmente al menos 20 días, más particularmente, al menos 30 días, lo más particularmente, al menos 40 días.

En este aspecto de la invención, la infección puede ocurrir en una superficie en o sobre el sujeto (es decir, una superficie biótica como se describió anteriormente) y/o una superficie de un dispositivo médico, particularmente un dispositivo médico implantable o "interno", ejemplos representativos de los cuales se han descrito anteriormente.

En una realización, los métodos o usos de la invención pueden comprender una etapa en la que se identifica al sujeto (por ejemplo, se ha diagnosticado) como que tiene o se sospecha que tiene una infección fúngica o que es un candidato con riesgo o susceptible a una infección fúngica.

En realizaciones particulares la invención puede proporcionar el tratamiento de micosis, por ejemplo, sinusitis fúngica (que incorpora rinosinusitis fúngica alérgica y sinusitis saprofitica); otomicosis (infección fúngica del oído); queratitis fúngica (infección fúngica del ojo); onicomycosis (infección fúngica de la uña); meningitis fúngica; infecciones fúngicas sistémicas; infecciones fúngicas invasivas; infecciones fúngicas diseminadas; infecciones fúngicas oportunistas; aspergilosis (p. ej. aspergiloma, aspergilosis pulmonar crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica); candidiasis (p. ej. candidiasis oral (aftas bucales), esofagitis por Candida, perleche (queilitis angular), vulvovaginitis por Candida (infección vaginal por hongos/candidiasis), intertrigo por Candida, candidiasis del pañal, candidiasis cutánea congénita, candidiasis perianal, paroniquia por Candida, erosión interdigital blastomicética, candidiasis mucocutánea crónica, candidiasis sistémica, candidiasis, candidiasis por antibióticos (candidiasis iatrogénica); coccidioidomycosis (p. ej. coccidioidomycosis pulmonar aguda, coccidioidomycosis pulmonar crónica, coccidioidomycosis diseminada, meningitis

coccidioidal); criptococosis (p. ej. criptococomicosis pulmonar aguda, criptococomicosis pulmonar crónica, criptococomicosis diseminada, meningitis criptocócica); histoplasmosis (por ejemplo, histoplasmosis primaria asintomática, histoplasmosis pulmonar sintomática aguda, histoplasmosis pulmonar crónica, histoplasmosis diseminada); blastomicosis (p. ej. blastomicosis pulmonar aguda, blastomicosis pulmonar crónica, blastomicosis diseminada); micetoma; paracoccidioidomicosis; neumocistosis; fusariosis; feohifomicosis (p. ej. feohifomicosis subcutánea; feohifomicosis del seno paranasal, feohifomicosis cerebral); alternariosis (p. ej. alternariosis subcutánea, alternariosis subcutánea); rinosporidiosis; microsporidiosis; basidiobolomicosis (p. ej. basidiobolomicosis subcutánea, basidiobolomicosis gastrointestinal, basidiobolomicosis diseminada); conidiobolomicosis (p. ej. conidiobolomicosis subcutánea, conidiobolomicosis diseminada); murcomicosis (p. ej. murcomicosis rinocerebral), murcomicosis GI, murcomicosis pulmonar); tricosporonosis (p. ej. tricosporonosis, tricosporonosis GI, tricosporonosis diseminada); cromoblastomicosis; geotricosis (p. ej. geotricosis oral, geotricosis pulmonar geotricosis GI); alesqueriasis (p. ej. alesqueriasis pulmonar, alesqueriasis diseminada); esporotricosis (p. ej. esporotricosis pulmonar, esporotricosis cutánea fija, esporotricosis linfocutánea, esporotricosis osteoarticular, esporotricosis diseminada); peniciliosis; lobomicosis; dermatofitosis/tiña (p. ej. tinea pedis (pie de atleta), tinea unguium, tinea corporis, tinea cruris (tiña inguinal), tinea manuum, tinea capitis, tinea barbae, tinea faciei); piedra (p. ej. tiña versicolor, tinea nigra, tinea albigena) o foliculitis por *Pityrosporum*/foliculitis por *Malassezia*.

La infección fúngica puede ser una micosis superficial (es decir, infecciones limitadas a la superficie externa del cabello y la piel), una micosis cutánea, una micosis subcutánea o una micosis sistémica, invasiva o diseminada (términos que se usan indistintamente). La infección puede considerarse una infección oportunista, por lo que se entiende una infección por una especie de hongo que generalmente se considera benigna en relación con un sujeto sano, es decir, uno con un sistema inmunitario sano (no comprometido).

Los hongos desempeñan un papel en la adquisición, desarrollo y complicación de enfermedades respiratorias (p. ej. fibrosis quística, neumonía, EPOC, COAD, COAP), septicemia, choque séptico, septicemia, meningitis, o intoxicación/alergias causadas por toxinas derivadas de hongos. Por consiguiente, En realizaciones particulares la invención puede proporcionar el tratamiento enfermedades respiratorias, p. ej. fibrosis quística, neumonía (fúngica), EPOC, COAD, COAP, septicemia (fúngica), choque séptico (fúngico), sepsis (fúngica), meningitis (fúngica), o intoxicación/alergias causadas por toxinas derivadas de hongos.

Una infección fúngica puede ocurrir en cualquier sujeto, pero algunos sujetos serán más susceptibles a la infección que otros. Los sujetos que son susceptibles a la infección fúngica incluyen, pero sin limitación, sujetos cuya barrera epitelial y/o endotelial está debilitada o comprometida, sujetos cuyas defensas basadas en secreciones a la infección microbiana han sido anuladas, alteradas, debilitadas o socavadas, y sujetos que están inmunocomprometidos, (es decir, un sujeto en el que alguna parte del sistema inmunitario no funciona normalmente, o funciona de manera anormal, en otras palabras, en aquellos en los que cualquier parte de la respuesta inmunitaria, o una actividad inmunitaria está reducida o deteriorada, ya sea por enfermedad o intervención clínica u otro tratamiento, o de alguna manera). Estos sujetos son susceptibles a infecciones fúngicas oportunistas.

Los ejemplos representativos de los sujetos que son susceptibles a la infección fúngica incluyen, pero sin limitación, sujetos con una infección preestablecida (p. ej. con bacterias, virus, hongos o parásitos tales como protozoos), especialmente sujetos con VIH, bacteriemia, sepsis o choque séptico; sujetos con inmunodeficiencia, por ejemplo, sujetos que se están preparando, que están recibiendo o se están recuperando de la quimioterapia y/o radioterapia contra el cáncer, sujetos que reciben un trasplante de órganos (p. ej. médula ósea, hígado, pulmón, corazón, válvula cardíaca, riñón, etc.) (incluyendo pacientes que reciben autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos) y sujetos con SIDA; sujetos que están recibiendo o se están recuperando de un tratamiento con antibióticos; sujetos que están recibiendo o se están recuperando de un tratamiento con esteroides; sujetos residentes en una institución de salud, por ejemplo, un hospital, especialmente sujetos en cuidados intensivos o cuidados críticos (es decir, aquellas unidades relacionadas con la provisión de sistemas de soporte vital o de soporte de órganos a pacientes); sujetos conectados a ventiladores respiratorios; sujetos que sufren traumatismos; sujetos con heridas; sujetos con heridas agudas y/o crónicas; sujetos neonatales; sujetos de edad avanzada; sujetos con cáncer (definido ampliamente en el presente documento para incluir cualquier condición neoplásica; maligna o no maligna), especialmente aquellos con cánceres del sistema inmunitario (por ejemplo, leucemias, linfomas y otros cánceres hematológicos); sujetos con diabetes; sujetos con malnutrición; sujetos alcohólicos; sujetos que padecen afecciones autoinmunitarias tales como artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Crohn, especialmente aquellos que reciben tratamiento de inmunosupresión para esas enfermedades; sujetos con secreción epitelial o endotelial reducida o anulada (por ejemplo, mucosas, lágrimas, saliva) y/o eliminación de la secreción (por ejemplo, sujetos con cilios de funcionamiento deficiente en el tejido mucosal y/o pacientes con moco hiperviscoso (p. ej. fumadores y sujetos con EPOC, COAD, COAP, bronquitis, fibrosis quística, enfisema, cáncer de pulmón, asma, neumonía o sinusitis)) y sujetos portadores de un dispositivo médico.

Por lo tanto, los sujetos en los que las infecciones fúngicas pueden combatirse particularmente de acuerdo con la presente invención incluyen pacientes que permanecen alterados, ya sea debido a una mala perfusión, traumatismo repetitivo, nutrición deficiente, oxigenación deficientes o disfunción de los glóbulos blancos.

Las infecciones fúngicas se encuentran comúnmente en las instituciones de salud debido en parte a la proximidad de

los sujetos con infecciones fúngicas y aquellos que tienen defensas comprometidas contra los microorganismos, pero también debido al uso generalizado de antibióticos. Los hongos, p. ej. de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* y *Absidia*, a menudo están implicados en infecciones nosocomiales y, por consiguiente, la invención se puede considerar como que proporciona tratamientos para infecciones fúngicas nosocomiales, p. ej. infecciones nosocomiales que implican *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon cutaneum*, el complejo *Fusarium solani*: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium moniliforme*, *Acremonium kiliense*, *Acremonium strictum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Scedosporium prolificans* o *Absidia corymbifera*. Con mucha frecuencia, pero no siempre, estas infecciones son infecciones invasivas (sistémicas o diseminadas) de los sujetos.

Particularmente susceptibles a las infecciones fúngicas, ya sean residentes o no en una institución de salud, son sujetos que han sufrido un traumatismo físico. El propio traumatismo puede causar un debilitamiento o compromiso de una barrera epitelial y/o endotelial del sujeto o el sujeto puede llegar a ser inmunocomprometido en respuesta al traumatismo (una respuesta de choque). El término "traumatismo" se refiere ampliamente al ataque celular por cuerpos extraños y/o daño físico de las células. Entre los cuerpos extraños se incluyen microorganismos, material particulado, agentes químicos y similares. Entre las lesiones físicas se incluyen lesiones mecánicas; lesiones térmicas, tales como las que resultan de calor o frío excesivos; lesiones eléctricas, tales como las causadas por el contacto con fuentes de potencial eléctrico; y los daños causados por radiación, por ejemplo, por exposición prolongada, extensa a radiaciones infrarrojas, ultravioletas o ionizantes.

De particular interés son los sujetos que tienen una lesión por explosión, que puede considerarse un traumatismo que resulta directa o indirectamente de la exposición a una explosión.

También de particular interés son los sujetos que tienen una quemadura. Cualquier quemadura, en particular una quemadura grave, tiene un impacto significativo sobre la integridad de la barrera epitelial y/o endotelial del sujeto y el sujeto a menudo resulta inmunocomprometido en respuesta a la quemadura (una respuesta de choque).

Los agentes causantes de quemaduras típicos son extremos de temperatura (por ejemplo, fuego y líquidos y gases a temperatura extrema), electricidad, sustancias químicas corrosivas, fricción y radiación. La extensión y duración de la exposición, junto con la intensidad/fuerza del agente, producen quemaduras de gravedad variable. Se considera que el escaldado (esto es, el traumatismo asociado con líquidos y/o gases a alta temperatura) es una quemadura.

La gravedad de la quemadura epidérmica se clasifica habitualmente de dos maneras. Lo más común es la clasificación por grado. Las quemaduras de primer grado generalmente se limitan al eritema (enrojecimiento) en el área general de la lesión y a una placa blanca en el sitio de la lesión. El traumatismo celular de estas quemaduras se extiende sólo hasta la epidermis. Las quemaduras de segundo grado también muestran eritema en el área general de la lesión, pero con ampollas superficiales de la epidermis. El traumatismo celular de las quemaduras de segundo grado implica la dermis superficial (papilar) y puede también implicar la capa profunda (reticular) de la dermis. Las quemaduras de tercer grado son aquellas en las que se pierde la epidermis con daño en la hipodermis. Los daños suelen ser extremos, incluyendo la carbonización. A veces existirá escara, (tejido necrótico seco negro). Las quemaduras de tercer grado pueden requerir injerto. En las quemaduras de cuarto grado se produce un daño catastrófico de la hipodermis, p. ej. la hipodermis se pierde completamente, con daños que se extienden hasta el músculo subyacente, tendón y tejido del ligamento. Se observa carbonización y escaras. El injerto es necesario si la quemadura no resulta mortal.

Otro sistema de clasificación común es la clasificación por espesor. Las quemaduras de "espesor superficial" corresponden a quemaduras de primer grado. El espectro de quemaduras de segundo grado está cubierto por dos clases de quemaduras de "espesor parcial". De "espesor parcial superficial" son las quemaduras que afectan a la epidermis sólo hasta la dermis papilar. De "espesor parcial profundo" son las quemaduras que afectan a la dermis hasta la dermis reticular. Las quemaduras de "espesor total" corresponden a quemaduras de tercer y cuarto grado.

Algunas lesiones físicas, por ejemplo, algunas quemaduras y ataques celulares por cuerpos extraños tienen como resultado la formación de una herida. Más específicamente, se puede considerar que una herida es una fisura, o desnudamiento de, un tejido. Las heridas también pueden ser causadas por una lesión que se forma espontáneamente tal como una úlcera de la piel (por ejemplo, una úlcera venosa, diabética o de presión), una fisura anal o una úlcera bucal.

Las heridas se definen por lo general como agudas o crónicas. Las heridas agudas son heridas que proceden ordenadamente a través de las tres etapas reconocidas del proceso de cicatrización (esto es, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación) sin una evolución prolongada. Las heridas crónicas, sin embargo, son aquellas heridas que no completan la secuencia ordenada de eventos bioquímicos del proceso de curación porque la herida se ha estancado en una de las etapas de curación. Habitualmente, las heridas crónicas se estancan en la fase inflamatoria. De acuerdo con un aspecto particular de la presente invención, una herida crónica es una herida que no ha cicatrizado en al menos 40 días, particularmente al menos 50 días, más particularmente, al menos 60 días, lo más particularmente, al menos 70 días.

Como se mencionó anteriormente, las heridas son un entorno ideal para la infección, incluyendo la infección fúngica, particularmente la infección crónica, debido a la falta de una barrera epitelial y la disponibilidad de sustrato y superficie para la fijación y colonización microbiana. Un aspecto problemático, es que la infección de una herida retrasa a menudo la cicatrización aún más aún y de este modo hace que la herida sea más susceptible a la infección establecida. Por lo tanto, la invención es eficaz en el tratamiento y prevención de la infección fúngica de heridas y el tratamiento de heridas, especialmente heridas crónicas, representa un aspecto preferido de la presente invención.

Por lo tanto, también se describe en el presente documento un oligómero de alginato para usar junto con (o en combinación o conjunción con) un agente antifúngico en el tratamiento o prevención de una infección de un sujeto por un hongo, particularmente una infección crónica por un hongo, en los sujetos mencionadas anteriormente, en particular en sujetos con enfermedades o trastornos respiratorios (por ejemplo, fibrosis quística, EPOC, COAD, COAP, neumonía), heridas, quemaduras y/o traumatismos.

A través de la capacidad para tratar y prevenir la infección de heridas por un hongo, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención como se define en el presente documento pueden eliminar uno de los obstáculos para la cicatrización de heridas y por lo tanto los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos definidos anteriormente son también eficaces en la promoción de la cicatrización de heridas agudas y crónicas infectadas o en riesgo de infectarse con un hongo.

Por promoción de la curación se entiende que el tratamiento acelera el proceso de cicatrización de la herida en cuestión (esto es, la progresión de la herida a través de las tres etapas reconocidas del proceso de cicatrización). La aceleración del proceso de cicatrización se puede manifestar como un aumento en la velocidad de progresión a través de una, dos o todas las etapas de cicatrización (esto es, la fase inflamatoria, la fase proliferativa y/o la fase de remodelación). Si la herida es una herida crónica que está estancada en una de las etapas de curación, la aceleración puede manifestarse como el reinicio del proceso de cicatrización lineal, secuencial después del estancamiento. En otras palabras, el tratamiento cambia la herida de un estado no curativo a un estado en el que la herida comienza a progresar hacia las etapas de cicatrización. Esa progresión después del reinicio puede ser a una velocidad normal o incluso a una velocidad más lenta en comparación con la velocidad a la que una herida aguda normal curaría.

Los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención pueden usarse juntos (o en combinación o conjunción con) para tratar o prevenir infecciones fúngicas donde sea que puedan ocurrir en o sobre el cuerpo de un sujeto. Por lo tanto, la infección puede ser una infección de un dispositivo médico por un hongo, particularmente un dispositivo médico interno, p. ej. tubos endotraqueales y de traqueotomía.

Los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención también se pueden usar juntos (o en combinación o conjunción con) como agentes para la salud oral, por ejemplo, en el control de las aftas bucales.

Convenientemente, los oligómeros de alginato y/o agentes antifúngicos pueden aplicarse mediante cualquier sistema de administración de salud oral/higiene oral. Esto puede ser a través del uso de pastas dentales, geles dentales, espumas dentales y enjuagues bucales. Las dentaduras extraíbles y otras prótesis dentales extraíbles pueden tratarse fuera de la cavidad oral con las mismas composiciones u otras composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas. Los oligómeros de alginato y/o agentes antifúngicos también se pueden incorporar en composiciones que se aplican a la cavidad oral (o se aplican a prótesis extraíbles y otras prótesis dentales extraíbles fuera de la cavidad oral) para formar un recubrimiento que persiste en las superficies con el tiempo, o que libera los oligómeros de alginato y/o agentes antifúngicos de las superficies recubiertas con el tiempo, y que inhiben el crecimiento de hongos en la cavidad oral y sobre las superficies de las dentaduras extraíbles y otras prótesis dentales extraíbles.

Los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención también se pueden usar juntos (o en combinación o conjunción con) como agentes para el cuidado de la piel y/o el cuidado del cabello, por ejemplo, en el control de las micosis superficiales, cutáneas o subcutáneas (p. ej. tinea pedis, tinea unguium, tinea corporis, tinea cruris, tinea manuum, tinea capitis, tinea barbae, tinea faciei, tinea versicolor, tinea nigra, tinea albegena, foliculitis por Pityrosporum / foliculitis por Malassezia, perleche, intertrigo por Candida, candidiasis del pañal, candidiasis cutánea congénita, candidiasis perianal, paroniquia por Candida, erosión interdigital blastomicética).

Convenientemente, los oligómeros de alginato y/o agentes antifúngicos pueden aplicarse mediante cualquier sistema de administración para el cuidado de la piel y/o cuidado del cabello. Esto puede ser a través del uso de champús, jabones, geles de ducha, acondicionadores del cabello, cremas para la piel, emolientes, pomadas, lociones, aceites, geles capilares, pulverizadores capilares, espumas y ceras.

En realizaciones específicas de la invención, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención pueden usarse juntos (o en combinación o conjunción) en el tratamiento o prevención de la neumonía (en particular la neumonía asociada a ventilación mecánica) asociada con hongos; enfermedades respiratorias asociadas con hongos (que pueden incluir EPOC, COAD, COAP, neumonía, fibrosis quística y asma); e infecciones fúngicas asociadas con dispositivos médicos implantables o protésicos (por ejemplo, endocarditis valvular protésica o la infección de líneas o catéteres o articulaciones artificiales o reemplazos de tejido (incluidos, por ejemplo, implantes

dentales) o tubos endotraqueales o de traqueotomía).

Como se ha mencionado anteriormente, en un aspecto la invención proporciona un método *in vitro* para combatir la colonización de un sitio con hongos que no está en una biopelícula.

5 Combatir la colonización" incluye medidas o tratamientos preventivos y reaccionarios y, por lo tanto, cubre la prevención, así como la reducción, limitación o eliminación de, la colonización existente, por ejemplo, incluye un retraso en la colonización.

10 La expresión "combatir un hongo" incluye medidas o tratamientos preventivos y reaccionarios y, por lo tanto, incluye destruir o prevenir o reducir el crecimiento de un hongo. En particular, se puede prevenir la formación de una población de hongos o se puede controlar el crecimiento de la población. Esto podría dar como resultado la reducción, limitación o eliminación de la población, o un retraso en su formación.

15 El sitio o la localización del hongo o la colonización fúngica (o la posible colonización o localización fúngica, etc.) no están restringidos y pueden ser cualquiera de los diversos sitios o localizaciones descritos o mencionados anteriormente, p. ej. puede ser *in vitro* o *in vivo*, pero particularmente en este aspecto de la invención será un sitio o localización "*in vitro*" o "*ex vivo*" (por ejemplo, un sitio o localización inanimado o abiótico, o una localización biótica no clínica). Sin embargo, el sitio o la localización pueden estar en o sobre un sujeto y en cuyo caso el oligómero de alginato y el agente antifúngico se administran normalmente al sujeto en formas fisiológica y/o farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización particular, los diversos aspectos de la invención pueden aplicarse a la descontaminación de materiales de desecho clínicos, científicos e industriales. En otra realización particular, los diversos aspectos de la invención pueden usarse para descontaminar tejido de trasplante (p. ej. corazón, pulmones, riñón, hígado, válvula cardíaca, páncreas, intestino, tejido corneal, injertos arteriales y venosos y piel) y dispositivos médicos (p. ej. tubos endotraqueales y de traqueotomía) antes de la implantación.

30 En otras realizaciones, los diversos aspectos de la invención pueden aplicarse al control de poblaciones fúngicas en el medio ambiente, en particular en los campos técnicos de la agricultura, la producción de alimentos y la ingeniería, donde la colonización fúngica y el posterior deterioro/daño pueden ser costosos e incluso peligrosos para la salud humana.

35 De particular interés es la aplicación de la invención al combate de hongos durante el cultivo de plantas y la producción de productos vegetales. En esta área, los métodos de la invención pueden usarse para controlar hongos en o sobre las plantas vivas mismas para maximizar su productividad, pero también pueden aplicarse a los productos de cosecha (por ejemplo, semillas, frutas, o los productos producidos a partir de los mismos para combatir el deterioro. El suelo también puede ser tratado para combatir la colonización existente y futura.

40 La expresión "en una planta" se usa ampliamente en el presente documento para incluir sitios o localizaciones dentro de una planta o sobre una planta, por ejemplo, una superficie vegetal externa o un tejido vegetal interno.

45 La localización de la infección (o colonización) de la planta no está restringida y puede ser cualquiera de los sitios o localizaciones en una planta descritos anteriormente. La administración del oligómero de alginato y el agente antifúngico a la planta preferentemente da como resultado que la localización infectada (o colonizada) se ponga en contacto con un oligómero de alginato y un agente antifúngico en cantidades suficientes para tratar la infección (o colonización).

50 La infección (colonización) de la planta puede ser aguda o, como alternativa, crónica, por ejemplo, una infección que ha persistido durante al menos 5 o al menos 10 días, particularmente al menos 20 días, más particularmente, al menos 30 días, lo más particularmente, al menos 40 días.

55 En una realización, los métodos o usos de la invención pueden comprender una etapa en la que se identifica la planta como que tiene o se sospecha que tiene una infección fúngica (o colonización) o que es una candidata en riesgo o susceptible, a una infección fúngica (o colonización).

60 El deterioro de los alimentos es un problema grave y los métodos de la invención pueden aplicarse a la industria de producción de alimentos en muchos puntos, por ejemplo, aplicando los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos juntos a los alimentos y/o usando estos compuestos juntos como ingredientes en los alimentos y/o en sus envases.

65 En otra realización adicional, se puede considerar que los diversos aspectos de la invención cubren el uso de los oligómeros de alginato junto con los agentes antifúngicos como tratamientos conservadores antifúngicos/aditivos para materiales, especialmente soluciones y líquidos. Esto tiene una aplicación particular en el campo de la ingeniería, donde pueden producirse daños estructurales y/o cosméticos a los materiales si se permite la colonización por hongos. Por lo tanto, la incorporación de los oligómeros de alginato junto con los agentes antifúngicos en materiales de

ingeniería o la aplicación de estos compuestos a materiales de ingeniería es útil para prevenir este daño. Los materiales de ingeniería (p. ej. madera, productos de madera procesada, madera no procesada, papel, hormigón, cemento, arena, porcelana, piedra, cerámica, escayola, pintura, barniz, selladores de silicona, lechada, mortero, ladrillos, plásticos) pueden suministrarse después de haber sido tratados con los oligómeros de alginato junto con los agentes antifúngicos o con estos compuestos incluidos como aditivos. Además, los oligómeros de alginato junto con los agentes antifúngicos pueden aplicarse o agregarse a estos materiales en cualquier momento, por ejemplo, para prevenir la colonización por hongos o para tratar la colonización por hongos si ha ocurrido.

Tal como se ha indicado anteriormente, el término "contacto" abarca cualquier medio de administrar el oligómero de alginato y el agente antifúngico al hongo, ya sea directa o indirectamente.

Más particularmente, el hongo se pondrá en contacto con una cantidad eficaz del oligómero de alginato y el agente antifúngico, más particularmente una cantidad del oligómero de alginato y una cantidad del agente antifúngico que juntos (o en combinación o conjunción) inhiben la viabilidad y/o crecimiento del hongo y, por lo tanto, tratan o previenen la infección/colonización. En otras realizaciones, esas cantidades son suficientes para superar la resistencia del hongo al agente antifúngico.

Una "cantidad eficaz" del oligómero de alginato y el agente antifúngico es aquella cantidad de oligómero de alginato y esa cantidad del agente antifúngico que juntas (o en combinación o conjunción) proporcionan una inhibición medible del crecimiento de un hongo, o población del mismo, al que va dirigido. En ciertas realizaciones, la "cantidad eficaz" del oligómero de alginato y el agente antifúngico es aquella cantidad de oligómero de alginato y aquella cantidad del agente antifúngico que juntas (o en combinación o conjunción) proporcionan una reducción medible en la resistencia (o un aumento medible en la susceptibilidad o disminución medible de la tolerancia) al antifúngico que muestra el hongo (por ejemplo, utilizando los indicadores de resistencia descritos anteriormente).

Una "cantidad farmacéuticamente eficaz" del oligómero de alginato y el agente antifúngico es aquella cantidad de oligómero de alginato y aquella cantidad del agente antifúngico que juntas (o en combinación o conjunción) proporcionan un tratamiento o prevención medible de la infección por un hongo al que va dirigido. En ciertas realizaciones, la "cantidad farmacéuticamente eficaz" del oligómero de alginato y el agente antifúngico es aquella cantidad de oligómero de alginato y aquella cantidad del agente antifúngico que juntas (o en combinación o conjunción) proporcionan una reducción medible en la resistencia (o un aumento medible en la susceptibilidad o disminución medible de la tolerancia) al agente antifúngico que muestra el hongo (por ejemplo, utilizando los indicadores de resistencia descritos anteriormente) en un sujeto.

El experto podría determinar fácilmente qué cantidad eficaz/farmacéuticamente eficaz de oligómero de alginato y agente antifúngico sería basándose en protocolos de respuesta a la dosis de rutina y, de forma conveniente, las técnicas de rutina para evaluar la inhibición del crecimiento microbiano, etc., tal como se ha tratado anteriormente. El experto también podría, sin demasiado trabajo, optimizar estas cantidades para maximizar los efectos combinatorios del oligómero de alginato y el agente antifúngico en su sistema objetivo.

En un contexto terapéutico, las dosis adecuadas de oligómero de alginato y agente antifúngico variarán de un sujeto a otro y pueden ser determinadas por el médico o veterinario de acuerdo con el peso, la edad y el sexo del sujeto, la identidad del hongo al que se dirige, la gravedad de la infección, el modo de administración y también el oligómero de alginato o agente antifúngico particular seleccionados. Normalmente, los oligómeros de alginato de uso en la invención se aplicarán a la localización sometida a tratamiento a una concentración local de al menos 0,5 %, preferentemente al menos 2 % o al menos 4 %, más preferentemente al menos 6 % y lo más preferentemente al menos 10 % en peso por volumen. Normalmente, el agente antifúngico de uso en la invención se aplicará a la localización sometida a tratamiento a una concentración local de al menos 0,0001 mg/ml, preferentemente al menos 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 o 4096 mg/ml.

Consideraciones similares se aplican fuera de las aplicaciones terapéuticas de la invención y, asimismo, las dosis adecuadas de oligómero de alginato y agente antifúngico variarán dependiendo de la aplicación específica y pueden ser determinadas por el experto relevante (por ejemplo, agricultor, investigador científico de alimentos, ingeniero) sin demasiado trabajo. De nuevo, los ejemplos de concentraciones locales adecuadas serían, para los oligómeros de alginato de uso en la invención, al menos 0,5 %, preferentemente al menos 2 % o al menos 4 %, más preferentemente al menos 6 % y lo más preferentemente al menos 10 % en peso por volumen, y para el agente antifúngico, al menos 0,0001 mg/ml, preferentemente al menos 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 o 4096 mg/ml.

"Tratamiento" cuando se usa en relación con el tratamiento de una afección/infección médica (cuya referencia se extiende a la "colonización" en ciertos aspectos de la invención) en un sujeto de acuerdo con la invención se usa ampliamente en el presente documento para incluir cualquier efecto terapéutico, es decir, cualquier efecto beneficioso sobre la afección o relacionado con la infección. Por lo tanto, no solo se incluye la erradicación o eliminación de la infección, o la cura del sujeto o infección, sino también una mejora en la infección o afección del sujeto. Por lo tanto, se incluye, por ejemplo, una mejora en cualquier síntoma o signo de la infección o afección, o en cualquier indicador clínicamente aceptado de la infección/afección (por ejemplo, una disminución en el tamaño de la herida o una

aceleración del tiempo de cicatrización). Por lo tanto, el tratamiento incluye terapia curativa y paliativa, por ejemplo, de una infección/afección preexistente o diagnosticada, es decir, un tratamiento reaccionario.

5 "Prevención" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier efecto profiláctico o preventivo. Por lo tanto, incluye retrasar, limitar, reducir o prevenir la afección (cuya referencia incluye infección, contaminación y población, según corresponda, en los diferentes aspectos de la invención) o el inicio de la afección, o uno o más síntomas o indicaciones de la misma, por ejemplo respecto a la afección o síntoma o indicación previa al tratamiento profiláctico. La profilaxis, por lo tanto, incluye explícitamente tanto la prevención absoluta de la aparición o el desarrollo de la afección, o sus síntomas o indicaciones, como cualquier retraso en el inicio o desarrollo de la afección o síntoma o indicación, o la reducción o limitación del desarrollo o progresión de la afección o síntoma o indicación.

15 Específicamente, los oligómeros de alginato y el agente antifúngico de uso en la invención se pueden tomar/administrar juntos (o en combinación o conjunción) como un tratamiento profiláctico, por ejemplo, para prevenir o al menos minimizar el riesgo, de infección o colonización por el hongo.

20 El aspecto de la invención relativo a combatir (tratamiento o prevención) de una infección por hongos es de particular utilidad en la atención de pacientes hospitalizados ya que el riesgo de contraer una infección nosocomial (comúnmente conocida como infección relacionada con/adquirida en el hospital/adquirida o infección asociada a la asistencia sanitaria) por un hongo puede minimizarse con un régimen profiláctico de los oligómeros de alginato y agentes antifúngicos definidos en el presente documento. Este aspecto de la invención también es de particular utilidad en el cuidado de sujetos que sufren traumatismos, sujetos con una quemadura, sujetos con heridas y sujetos con un dispositivo médico implantable/interno, todos los cuales, como se ha descrito anteriormente, son más susceptibles a la infección por hongos que un sujeto que no se ve afectado de manera similar.

25 Generalmente, los sujetos que necesitan tratamiento o profilaxis de acuerdo con la invención serán diagnosticados de sufrir una infección o en riesgo de infección por un hongo, por ejemplo, identificado como que tiene o está en riesgo de desarrollar una infección por un hongo.

30 Específicamente, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención se pueden tomar juntos (o en combinación o conjunción) como un tratamiento profiláctico para prevenir, o al menos para minimizar el riesgo, de desarrollar una infección por el hongo, incluyendo por ejemplo la infección de una herida por el hongo; infecciones del tracto respiratorio y los pulmones por un hongo (por ejemplo, en el contexto de fibrosis quística, EPOC, COAD, COAP, neumonía u otras enfermedades respiratorias) o infección de un dispositivo médico (por ejemplo, interno) por el hongo.

35 La invención abarca el uso de un solo oligómero de alginato o una mezcla (multiplicidad/pluralidad) de diferentes oligómeros de alginato. Por lo tanto, por ejemplo, se puede usar una combinación de diferentes oligómeros de alginato (por ejemplo, dos o más).

40 La invención abarca el uso de un único agente antifúngico o una mezcla (multiplicidad/pluralidad) de diferentes agentes antifúngicos. Por lo tanto, por ejemplo, se puede usar una combinación de diferentes agentes antifúngicos (por ejemplo, dos o más).

45 En una realización ventajosa de la invención, los oligómeros de alginato y el agente antifúngico pueden usarse en los métodos de la invención en conjunción o combinación con un agente antimicrobiano adicional (en lo sucesivo "agente antimicrobiano adicional").

50 En el contexto de un uso terapéutico, dicho agente antimicrobiano puede ser cualquier agente antimicrobiano clínicamente útil y particularmente un antibiótico o un agente antiviral o antifúngico. En el contexto de usos no terapéuticos, el agente antimicrobiano puede ser nuevamente cualquier agente antimicrobiano utilizado para tales fines, por ejemplo, cualquier desinfectante o antiséptico o agente de limpieza o esterilización. Los agentes pueden usarse por separado, o juntos en la misma composición, simultánea o secuencialmente o por separado, por ejemplo, en cualquier intervalo de tiempo deseado.

55 Por lo tanto, a modo de ejemplo representativo, el agente antimicrobiano adicional puede usarse después del oligómero de alginato y/o el agente antifúngico, pero en algunas circunstancias puede ser beneficioso un uso anterior o simultáneo o intermedio.

60 La elección del agente antimicrobiano, por supuesto, deberá ser adecuada para la localización que se somete al tratamiento, pero por ejemplo se pueden usar agentes antimicrobianos, por ejemplo, antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antisépticos y/o condiciones de esterilización tales como irradiación (por ejemplo, rayos UV, rayos X, gamma) extremos de temperatura y extremos de pH.

65 Los antibióticos representativos incluyen los aminoglucósidos (p. ej. amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina); los carbacefems (p. ej. loracarbef); cefalosporinas de la 1ª generación (p. ej. cefradoxilo, cefazolina, cefalexina); cefalosporinas de la 2ª generación (p. ej. cefaclor, cefamandol, cefalexina,

cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima); cefalosporinas de la 3ª generación (p. ej. cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona); cefalosporinas de la 4ª generación (p. ej. cefepima); los macrólidos (p. ej. azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, troleandomicina); los monobactámicos (p. ej. aztreonam); las penicilinas (p. ej. amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, ticarcilina); los antibióticos polipéptidos (p. ej. bacitracina, colistina, polimixina B); las quinolonas (p. ej. ciprofloxacino, enoxacino, gatifloxacino, levofloxacino, lomefloxacino, moxifloxacino, norfloxacino, ofloxacino, trovafloxacino); las sulfonamidas (p. ej. mafenida, sulfacetamida, sulfametizol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim sulfametoxazol); las tetraciclinas (p. ej. demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina); las glicilciclinas (p. ej. tigeciclina); los carbapenems (p. ej. imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, panipenem/betamipron, biapenem, PZ-601); otros antibióticos incluyen cloranfenicol; clindamicina, etambutol; fosfomicina; isoniazida; linezólida; metronidazol; nitrofurantoína; pirazinamida; quinupristina/dalfopristina; rifampina; espectinomicina; y vancomicina.

Los antisépticos representativos incluyen, pero sin limitación blanqueador de cloro (hipoclorito de sodio), compuestos de amonio cuaternario (p. ej. cloruro de benzalconio, bromuro de cetil trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos (p. ej. TCP), alcoholes (p. ej. etanol), Virkon™, compuestos de yodo (p. ej. povidona yodada), compuestos de plata (p. ej. nanopartículas/micropartículas de plata elemental) y triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol).

Los tensioactivos antimicrobianos son otra clase de antisépticos. Estos son compuestos que alteran las membranas celulares microbianas y otros componentes estructurales y, por lo tanto, inhiben el crecimiento y/o la viabilidad de los microorganismos. Los tensioactivos antimicrobianos y su uso en composiciones antimicrobianas son bien conocidos en la técnica y en caso de que se necesite información adicional para la descripción de los tensioactivos antimicrobianos se puede consultar en "Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs - Principles and practice", Ed. Kabara and Orth, Marcel Dekker, NY, NY, 1997. Los tensioactivos antimicrobianos pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfóteros. Los ejemplos de tensioactivos aniónicos antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, dodecil sulfato sódico (lauril sulfato sódico), ácido dodecylaminopropiónico de sodio, ricinoleato de sodio, ácidos biliares, alquilaryl sulfonatos, Grillosan DS7911, amidosulfosuccinato de monoetanol del ácido undecilénico de disodio. Los ejemplos de tensioactivos catiónicos antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, los compuestos de amonio cuaternario, las aminimidias y los compuestos de clorhexidina. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, los monoésteres de ácidos grasos, los polietilenglicomonioésteres del ácido alquildihidroxi benzoico, derivados de glucosamina y dietanolamidas de N-lauroildipéptidos. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros antimicrobianos incluyen, pero sin limitación, las alquil betaínas, las alquilamidopropilbetaínas, los alquil aminopropionatos, los alquiliminodipropionatos y las alquilimidazolinias.

Los antifúngicos representativos incluyen aquellos enumerados anteriormente, especialmente aquellos citados como preferidos.

Los antivirales representativos incluyen, pero sin limitación, abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, arbidol, atazanavir, atripla, boceprevir, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, famciclovir, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, interferón de tipo III, interferón de tipo II, interferón de tipo I, lamivudina, lopinavir, lovirida, maraviroc, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconarilo, podofilotoxina, raltegravir, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir y zidovudina.

El agente antimicrobiano adicional, de modo conveniente, puede aplicarse antes, simultáneamente con, después o entre el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico. De modo conveniente, el agente antimicrobiano adicional se aplica sustancialmente al mismo tiempo que el oligómero de alginato y/o el antibiótico o después. Por ejemplo, el agente antimicrobiano adicional se puede aplicar al menos 1 hora, preferentemente al menos 3 horas, más preferentemente al menos 5 y lo más preferentemente al menos 6 horas después de administrar el oligómero de alginato y/o el antibiótico. En otras realizaciones, el antimicrobiano adicional puede aplicarse o administrarse de modo conveniente antes del oligómero de alginato y/o del agente antifúngico, p. ej. al menos 1 hora, al menos 3 horas, al menos 6 horas antes del oligómero de alginato y/o del agente antifúngico. En estas realizaciones, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico puede aplicarse o administrarse con o sin una aplicación adicional del antimicrobiano adicional. Para optimizar el efecto antimicrobiano del agente antimicrobiano adicional, este puede suministrarse (por ejemplo, administrarse o distribuirse) repetidamente en momentos del tiempo apropiados para el agente empleado. El experto es capaz de diseñar una dosificación o régimen de utilización adecuado. En los tratamientos a largo plazo, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico también pueden utilizarse repetidamente. El oligómero de alginato puede aplicarse con tanta frecuencia como el agente antifúngico y/o el agente antimicrobiano adicional, pero generalmente será aplicado con menos frecuencia. La frecuencia requerida dependerá de la localización del hongo, la composición de la colonia y el antimicrobiano adicional utilizado, y el experto será capaz de optimizar los patrones de dosificación o utilización para optimizar los resultados.

En una realización ventajosa, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico pueden utilizarse o aplicarse después

de la eliminación o reducción física (por ejemplo, desbridamiento) de la colonia/población que comprende el hongo que provoca la infección en la localización que está sometida a tratamiento.

Después de la eliminación de, o un intento de eliminar, el hongo, la localización puede ponerse en contacto con el oligómero de alginato durante entre 0 y 24 horas, particularmente entre 2 y 12 horas, más particularmente entre 4 y 8 horas, lo más particularmente entre 5 y 7 horas, p. ej. 6 horas. Después de esto, puede aplicarse el agente antifúngico, y, si se desea, el agente antimicrobiano adicional. Este escenario puede resultar deseable o particularmente aplicable en un entorno clínico. En el caso de heridas infectadas por un hongo, la duración de la incubación puede diseñarse de modo conveniente para corresponder a los cambios programados del vendaje de la herida.

La eliminación física del hongo se puede realizar con cualquier medio quirúrgico, mecánico o químico adecuado. Convenientemente este puede ser el uso de composiciones líquidas, gel, gel-sol, semisólidas o gas aplicado a presión en la colonia/población, tratamiento por ultrasonidos, láser o mediante un instrumento abrasivo. Una composición utilizada en la propia eliminación o como una solución de lavado antes, durante o después puede contener convenientemente el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico.

Por consiguiente, en el presente documento se divulga una composición de desbridamiento o lavado, por ejemplo, una solución para heridas que contiene un oligómero de alginato, particularmente cualquier oligómero de alginato como se define en el presente documento y/o un agente antifúngico, particularmente cualquier fármaco antifúngico como se define en el presente documento, para usar en los tratamientos de la invención. Dicha composición de desbridamiento será normalmente una solución estéril, particularmente una solución estéril acuosa o una solución estéril a base de aceite, y puede contener adicionalmente enzimas de proteólisis (por ejemplo, colagenasa, tripsina, pepsina, elastasa) y/o una fase sólida abrasiva (por ejemplo, sílice coloidal, piedra pómez molida, cáscaras vegetales o animales trituradas).

El uso de los oligómeros de alginato y el agente antifúngico en combinación o conjunción con agentes inmunoestimulantes también puede ser beneficioso en la aplicación de la invención en una situación clínica. Estos agentes inmunoestimuladores pueden usarse convenientemente en los puntos temporales correspondientes a los descritos anteriormente en relación con otros agentes antimicrobianos y pueden usarse opcionalmente en combinación con un oligómero de alginato y/o el agente antifúngico y/o un agente antimicrobiano adicional inmunoestimulante adecuado, pero sin limitación, las citocinas p. ej. TNF, IL-1, IL-6, IL-8 y alginatos inmunoestimulantes, tales como los alginatos con un alto contenido de M como se describe por ejemplo en el documento US 5.169.840, WO91/11205 y W003/045402, pero incluyendo cualquier alginato con propiedades inmunoestimulantes.

El uso de los oligómeros de alginato y el agente antifúngico en combinación o conjunción con factores de crecimiento, p. ej. PDGF, FGF, EGF, TGF, hGF y enzimas también pueden ser beneficiosos en los usos médicos de la invención. Los ejemplos representativos de enzimas adecuadas incluyen, pero sin limitación, proteasas, p. ej. serina proteasas, metaloproteasas y cisteína proteasas (ejemplos de estos tipos de proteasas se enumeran en el documento EP0590746); nucleasas, p. ej. ADNasa I y II, ARNasa A, H, I, II, III, P, PhyM, R; lipasas y enzimas capaces de degradar polisacáridos.

El uso de los oligómeros de alginato y el agente antifúngico en combinación o conjunción con un agente reductor de la viscosidad de la mucosa fisiológicamente tolerable también podría ser beneficioso, p. ej. una enzima de escisión de ácido nucleico (p. ej. una ADNasa como la ADNasa I), gelsolina, un agente reductor de tiol, una acetilcisteína, cloruro de sodio, un polisacárido de bajo peso molecular sin carga (p. ej. dextrano), arginina (u otros precursores de óxido nítrico o estimuladores de la síntesis), o un poliaminoácido aniónico (p. ej. poli ASP o poli GLU). Ambroxol, romhexina, carbocisteína, domiodol, eprazinona, erdoesteína, letosteína, mesna, neltexina, sobrerol, estepronina, tiopronina son mucolíticos específicos destacables.

El uso de los oligómeros de alginato y el agente antifúngico en combinación o conjunción con broncodilatadores también puede ser beneficioso en los usos médicos de la invención, en el tratamiento de enfermedades respiratorias asociadas con hongos especialmente (que pueden incluir EPOC, COAD, COAP, neumonía, fibrosis quística, enfisema y asma). Los ejemplos representativos de broncodilatadores adecuados incluyen, pero sin limitación, los agonistas β_2 (p. ej. pirbuterol, epinefrina, salbutamol, salmeterol, levosalbutamol, clenbuterol), los anticolinérgicos (p. ej. ipratropio, oxitropio, tiotropio) y teofilina.

El uso de los oligómeros de alginato y el agente antifúngico en combinación o conjunción con corticoesteroides también puede ser beneficioso en los usos médicos de la invención, en el tratamiento de enfermedades respiratorias asociadas con hongos especialmente (que pueden incluir EPOC, COAD, COAP, neumonía, fibrosis quística, enfisema y asma). Los ejemplos representativos de corticoesteroides adecuados incluyen, pero sin limitación, prednisona, flunisolida, triamcinolona, fluticasona, budesonida, mometasona, beclometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluocinonida, fluocinolona, halcinonida, hidrocortisona, cortisona, tixocortol, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, betametasona, dexametasona, fluocortolona, aclometasona, prednicartrato, clobetasona, clobetasol, y fluprednido.

Los oligómeros de alginato y el agente antifúngico pueden usarse opcionalmente con cualquier otro agente

terapéuticamente activo que pueda desearse usar, p. ej. un agente antimicrobiano, un agente antiinflamatorio (p. ej. un esteroide antiinflamatorio), un agente inmunoestimulante, un agente reductor de la viscosidad de la mucosa, un inhibidor del crecimiento o una enzima o un alfa bloqueante, un broncodilatador o un corticosteroide. El uso combinado de un oligómero de alginato y un agente antifúngico con un agente terapéuticamente activo adicional (p. ej., un agente antimicrobiano o antiinflamatorio, un agente inmunoestimulante, un agente reductor de la viscosidad de la mucosa, un inhibidor del crecimiento o una enzima o un alfa bloqueante, un broncodilatador o un corticosteroide) pueden mejorar los efectos clínicos del agente activo y esto puede permitir ventajosamente reducir la dosis (p. ej., la dosis habitual o normal) del agente terapéuticamente activo adicional p. ej. se puede usar en su dosis normal o habitual o en una dosis más baja, por ejemplo, hasta un 50 % (o al 50 %) de su dosis normal.

En el caso de un uso terapéutico, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención pueden administrarse al sujeto en cualquier forma conveniente o por cualquier medio conveniente, p. ej. por la vía tópica, oral, parenteral, enteral, o por inhalación. Preferentemente, el alginato y los agentes antifúngicos se administrarán por vía tópica, oral o parenteral o por inhalación. Los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos no necesitan estar en la misma composición y no necesitan administrarse por la misma vía.

El experto podrá formular los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención en composiciones farmacéuticas que están adaptadas para estas vías de administración de acuerdo con cualquiera de los métodos convencionales conocidos en la técnica y ampliamente descritos en la literatura.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para usar en cualquiera de los métodos o usos mencionados anteriormente que comprende un oligómero de alginato como se define en el presente documento junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta composición también puede comprender un agente antifúngico como se define en el presente documento.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para usar en cualquiera de los métodos o usos mencionados anteriormente que comprende un agente antifúngico como se define en el presente documento junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esta composición también puede comprender un oligómero de alginato como se define en el presente documento.

Como se mencionó anteriormente, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos propuestos para su uso de acuerdo con la invención pueden usarse en combinación entre sí, por ejemplo para administrarse juntos, en una formulación o composición farmacéutica única, o por separado (es decir, para administración por separado, secuencial o simultánea). Por lo tanto, los oligómeros de alginato y los agentes antifúngicos de uso en la invención pueden combinarse, p. ej. en un kit farmacéutico o como un producto combinado ("combinación").

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona productos (por ejemplo, un kit farmacéutico o un producto combinado ("combinación") o composiciones (por ejemplo, una composición farmacéutica) en donde el producto o composición comprende el oligómero de alginato como se define en el presente documento y el agente antifúngico.

También se pueden incorporar agentes activos adicionales. La descripción anterior y siguiente de agentes activos adicionales y excipientes y similares es directamente aplicable en su totalidad a esta parte de la divulgación.

Por lo tanto, como se ha indicado anteriormente, otros aspectos de la presente invención proporcionan productos que contienen el oligómero de alginato y el agente antifúngico como una preparación combinada para los usos definidos en el presente documento. Tales productos pueden contener opcionalmente un agente activo adicional.

El "principio activo" puede incorporarse, opcionalmente junto otros agentes activos, con uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes convencionales, para producir preparaciones galénicas convencionales tales como comprimidos, píldoras, polvos (p. ej. polvos inhalables), pastillas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), pulverizaciones (p. ej., pulverizaciones nasales), composiciones para su uso en nebulizadores, pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, pesarios, soluciones inyectables estériles, polvos envasados estériles, y similares. Las composiciones inhalables son de particular interés para usar en el tratamiento de enfermedades respiratorias asociadas con hongos (que pueden incluir EPOC, COAD, COAP, neumonía, fibrosis quística, enfisema y asma). Las soluciones inyectables estériles son de particular interés para usar en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas.

Los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados son lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato cálcico, polímeros de alginato inertes, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, agua, agua/etanol, agua/glicol, agua/polietileno, agua salina hipertónica, glicol, propilenglicol, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo, hidroxibenzoatos de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral o sustancias grasas, tales como grasa dura o mezclas de los mismos adecuadas. Los excipientes y diluyentes destacables son manitol y agua salina hipertónica (solución salina).

Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, y similares. En las

composiciones farmacéuticas se pueden incluir agentes terapéuticamente activos adicionales, como se ha descrito anteriormente en relación con las terapias de combinación anteriores.

5 Las formas de administración por vía parenteral, por ejemplo, las soluciones intravenosas, deben ser estériles y estar exentas de agentes fisiológicamente inaceptables, y deben tener una baja osmolaridad para minimizar la irritación u otros efectos adversos tras la administración y, por lo tanto, las soluciones deben ser preferentemente isotónicas o ligeramente hipertónicas, p. ej. agua salina hipertónica (solución salina). Los vehículos adecuados incluyen vehículos acuosos utilizados habitualmente para administrar soluciones parenterales tales como agua estéril para inyección, inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y clorito sódico, inyección de Ringer lactato y otras soluciones tales como se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed., Easton: Mack Publishing Co., pp. 1405-1412 y 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV, 14^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975). Las soluciones pueden contener conservantes, agentes antimicrobianos, tampones y antioxidantes usados convencionalmente para las soluciones parenterales, excipientes y otros aditivos que son compatibles con los biopolímeros y que no interferirán con la fabricación, almacenamiento o uso de productos.

20 Para la administración tópica, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico pueden incorporarse en cremas, pomadas, geles, parches transdérmicos y similares. Los oligómeros de alginato y/o el agente antifúngico también se pueden incorporar en apósitos médicos, por ejemplo apósitos para heridas, p. ej. apósitos tejidos (p. ej. tejidos) o apósitos no tejidos (por ejemplo, geles o apósitos con un componente de gel). Se conoce el uso de polímeros de alginato en apósitos, y tales apósitos, o incluso cualquier apósito, puede incorporar adicionalmente los oligómeros de alginato de uso en la invención.

25 Por consiguiente, en un ejemplo específico adicional, la divulgación proporciona además un apósito para heridas que comprende un oligómero de alginato (que puede ser cualquier oligómero de alginato como se define en el presente documento) y/o un agente antifúngico (que puede ser cualquier agente antifúngico como se define en el presente documento, aunque preferentemente un fármaco antifúngico) para su uso, cuando sea adecuado, en los tratamientos de la invención.

30 Otros sistemas tópicos que se consideran adecuados son los sistemas de administración de fármacos *in situ*, por ejemplo geles donde se forman matrices de gel cristalino sólido, semisólido, amorfo o líquido *in situ* y que puede comprender el oligómero de alginato (que puede ser cualquier oligómero de alginato como se define en el presente documento) y/o un agente antifúngico (que puede ser cualquier agente antifúngico como se define en el presente documento, aunque preferentemente un fármaco antifúngico). Dichas matrices se pueden diseñar convenientemente para controlar la liberación del oligómero de alginato y/o el agente antifúngico de la matriz, por ejemplo, la liberación puede retrasarse y/o mantenerse durante un período de tiempo elegido. Tales sistemas pueden formar geles sólo al contacto con tejidos o fluidos biológicos. Por lo general, los geles son bioadhesivos. La administración a cualquier sitio del cuerpo que pueda retener o adaptarse para retener la composición pre-gel puede utilizar dicha técnica de administración. Tales sistemas se describen en el documento WO 2005/023176.

40 Para la aplicación a superficies orales, bucales y dentales, se mencionan específicamente pasta de dientes, geles dentales, espumas dentales y enjuagues bucales. Por lo tanto, en un ejemplo particular se incluye una composición para el cuidado de la salud oral, o higiene oral, que comprende un oligómero de alginato (que puede ser cualquier oligómero de alginato como se define en el presente documento) y/o un agente antifúngico (que puede ser cualquier agente antifúngico como se define en el presente documento, aunque preferentemente un fármaco antifúngico), particularmente un enjuague bucal, pasta de dientes, gel dental o espuma dental para usar, cuando sea adecuado, en los tratamientos de la invención.

50 Para la aplicación en superficies externas del cuerpo, se mencionan específicamente los agentes para el cuidado de la piel y el cabello. Por lo tanto, en un ejemplo particular se incluye una composición para el cuidado de la piel y/o el cuidado del cabello que comprende un oligómero de alginato y un agente antifúngico (que puede ser cualquier oligómero de alginato o agente antifúngico como se define en el presente documento), particularmente un champú, jabón, gel de ducha, acondicionador de cabello, crema para la piel, emoliente, pomada, loción, aceite, gel capilar, pulverizador capilar, espuma y cera.

55 También son destacables las composiciones inhalables. La formulación de composiciones adecuadas para inhalación es rutinaria para el experto y ha sido durante mucho tiempo una práctica estándar en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Las composiciones inhalables pueden, por ejemplo, adoptar la forma de polvos inhalables, soluciones o suspensiones. El experto podrá seleccionar el tipo de sistema de administración más apropiado para sus necesidades y podrá preparar una formulación adecuada de los alginatos y/o fármacos antifúngicos de uso en la invención para su uso en ese sistema. Las soluciones nebulizables sin propelentes y las formulaciones de polvo inhalable son particularmente preferidas, por ejemplo, las formulaciones en donde el fármaco antifúngico y/o el oligómero de alginato se solubilizan en agua estéril.

65 Tal como se ha indicado anteriormente, una composición preferida de uso en la invención es una composición de desbridamiento que se usa en un proceso de desbridamiento para eliminar un hongo o colonia o población de los

5 mismos, por ejemplo, de un tejido. Normalmente, dicha composición será líquida, pero podrían usarse geles, geles-
soles, o composiciones semisólidas. La composición se puede usar para eliminar el hongo (por ejemplo, mediante
aplicación al tejido infectado bajo presión) y/o se puede usar para bañar el tejido infectado antes, durante y/o después
del desbridamiento por otros medios, tales como medios quirúrgicos, mecánicos o químicos adecuados. El experto
puede formular fácilmente composiciones de desbridamiento.

10 En el caso de un hongo sobre una superficie inanimada o en un material inanimado, el oligómero de alginato y/o el
agente antifúngico se pueden aplicar a la superficie o al material a tratar en cualquier composición o formulación
conveniente, o por cualquier medio conveniente. Por lo tanto, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico puede
estar en forma líquida, gel, gel-sol, semisólida o sólida (p. ej. soluciones, suspensiones, homogeneizados, emulsiones,
15 pastas, polvos, aerosoles, vapores). Normalmente las composiciones para tratar dichas superficies o materiales
inanimados serán una composición no farmacéuticamente aceptable. La elección de la forma de la composición vendrá
dictada por la identidad del hongo sobre la superficie o en el material y localización de la superficie o material. Por
ejemplo, si la localización es una línea de fluido, podría ser conveniente aplicar una composición fluida. También podría
20 ser preferible utilizar una composición que persista en la superficie o en la parte de la línea de fluido que se va a tratar,
pero que no penetre en el fluido de uso normal, por ejemplo, un gel adhesivo. Se considera que las composiciones
pulverizables son muy convenientes, pero las formulaciones líquidas para su uso en inmersiones, lavados y baños
pueden ser más apropiadas en algunas aplicaciones.

25 El experto puede fácilmente preparar composiciones apropiadas a partir de su conocimiento general. Por ejemplo, el
oligómero de alginato y/o agente antifúngico puede añadirse a una formulación de pintura y aplicarse a la superficie
que se va a tratar, por ejemplo, un casco de barco u otra parte de la estructura de un barco que esté expuesta al agua
o a un edificio o cualquier parte del mismo, un tanque (por ejemplo, un tanque de almacenamiento o de procesamiento)
o incluso cualquier parte de cualquier maquinaria industrial. La composición puede ser una solución acuosa y/o
30 alcohólica simple que comprende el agente antifúngico. Si se desea, también se puede incluir un tensioactivo, un poliol
o un aceite para facilitar la humectación o la adhesión. Las composiciones adecuadas también pueden comprender
convenientemente un pesticida adicional (p. ej. un agente antimicrobiano como se ha descrito anteriormente, o un
herbicida, insecticida, miticida/acaricida, molusquicida o nematocida). El antimicrobiano puede ser un antibiótico,
blanqueador de cloro, TCP, etanol, Virkon™, povidona yodada, compuestos de plata, tensioactivos antimicrobianos,
35 triclosán, etc. Como las composiciones no necesitan ser farmacéuticamente aceptables (o incluso fisiológicamente
aceptables en ciertas realizaciones), se pueden usar antimicrobianos y pesticidas duros sujetos a consideraciones de
daño de la superficie, contaminación ambiental, seguridad del usuario y contaminación de la superficie tratada e
interacción con los otros componentes de la composición.

40 De manera análoga, en el caso de un hongo sobre o en una localización biótica no clínica (p. ej. plantas y partes de
las mismas, semillas, frutas, flores y hojas, pieles, cuero, pellejo, lana, madera, algodón, lino, yute, seda, bambú,
corcho, suelo), el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico se pueden aplicar también a la superficie o al material
a tratar en cualquier composición o formulación conveniente, o por cualquier medio conveniente. Por lo tanto, el
oligómero de alginato y/o el agente antifúngico puede estar en forma líquida, gel, gel-sol, semisólida o sólida (p. ej.
45 soluciones, suspensiones, homogeneizados, emulsiones, pastas, polvos, aerosoles, vapores). Normalmente, las
composiciones para tratar tales superficies o materiales bióticos no clínicos serán una composición no
farmacéuticamente aceptable, aunque en el contexto de la aplicación a tejidos vivos (por ejemplo, plantas y partes de
los mismos, tales como semillas, frutas, frutos, flores y hojas), normalmente serán fisiológicamente aceptables porque
la composición no dañará la localización en la que se aplica.

50 La elección de la forma de la composición vendrá dictada por la identidad del hongo sobre la superficie o en el material
y localización de la superficie o material. Se considera que las composiciones pulverizables son muy convenientes,
pero las formulaciones líquidas para su uso en inmersiones, lavados y baños pueden ser más apropiadas en algunas
aplicaciones. También podría preferirse usar una composición que persista sobre la superficie a tratar, por ejemplo,
un gel adhesivo. El experto puede fácilmente preparar composiciones apropiadas a partir de su conocimiento general.
Por ejemplo, las composiciones que contienen el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico de uso en este
55 aspecto de la invención también incluirán normalmente un disolvente, por ejemplo, agua, un alcohol (p. ej. un alcohol
C₁₋₆), o una mezcla de agua/alcohol. Si se desea, también se puede incluir un tensioactivo, un poliol o un aceite para
facilitar la humectación o la adhesión. Las composiciones adecuadas también pueden comprender convenientemente
un pesticida adicional (p. ej. un agente antimicrobiano como se ha descrito anteriormente, o un herbicida, insecticida,
miticida/acaricida, molusquicida o nematocida). Como las composiciones no necesitan ser farmacéuticamente
60 aceptables, se pueden usar antimicrobianos y pesticidas duros sujetos a consideraciones de daño de la superficie,
contaminación ambiental, seguridad del usuario y contaminación de la superficie tratada e interacción con los otros
componentes de la composición. En algunas aplicaciones, se puede requerir una formulación fisiológicamente
aceptable.

65 Las composiciones de uso en la invención se pueden formular para que proporcionen liberación rápida (inmediata),
sostenida o retardada del principio activo después de la administración al sujeto/superficie empleando procedimientos
bien conocidos en la técnica. También se prefieren las composiciones adhesivas. Las formulaciones de liberación
sostenida y/o retardada adhesivas, pueden ser particularmente convenientes, especialmente en aplicaciones donde
se desea la prevención de infección/contaminación, p. ej. en el tratamiento de cultivos, materiales de ingeniería,

semillas y bulbos destinados a plantaciones futuras ("semillas/bulbos guardados"), alimentos y otros productos derivados de plantas y animales para evitar su deterioro.

El contenido relativo del oligómero de alginato y el agente antifúngico en las composiciones de uso en la invención puede variar dependiendo de la dosis requerida y el régimen de dosificación que se siga y esto dependerá del sujeto a tratar y la localización e identidad del hongo, y/o los componentes de la colonia o población que comprende el hongo. Preferentemente, la composición comprenderá una cantidad de oligómero de alginato y una cantidad del agente antifúngico que juntas proporcionarán una inhibición medible del crecimiento del hongo, o población del mismo, al que va dirigido, por ejemplo, el crecimiento (por ejemplo, la replicación) de un hongo, o la tasa del mismo, se reduce en al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 60 %, 70 %, 80 % o 90 %, por ejemplo, al menos un 95 %. Dicho de otra manera, la composición comprenderá una cantidad de oligómero de alginato y una cantidad del agente antifúngico que proporcionarán un tratamiento o prevención medible de la infección por un hongo, al que va dirigido. En ciertas realizaciones, la composición comprenderá una cantidad de oligómero de alginato y una cantidad de agente antifúngico que juntas proporcionarán una reducción medible en la resistencia (o un aumento medible en la susceptibilidad o disminución medible de la tolerancia) al antifúngico que muestra el hongo, por ejemplo, una cantidad del oligómero de alginato que será al menos el doble, al menos el cuádruple, al menos el óctuple, al menos dieciséis o al menos treinta y dos veces la susceptibilidad del hongo, al agente antifúngico.

Preferentemente, la composición o producto comprenderá suficiente oligómero de alginato de modo que después de la administración a un sujeto o aplicación a una localización, la concentración local en la localización objetivo del oligómero será al menos 2 %, preferentemente al menos 4 %, 6 % u 8 % y lo más preferentemente al menos 10 % (en peso por volumen). El agente antifúngico preferentemente estará presente en una cantidad que sea suficiente para proporcionar una concentración local en la localización objetivo de al menos 0,0001 mg/ml, preferentemente al menos 0,001, 0,03125, 0,0625, 0,01, 0,125, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 o 4096 mg/ml. El experto en la materia sabría que las cantidades de oligómero de alginato y/o agente antifúngico pueden reducirse si se sigue o aumenta un régimen de dosificación múltiple para minimizar el número de administraciones o aplicaciones.

Las composiciones y productos de uso en la invención normalmente comprenderán de 1 % a 99 %, de 5 % a 95 %, de 10 % a 90 % o de 25 % a 75 % de oligómero de alginato y de 1 % a 99 %, de 5 % a 95 %, de 10 % a 90 % o de 25 % a 75 % de agente antifúngico, teniendo en cuenta otros ingredientes.

La divulgación proporciona productos susceptibles de contaminación/colonización por hongos cuyas superficies susceptibles han sido pretratadas con un oligómero de alginato y un agente antifúngico como se define en el presente documento.

Por "pretratado" se entiende que la superficie susceptible está expuesta a un oligómero de alginato y/o un agente antifúngico antes de una exposición a un hongo de tal manera que el oligómero de alginato y/o agente antifúngico persiste en la superficie durante un tiempo suficiente para evitar la colonización por un hongo durante un tiempo apreciable. Preferentemente, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico persistirán sustancialmente durante la vida útil de la superficie, por ejemplo, el pretratamiento da como resultado un recubrimiento sustancialmente permanente de un oligómero de alginato y/o un agente antifúngico. Por lo tanto, una superficie/producto pretratado es aquel al que se aplica el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico y sobre el que permanece. Tal producto/superficie puede ser un producto/superficie recubierta y/o impregnada. Preferentemente, un recubrimiento comprenderá una pluralidad, es decir, al menos dos, capas de oligómero de alginato y/o agente antifúngico.

Los ejemplos no limitantes de productos y superficies susceptibles de colonización por hongos se han descrito anteriormente. Se pueden mencionar especialmente los dispositivos médicos (p. ej. tubos endotraqueales o de traqueotomía), maquinaria o equipo de procesamiento, almacenamiento o dispensación de alimentos o bebidas, materiales de construcción (p. ej. madera, productos de madera procesada, madera no procesada, ladrillos, azulejos, placas de escayola, hormigón prefabricado, papel), productos alimenticios, medios de cultivo celular, semillas y bulbos. El pretratamiento puede lograrse por cualquier medio conveniente, por ejemplo, cualquier forma de aplicar el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico a la superficie, en particular recubrimiento de la superficie, por ejemplo, secado por pulverización, recubrimiento del polímero con un polímero que incorpora el oligómero de alginato y/o agente antifúngico, y pintura, barnizado o lacado con formulaciones de pintura, barniz o laca que contienen el oligómero de alginato y/o agente antifúngico. Dicha composición de "recubrimiento" (por ejemplo, una pintura, barniz o laca) que contiene un oligómero de alginato y/o agente antifúngico representa una parte adicional de la divulgación. Como alternativa, el oligómero de alginato y/o el agente antifúngico se pueden incorporar o impregnar en el material a partir del cual se fabrica el objeto o sus partes susceptibles. Este enfoque es adecuado para objetos, o partes constituyentes de los mismos, fabricados a partir de polímeros como plásticos y siliconas, por ejemplo los dispositivos médicos y quirúrgicos y los materiales de construcción descritos anteriormente. Por lo tanto, se contemplan productos que comprenden una superficie inanimada o una superficie biótica no clínica que comprende un oligómero de alginato y/o un agente antifúngico o una composición de recubrimiento, o que incorporan o se impregnan con, un oligómero de alginato y/o agente antifúngico.

Ejemplos no limitativos de tales productos y superficies se han descrito anteriormente. De particular interés son los dispositivos médicos y quirúrgicos. Esto puede incluir cualquier tipo de línea, incluidos los catéteres (por ejemplo,

catéteres venosos centrales y urinarios), dispositivos protésicos, p. ej. válvulas cardíacas, articulaciones artificiales, dientes falsos, coronas dentales, fundas dentales, implantes dentales e implantes de tejidos blandos (por ejemplo, implantes mamarios, de glúteos y labios). Se incluye cualquier tipo de dispositivo médico implantable (o "interno") (por ejemplo, stents, dispositivos intrauterinos, marcapasos, tubos de intubación (por ejemplo, tubos endotraqueales o de traqueotomía), prótesis o dispositivos protésicos, líneas o catéteres).

Otros productos incluyen equipos o superficies de procesamiento, almacenamiento, dispensación o preparación de alimentos, tanques, cintas transportadoras, suelos, drenajes, refrigeradores, congeladores, superficies de equipamiento, paredes, válvulas, correas, tuberías, conductos de aire acondicionado, aparatos de refrigeración, líneas de dispensación de alimentos o bebidas, intercambiadores de calor, cascos de botes o cualquier parte de la estructura de un bote que esté expuesta al agua, conductos de agua de las unidades dentales, conductos de perforación de petróleo, lentes de contacto y estuches, materiales de construcción (p. ej. madera, productos de madera procesada, madera no procesada, ladrillos, azulejos, placas de escayola, hormigón prefabricado, papel), productos alimenticios, medios de cultivo celular, semillas y bulbos.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloques G sobre las concentraciones mínimas inhibitorias de los agentes antifúngicos nistatina y anfotericina B para *Candida albicans*

Materiales y métodos

Los agentes antifúngicos utilizados (nistatina y anfotericina B) eran de calidad farmacéutica y se adquirieron de Sigma Aldrich y USP Reference Standards, respectivamente. Los oligómeros de alginato de bloques G OligoG CF-5/20 (DP 5 a 20, peso molecular medio 2600, 90-95 % de restos G) fueron proporcionados por AlgiPharma AS, Noruega. El caldo Mueller-Hinton usado fue LAB114 de Lab M Limited. El M19 se preparó a nivel interno (peptona (Oxoid) 9,4 g/l; extracto de levadura (Oxoid) 4,7 g/l; extracto de carne (Difco) 2,4 g/l; glucosa (BDH) 10 g/l; el pH se ajusta a 6,1 con HCl antes de la filtración estéril). El agar/caldo YM fue el 271120 de Difco.

La cepa de prueba usada en este Ejemplo es *Candida albicans*, CCUG 39343.

Se realizó un ensayo robótico de la MIC de la siguiente forma. Los OligoG CF-5/20 se disolvieron en medio (caldo Mueller-Hinton o caldo M19 según el experimento) a 1,25 veces las concentraciones de ensayo deseadas (2, 6 y 10%). Los agentes antifúngicos sometidos a prueba se disolvieron en medio sin OligoG CF-5/20 y en medio con OligoG CF-5/20 a una concentración de 1,25 veces las concentraciones de ensayo más altas deseadas. En los experimentos donde se investigaba el efecto de la adición de diferentes concentraciones de Na⁺, se disolvió NaCl en el medio para obtener las concentraciones deseadas (10, 30 y 50 mM).

Se hicieron diluciones en serie de dos veces de agentes antifúngicos en medio con diferentes concentraciones de OligoG CF-5/20, y las soluciones se colocaron en cuatro pocillos paralelos en microplacas Nunc de 384 pocillos (30 µl por pocillo en microplacas Nunc 242757). Se incluyó un grupo de 8 pocillos sin adición de agentes antifúngicos para cada concentración de OligoG CF-5/20 en cada microplaca como referencia de crecimiento. A cada pocillo de las placas de ensayo de 384 pocillos se le añadieron 7,5 ml de medio inoculado con un cultivo de reserva congelado de *Candida albicans* (cepa CCUG 39343).

El cultivo de reserva congelado se preparó cultivando la cepa de *Candida* a 34 °C durante 48h en agar YM. Se cultivaron 1-3 colonias de las placas en 6 ml de caldo YM a 34 °C durante 14h antes de congelar en glicerol al 6 % a -80 °C. Cada lote de cultivo de reserva congelado se caracterizó luego en experimentos de crecimiento separados usando caldo Mueller-Hinton o M19 para determinar la cantidad mínima de inóculo que proporciona un crecimiento satisfactorio después de 48h en las condiciones relevantes para el ensayo de la MIC. Este procedimiento de inoculación se usa para reducir la variación diaria en los bioensayos.

Las microplacas se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron sin agitar a 34 °C. La densidad óptica a 600 nm en los micropocillos se midió después de aproximadamente 13, 18, 24 y 34 horas de incubación, y el rendimiento de crecimiento relativo en cada pocillo se calculó en función del crecimiento en los grupos de referencia. El valor de MIC se ajustó a la concentración más alta, dando menos del 30 % de crecimiento en los 4 pocillos paralelos dentro de los grupos de muestra.

Resultados y análisis

Los resultados observados a las 24 horas de incubación se muestran en la Tabla 1

La capacidad de los OligoG CF-5/20 para potenciar el efecto de la nistatina y la anfotericina B sobre *C. albicans* se investigó en los ensayos MIC. Asimismo, para descartar que el impacto potencial está causado por los iones de Na⁺

presentes en las moléculas de OligoG CF-5/20, también se realizaron ensayos de la MIC con nistatina o anfotericina B en combinación con concentraciones variables de NaCl. La nistatina y la anfotericina B son agentes antifúngicos de polieno que interactúan específicamente con el ergosterol en la membrana celular de la levadura y crean poros en ella. Estos poros pueden facilitar el transporte de componentes retenidos dentro y fuera de la célula. La presencia de iones en exceso podría potencialmente tener un efecto potenciador con los agentes antifúngicos. Las concentraciones de NaCl utilizadas son similares a las observadas en soluciones al 2, 6 y 10 % de OligoG CF-5/20.

La adición de OligoG CF-5/20 conduce a una reducción en los valores de MIC tanto para la nistatina como para la anfotericina B y en ambos medios probados. La reducción es más pronunciada para la anfotericina B en ambos casos, siendo 32x y 16x en M19 y Mueller-Hinton respectivamente cuando se compara 0 y 10 % de bloques G. Los mismos números para la nistatina son 16x y 8x.

En M19 existe un ligero efecto de la adición de NaCl, pero la reducción observada en la MIC es en cada caso menor que la que se obtiene mediante la adición de OligoG CF-5/20 (4x en comparación con 16x-32x). En el caldo Mueller-Hinton, el NaCl no tiene ningún efecto sobre los valores de MIC para ninguno de los agentes antifúngicos. Por lo tanto, estos experimentos muestran claramente que no hay un efecto indirecto de la adición de Na⁺ junto con los OligoG CF-5/20 y las reducciones observadas en los valores de MIC son causadas directamente por OligoG CF-5/20.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración conjunta de oligómeros de alginato de bloques G con los agentes antifúngicos de polieno nistatina y anfotericina B potencia el efecto de estos agentes antifúngicos sobre *C. albicans* en comparación con su administración sola.

Tabla 1. Valores de concentración mínima inhibidora (MIC) (mg/ml) de nistatina y anfotericina B para *Candida albicans* (cepa CCUG 39343), en presencia de varias concentraciones de OligoG CF-5/20 o NaCl determinado después de la incubación durante 24 horas.

OligoG CF 5/20	M19		Mueller-Hinton	
	Nistatina	Anfotericina B	Nistatina	Anfotericina B
0 %	6,4	1,2	3,2	0,15
2 %	1,6	0,3	3,2	0,15
6 %	0,8	0,075	0,8	0,0375
10 %	0,4	0,0375	0,4	0,0094
NaCl	Nistatina	Anfotericina B	Nistatina	Anfotericina B
0 mM	6,4	1,2	6,4	0,15
10 mM	*	0,3	6,4	0,15
30 mM	3,2	0,3	6,4	0,15
NaCl	Nistatina	Anfotericina B	Nistatina	Anfotericina B
50 mM	1,6	0,3	6,4	0,15

*La MIC no se pudo determinar debido a las mediciones irregulares de la OD₆₀₀

Ejemplo 2 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloques G sobre las concentraciones mínimas inhibidoras de los agentes antifúngicos nistatina, fluconazol y terbinafina para varias especies de *Candida* - Cribado robótico

30 Materiales y métodos

En este Ejemplo se utilizó el ensayo robótico descrito en el Ejemplo 1. Las cepas se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (LAB114 de Lab M Limited) y los valores MIC (mg ml⁻¹) se determinaron para cada antifúngico después de la incubación durante 48 h en presencia de 0, 2, 6 y 10 % de fragmentos OligoG CF-5/20 G. Los agentes antifúngicos utilizados (nistatina, fluconazol y terbinafina) fueron de calidad farmacéutica y se adquirieron de Sigma Aldrich. Los fragmentos de OligoG CF-5/20 G fueron proporcionados por AlgiPharma AS, Noruega.

Las cepas de *Candida* utilizadas fueron las siguientes:

- 40 *C. albicans* CCUG 39343 (cepa de la colección de cultivos)
- C. parapsilosis* ATCC 22019T (cepa de la colección de cultivos)
- C. krusei* 141/03 (candidosis)
- C. krusei* 249/03(2) (ulceración)
- C. lusitanae* 994/01(2) (candidosis)

- 5 *C. tropicalis* 12 (vaginal)
- C. tropicalis* 75 (vaginal)
- C. tropicalis* 519468 (urinaria)
- C. tropicalis* 544123 (urinaria)
- C. tropicalis* 250/03 (candidosis)
- C. tropicalis* AG1 (oral)
- C. tropicalis* T2.2 (oral)

10 Las cepas de *Candida* diferentes a *C. albicans* CCUG 39343 y *C. parapsilosis* ATCC 22019T fueron proporcionadas por M. Henriques, University of Minho, Portugal, y los números de referencia usados para estas cepas son denominaciones internas.

Los valores MIC presentados en la Tabla 2 se basan en cuatro experimentos independientes.

15 Resultados y análisis

20 Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los valores de MIC para dos tipos diferentes de agentes antifúngicos (nistatina y fluconazol) para todas las especies y cepas analizadas se redujeron mediante la adición de OligoG CF-5/20. Este estudio destaca el potencial de los oligómeros de alginato de bloques G para potenciar los agentes antifúngicos en una variedad de especies de hongos y clases de antifúngicos.

Tabla 2. Valores de concentración mínima inhibidora (MIC) ($\mu\text{g/ml}$) de nistatina, fluconazol y terbinafina para varias especies de *Candida* y cepas en presencia de diversas concentraciones de OligoG CF-5/20 determinado tras la incubación durante 48 h. Generalmente, la OD600 de los cultivos no restringidos (sin antibióticos añadidos) en este punto temporal estuvieron en el intervalo de 0,4-0,9 indicando un buen crecimiento en las condiciones utilizadas. Los valores MIC presentados se basan en cuatro experimentos independientes.

Antibiótico	% OligoG	<i>C. albicans</i> CCUG 39343	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 ^T	<i>C. krusei</i> 141/03 Candidosis	<i>C. krusei</i> 249/03(2) Ulceración	<i>C. lusitanae</i> 994/01(2) Candidosis	<i>C. tropicalis</i> 12 Vaginal	<i>C. tropicalis</i> 75 Vaginal	<i>C. tropicalis</i> 519468 Urinaria	<i>C. tropicalis</i> 544123 Urinaria	<i>C. tropicalis</i> 250/03 Candidosis	<i>C. tropicalis</i> AG1 Oral	<i>C. tropicalis</i> T2.2 Oral
Nistatina	0	8	4	8	8	8	8	8	16	8	8	8	8
	2	8	2	4	8	8	8	8	8	8	4	8	8
	6	4	1	2	8	2	4	8	4	2	2	4	4
	10	2	0,5	2	4	1	4	2	2	2	1	2	2
Fluconazol	0	16	2	128	8	0,5	1	2	128	1	8	128	>128
	2	16	2	64	4	0,25	1	1	1	1	4	>128	0,5
	6	8	0,5	64	2	<0,125	<0,125	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,25
	10	4	0,25	64	1	<0,125	<0,125	0,25	0,25	0,25	2	<0,125	<0,125
Terbinafina	0	>32	2	>32	4	8	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	2	>32	1	>32	4	4	16	>32	>32	>32	>32	32	>32
	6	>32	2	>32	8	4	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	10	>32	1	>32	4	2	32	>32	>32	>32	>32	>32	32

Ejemplo 3 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloques G sobre las concentraciones mínimas inhibitoras del agente antifúngico fluconazol para varias especies de *Candida* - Prueba de concentración mínima inhibitora estándar

Materiales y métodos

Las cepas de *Candida*, el agente antifúngico (fluconazol) y el OligoG CF-5/20 utilizados en este ejemplo son los mismos que se describen en el Ejemplo 2.

El ensayo de concentración mínima inhibitora utilizado en este Ejemplo se basó en Jorgensen et al. (Manual of Clinical Microbiology, 7ª ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1999; 1526-43). Después de la recuperación del almacenamiento a -80 °C, se cultivaron colonias de hongos en agar sangre con sangre de oveja al 5 % y se usaron para inocular caldo de triptona de soja (TSB) para el crecimiento durante la noche.

Los cultivos fúngicos durante la noche, como se describió anteriormente, se diluyeron en agua estéril hasta que la OD625 estuvo entre 0,08 y 0,10 para confirmar que la densidad celular era equivalente a 0,5 McFarland estándar.

Se prepararon diluciones en serie de dos veces de fluconazol en medio RPMI o medio RPMI con Oligo CF-5/20 al 2 %, 6 % o 10 % y se colocaron en pocillos duplicados de placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (100 µl en cada pocillo).

Los cultivos de hongos a 0,5 McFarland estándar se diluyeron diez veces en medio RPMI y se añadieron 5 ml a los medios que contenían los pocillos de las placas de microtitulación. Las placas se envolvieron en parafilm y se incubaron a 34 °C durante 48 horas. Los valores de MIC se determinaron como la concentración más baja a la que no había crecimiento visible.

Resultados y análisis

Los resultados observados a las 48 horas de incubación se muestran en la Tabla 3.

Los valores MIC para fluconazol en 5 de las 8 cepas ensayadas se redujeron mediante la adición de OligoG CF-5/20. Este estudio destaca el potencial de los oligómeros de alginato de bloques G para potenciar las terapias antifúngicas.

Tabla 3. Valores de concentración mínima inhibitora (MIC) (µg/ml) de fluconazol para varias especies de *Candida* en presencia de varias concentraciones de OligoG CF-5/20 determinado después de la incubación durante 48 h. Los valores MIC presentados se basan en cuatro experimentos independientes.

% OligoG	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 ^T	<i>C. krusei</i> 141/03 Candidosis	<i>C. krusei</i> 249/03(2) Ulceración	<i>C. lusitanae</i> 994/01(2) Candidosis	<i>C. tropicalis</i> 12 Vaginal	<i>C. tropicalis</i> 519468 Urinaria	<i>C. tropicalis</i> 250/03 Candidosis	<i>C. tropicalis</i> AG1 Oral
0	2	128	4	2	128	>256	4	>256
2	2	64	4	2	128	256	4	>256
6	2	64	4	2	4	2	4	>256
10	1	32	4	2	1	1	2	>256

Ejemplo 4 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloques G sobre las concentraciones mínimas inhibitoras de diversos agentes antifúngicos para diversas especies de *Aspergillus* - Cribado robótico

Materiales y métodos

Los agentes antifúngicos utilizados (nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol, fluconazol y terbinafina fueron de calidad farmacéutica y se adquirieron de Sigma Aldrich y USP Reference Standards). Los oligómeros de alginato de bloques G OligoG CF-5/20 G fueron proporcionados por AlgiPharma AS, Noruega. El caldo Mueller-Hinton usado fue LAB114 de Lab M Limited. El agar/caldo YM fue el 271120 de Difco.

Las cepas de hongos utilizadas fueron las siguientes:

Aspergillus niger CCUG 18919 (cepa de la colección de cultivo; arándano)
Aspergillus fumigatus CCUG 17460 (cepa de la colección de cultivo)
Aspergillus flavus CCUG 28296 (cepa de la colección de cultivo; suela de zapato)

5 *Aspergillus sp.* se cultivó a 30 °C durante 96h en agar YM. Las esporas y el micelio aéreo se cortaron del agar, se suspendieron en 1 ml de caldo YM y se dispersaron con perlas de vidrio (1 mm) en una batidora de miniesferas durante 2 min. Se añadió glicerol a la suspensión a 10 % y se congeló a -80 °C.

10 Cada lote de cultivo de reserva se caracterizó a continuación en experimentos de crecimiento separados usando caldo Mueller-Hinton para determinar la cantidad mínima de inóculo que proporciona un crecimiento satisfactorio después de 48 h en las condiciones relevantes para el ensayo MIC. Este procedimiento de inoculación se usa para reducir la variación diaria en los bioensayos.

15 El ensayo robótico de concentración mínima inhibidora (MIC) se realizó de la siguiente manera. Los OligoG CF-5/20 se disolvieron en medio (caldo Mueller-Hinton) a 1,25 veces las concentraciones de ensayo deseadas (2, 6 y 10 %). Los agentes antifúngicos se disolvieron en medio sin OligoG CF-5/20 y en medio con OligoG CF-5/20 a una concentración de 1,25 veces las concentraciones de ensayo más altas deseadas.

20 Se hicieron diluciones en serie de dos veces de agentes antifúngicos en medio con diferentes concentraciones de OligoG CF-5/20, y las soluciones se colocaron en cuatro pocillos paralelos en microplacas Nunc de 384 pocillos (30 µl por pocillo en microplacas Nunc 242757). Se incluyó un grupo de 8 pocillos sin adición de agentes antifúngicos para cada concentración de OligoG CF-5/20 en cada microplaca como referencia de crecimiento. A cada pocillo de las placas de ensayo de 384 pocillos se le añadieron 7,5 ml del medio MH inoculado con un cultivo de reserva congelado de las cepas relevantes.

25 Las microplacas se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron sin agitar a 34 °C. La densidad óptica a 600 nm en los micropocillos se midió después de aproximadamente 24 y 48 horas de incubación. El valor de MIC se ajustó a la concentración más alta, dando menos del 30 % de crecimiento en los 4 pocillos paralelos dentro de los grupos de muestra.

30 Resultados y análisis

Los resultados observados a las 48 horas de incubación se muestran en la Tabla 4

35 La capacidad de los OligoG CF-5/20 para potenciar el efecto de los agentes antifúngicos de diferentes clases, es decir, los antifúngicos polienos (nistatina y anfotericina B), los antifúngicos azoles (fluconazol, miconazol, voriconazol) y los antifúngicos alilaminas (terbinafina) sobre varias especies de *Aspergillus* se investigó en ensayos de MIC.

40 La adición de OligoG CF-5/20 conduce a una reducción en los valores MIC de nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol y terbinafina para todas las especies de *Aspergillus* analizadas. Los OligoG CF-5/20 pudieron reducir los valores MIC de fluconazol para una de las especies de *Aspergillus* probadas (*Aspergillus flavus*).

45 Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración conjunta de oligómeros de alginato de bloques G puede potenciar el efecto de diferentes tipos de agentes antifúngicos. En combinación con los resultados de los otros Ejemplos, se puede ver que este efecto de potenciación también se observa en diferentes especies y géneros de hongos.

50 Tabla 4. Valores de concentración mínima inhibidora (MIC) (mg/ml) de nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol, fluconazol y terbinafina para varias especies de *Aspergillus* en presencia de diversas concentraciones de OligoG CF-5/20 determinado tras la incubación durante 48 horas.

Antibiótico	% OligoG	<i>A. niger</i> CCUG 18919	<i>A. fumigatus</i> CCUG 17460	<i>A. flavus</i> CCUG 23451
Nistatina	0	8	8	8
	2	4	8	8
	6	2	4	4
	10	0,5	2	2

(continuación)

Antibiótico	% OligoG	A. niger CCUG 18919	A. fumigatus CCUG 17460	A. flavus CCUG 23451
Anfotericina B	0	0,1875	0,75	0,75
	2	0,1875	0,375	0,375
	6	0,09375	0,375	0,375
	10	0,046875	0,1875	0,1875
Fluconazol	0	>128	>128	64
	2	>128	>128	64
	6	>128	128	32
	10	128	128	32
Miconazol	0	1	4	1
	2	0,5	2	0,25
	6	0,25	2	0,25
	10	0,25	2	0,25
Voriconazol	0	0,25	0,125	0,0625
	2	0,0625	0,125	0,0625
	6	<0,03125	0,0625	<0,03125
	10	<0,03125	<0,03125	<0,03125
Terbinafina	0	0,5	4	0,125
	2	0,25	4	0,0625
	6	0,0625	4	<0,03125
	10	0,125	2	<0,03125

Ejemplo 5 - Efectos del bromuro de ipratropio, salbutamol, budesonida y formoterol sobre las concentraciones mínimas inhibitoras de combinaciones de nistatina/anfotericina B y oligómeros de alginato de bloques G para *Candida albicans*.

5

Materiales y métodos

En este Ejemplo se utilizó el ensayo robótico descrito en el Ejemplo 1. Adicionalmente, los medicamentos solubles en agua para el asma/EPOC, bromuro de ipratropio monohidratado, salbutamol y budesonida se disolvieron en caldo Mueller-Hinton con y sin OligoG CF-5/20, y con o sin agentes antifúngicos para obtener las concentraciones deseadas. El fumarato de formoterol dihidratado, que es insoluble en agua, se disolvió en DMSO y se añadió directamente a las placas de 384 pocillos. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue del 2 %, lo que no influye significativamente en el crecimiento del organismo indicador. La concentración utilizada para los diferentes componentes se basó en información de Manocha et al. (2006). El bromuro de ipratropio monohidratado, el salbutamol, la budesonida y el fumarato de formoterol dihidratado eran todos de calidad farmacéutica y se obtuvieron de Sigma Aldrich.

15

Resultados y análisis

Para probar si representantes seleccionados de medicamentos para el asma/EPOC comúnmente utilizados podrían tener un impacto en los valores de MIC de las combinaciones de nistatina/anfotericina B y oligómeros de alginato de bloques G para *Candida albicans*, se determinó el efecto de la adición de estos medicamentos en el ensayo MIC descrito en el Ejemplo 1. En este ensayo solo se usó el caldo Mueller-Hinton ya que este es el medio especificado para los ensayos de MIC estandarizados (Jorgensen et al., 1999).

25

El bromuro de ipratropio y el salbutamol son solubles en agua y se usaron a 0,01 y 1 mM en los ensayos, mientras que la budesonida tiene una solubilidad limitada en agua y se usó solo a 0,01 mM. El formoterol es insoluble en agua y, por lo tanto, se disolvió en DMSO y luego se agregó directamente a las placas de ensayo a una concentración final de 0,5 mM. Esto dio como resultado un contenido final de DMSO del 2 %.

30

Los resultados observados a las 24 horas de incubación se muestran en la Tabla 5.

5 Los resultados de los ensayos muestran una reducción en los valores de MIC de 4x tanto para la nistatina como para la anfotericina B mediante la adición de 10 % de OligoG CF-5/20 en comparación con sin OligoG CF-5/20. Esta es una reducción menor que la obtenida en los experimentos iniciales (Tabla 5), y los valores absolutos de MIC también son ligeramente diferentes. La razón de estas desviaciones no se conoce. Sin embargo, la tendencia en OligoG CF-5/20 a aumentar el efecto de ambos agentes antifúngicos es clara.

10 Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que el bromuro de ipratropio (anticolinérgico) y salbutamol (agonista beta-2 de acción rápida) a 0.01 mM y 1 mM, y budesonida (corticosteroide) a 0,01 mM y formoterol (agonista beta-2 de acción prolongada) a 0,5 mM no influyen significativamente en los valores de MIC de nistatina o anfotericina B en combinación con OligoG CF5/20 para *C. albicans*. Cuando se producen variaciones en los valores de MIC mediante la adición de uno de estos cuatro compuestos, generalmente es un factor de dos el que está dentro de la resolución del ensayo (los agentes antifúngicos se usaron en diluciones en serie de dos veces).

15 Este estudio indica que ninguno de estos compuestos influye en los efectos potenciadores antifúngicos de los oligómeros de alginato de bloques G. La adición de bromuro de ipratropio, salbutamol, budesonida y formoterol a las concentraciones dadas no afectó al crecimiento de *C. albicans* (datos no mostrados).

Tabla 5. Valores de MIC ($\mu\text{g/ml}$) de nistatina y anfotericina B en combinación con OligoG CF-5/20 y bromuro de ipratropio, salbutamol, budesonida o formoterol para *Candida albicans* en caldo Mueller-Hinton a las 24 horas.

Anfotericina B Formoterol 0,5 mM	0,0469	0,0469	0,0469	0,0117
Anfotericina B Budesonida 0,01 mM	0,0938	0,0938	0,0469	0,0469
Anfotericina B Salbutamol 1 mM	0,0469	0,0469	0,0234	0,0117
Anfotericina B Salbutamol 0,01 mM	0,0469	0,0469	0,0234	0,0117
Anfotericina B Bromuro de ipratropio 1 mM	0,1875	0,0938	0,0469	0,0234
Anfotericina B Bromuro de ipratropio 0,01 mM	0,0938	0,0469	0,0234	0,0117
Anfotericina B	0,0938	0,0938	0,0469	0,0234
Nistatina Formoterlo 0,5 mM	2	2	1	0,5
Nistatina Budesonida 0,01 mM	4	4	2	1
Nistatina Salbutamol 1 mM	2	2	1	0,25
Nistatina Salbutamol 0,01 mM	4	2	1	0,25
Nistatina Bromuro de ipratropio 1 mM	4	2	0,5	0,25
Nistatina Bromuro de ipratropio 0,01 mM	4	2	1	0,25
Nistatina	2	2	1	0,5
Bloques G	0 %	2 %	6 %	10 %

Ejemplo 6 - Efecto de los oligómeros de alginato de bloques G sobre las concentraciones mínimas inhibitoras de diversos agentes antifúngicos para *Cryptococcus neoformans*. - Cribado robótico

Materiales y métodos

Los agentes antifúngicos utilizados (nistatina, anfotericina B, miconazol y fluconazol fueron de calidad farmacéutica y se adquirieron de Sigma Aldrich y USP Reference Standards). Los oligómeros de alginato de bloques G OligoG CF-5/20 G fueron proporcionados por AlgiPharma AS, Noruega. El caldo Mueller-Hinton usado fue LAB114 de Lab M Limited. El agar/caldo YM fue el 271120 de Difco. Los medios Sabouraud se prepararon a nivel interno (glucosa, 20 g/l; triptona, 5 g/l; peptona, 5 g/l). El RPMI era de Sigma y se suplementó con glucosa al 2 %.

Las cepas de hongos utilizadas fueron las siguientes:
Cryptococcus neoformans CCUG 23451 (líquido cefalorraquídeo humano)

Cryptococcus sp. se cultivó a 30 °C durante 96h en agar YM. Las esporas y el micelio aéreo se cortaron del agar, se suspendieron en 1 ml de caldo YM y se dispersaron con perlas de vidrio (1 mm) en una batidora de miniperlas durante 2 min. A la suspensión se añadió glicerol al 10 % y se congeló a -80 °C. Cada lote de cultivo de reserva congelado se caracterizó a continuación en experimentos de crecimiento separados usando caldo Mueller-Hinton y RPMI para determinar la cantidad mínima de inóculo que proporciona un crecimiento satisfactorio después de 48h en las condiciones relevantes para el ensayo MIC. Este procedimiento de inoculación se usa para reducir la variación diaria en los bioensayos.

El ensayo robótico de concentración mínima inhibitora (MIC) se realizó de la siguiente manera. El OligoG CF-5/20 se disolvió en medio (Mueller-Hinton, RPMI con glucosa al 2 %, Sabouraud o YM) hasta 1,25 veces las concentraciones de ensayo deseadas (2, 6 y 10 %). Los agentes antifúngicos se disolvieron en medio sin OligoG CF-5/20 y en medio con OligoG CF-5/20 a una concentración de 1,25 veces las concentraciones de ensayo más altas deseadas.

Se hicieron diluciones en serie de dos veces de agentes antifúngicos en medio con diferentes concentraciones de OligoG CF-5/20, y las soluciones se colocaron en cuatro pocillos paralelos en microplacas Nunc de 384 pocillos (30 µl por pocillo en microplacas Nunc 242757). Se incluyó un grupo de 8 pocillos sin adición de agentes antifúngicos para cada concentración de OligoG CF-5/20 en cada microplaca como referencia de crecimiento. A cada pocillo de las placas de ensayo de 384 pocillos se le añadieron 7,5 ml del medio inoculado con un cultivo de reserva congelado de las cepas relevantes.

Las microplacas se colocaron en bolsas de plástico y se incubaron sin agitar a 34 °C. La densidad óptica a 600 nm en los micropocillos se midió después de ciertos puntos temporales desde 24h hasta 96h de incubación. El valor de MIC se ajustó a la concentración más alta, dando menos del 30 % de crecimiento en los 4 pocillos paralelos dentro de los grupos de muestra.

Resultados y análisis

La capacidad de los OligoG CF-5/20 para potenciar el efecto de los agentes antifúngicos de diferentes clases, es decir, los antifúngicos polienos (nistatina y anfotericina B) y los antifúngicos azoles (fluconazol y miconazol) sobre *Cryptococcus neoformans* fue investigado en ensayos de MIC.

Los resultados observados a las 72 horas de incubación se muestran en la Tabla 6 y los resultados observados a las 96 horas de incubación se muestran en la Tabla 7. En el análisis de estos resultados, deben tenerse en cuenta los siguientes puntos. En los medios MH y YM, el crecimiento de *C. neoformans* es tan bajo cuando se agrega OligoG al 6 % y 10 % que no se puede determinar la MIC. En medio de Sabouraud, el crecimiento es demasiado bajo con OligoG al 10 % para determinar la MIC. En RPMI con glucosa al 2 % el crecimiento es aceptable; sin embargo, las precipitaciones en el medio cuando se combina OligoG al 10 % con algunos de los agentes antifúngicos perturban las lecturas de MIC a las concentraciones más altas de OligoG utilizadas y en estos casos no se pudo determinar la MIC.

Para la anfotericina B hay una reducción en la MIC en todos los medios probados cuando se agrega OligoG al medio. Para la nistatina hay una reducción en la MIC en todos los medios probados cuando se agrega OligoG al medio. Para el fluconazol hay una reducción en la MIC en todos los medios probados cuando se agrega OligoG al medio. Para el miconazol hay una reducción en la MIC en RPMI con glucosa y en medio MH cuando se agrega OligoG al medio. En general, estos datos muestran que la adición de OligoG CF-5/20 conduce a una reducción en los valores MIC de nistatina, anfotericina B, miconazol y fluconazol en *Cryptococcus neoformans*.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la administración conjunta de oligómeros de alginato de bloques G puede potenciar el efecto de diferentes tipos de agentes antifúngicos sobre *Cryptococcus neoformans*. En combinación con los resultados de los otros Ejemplos, se puede ver que este efecto de potenciación también se observa en diferentes especies y géneros de hongos.

Tabla 6. Valores de concentración mínima inhibidora (MIC) (mg/ml) de nistatina, anfotericina B, miconazol y fluconazol para *Cryptococcus neoformans* CCUG 23451 en presencia de diferentes concentraciones de OligoG CF-5/20 después de la incubación durante 72 horas. NG, sin crecimiento; ND, no determinado.

Agente antifúngico	%OligoG	Medio			
		RPMI 2 % GLU	MH	Sabouraud	YM
Anfotericina B	0	>1,5	NG	0,1875	>1,5
	2	1,5	NG	0,09375	1,5
	6	0,75	NG	0,01171875	NG
	10	ND	NG	NG	NG
Miconazol	0	4	NG	<0,015625	0,5
	2	2	NG	0,0625	0,5
	6	0,5	NG	0,0078125	NG
	10	ND	NG	NG	NG
Fluconazol	0	2	NG	1	1
	2	1	NG	0,5	0,5
	6	0,5	NG	0,5	NG
	10	ND	NG	NG	NG
Nistatina	0	8	NG	2	8
	2	8	NG	0,5	4
	6	4	NG	0,25	NG
	10	ND	NG	NG	NG

5 Tabla 7. Valores de concentración mínima inhibidora (MIC) (mg/ml) de nistatina, anfotericina B, miconazol y fluconazol para *Cryptococcus neoformans* CCUG 23451 en presencia de diferentes concentraciones de OligoG CF-5/20 después de la incubación durante 96 horas. NG, sin crecimiento; ND, no determinado.

Agente antifúngico	% OligoG	Medio			
		2 % GLU	MH	Sabouraud	YM
Anfotericina B	0	>1,5	1,5	0,375	>1,5
	2	>1,5	0,1875	0,09375	1,5
	6	1,5	NG	0,0234	NG
	10	0,75	NG	NG	NG
Miconazol	0	4	1	0,0625	0,5
	2	2	0,125	0,25	1
	6	1	NG	0,5	NG
	10	ND	NG	NG	NG
Fluconazol	0	2	2	1	1
	2	1	0,5	0,5	1
	6	1	NG	0,5	NG
	10	1	NG	NG	NG
Nistatina	0	8	4	2	16
	2	8	1	0,5	8
	6	8	NG	0,25	NG
	10	ND	NG	NG	NG

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para combatir la colonización de un sitio con un hongo, que no está en una biopelícula, comprendiendo dicho método poner en contacto el sitio y/o el hongo, que no está en una biopelícula, con un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G junto con al menos un agente antifúngico, en donde
- 5
- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
 - (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
 - (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
 - (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
 - (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol, voriconazol o terbinafina; o
 - (vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,
- 10
- 15
- y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.
- 20
2. Un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G para usar junto con al menos un agente antifúngico en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, en donde el hongo no está en una biopelícula, en donde
- 25
- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
 - (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
 - (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
 - (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
 - (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol, voriconazol o terbinafina; o
 - (vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,
- 30
- 35
- y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.
- 40
3. Un producto que contiene un oligómero de alginato de 2 a 50 restos de monómeros de los cuales al menos el 80 % son restos G y un agente antifúngico como una preparación combinada para el uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un sujeto infectado, sospechoso de estar infectado o en riesgo de infección, con un hongo, en donde el hongo no está en una biopelícula, en donde
- 45
- (i) dicho hongo es *Candida albicans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B o fluconazol;
 - (ii) dicho hongo es *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* o *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es nistatina o fluconazol;
 - (iii) dicho hongo es *Candida lusitanae* y dicho agente antifúngico es terbinafina;
 - (iv) dicho hongo es *Aspergillus niger* o *Aspergillus fumigatus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol, voriconazol o terbinafina;
 - (v) dicho hongo es *Aspergillus flavus* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, fluconazol, miconazol, voriconazol o terbinafina; o
 - (vi) dicho hongo es *Cryptococcus neoformans* y dicho agente antifúngico es nistatina, anfotericina B, miconazol o fluconazol,
- 50
- 55
- y en donde la eficacia de dicho agente antifúngico para inhibir el crecimiento y/o la viabilidad de dicho hongo, cuando no está en una biopelícula, aumenta.
- 60
4. El oligómero de alginato de la reivindicación 2 o el producto de la reivindicación 3, en donde la infección con un hongo que no está en una biopelícula es de una superficie del cuerpo interna o externa seleccionada de una superficie en la cavidad oral, el tracto reproductor, el tracto urinario, el tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal, el peritoneo, el oído medio, la próstata, íntima vascular, el ojo, incluyendo la conjuntiva o el tejido corneal, tejido pulmonar, válvulas cardíacas, la piel, el cuero cabelludo, uñas, el interior de las heridas o la superficie del tejido suprarrenal, hepático, renal, pancreático, hipofisario, tiroideo, inmunitario, ovárico, testicular, prostático, endometrial, ocular, mamario, adiposo, epitelial, endotelial, neuronal, muscular, pulmonar, epidermis y tejido óseo, o en un fluido corporal seleccionado de sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, contenido del tracto GI, esputo, secreciones
- 65

pulmonares y semen, o en o sobre un tejido corporal seleccionado de tejido suprarrenal, hepático, renal, pancreático, hipofisario, tiroideo, inmunitario, ovárico, testicular, prostático, endometrial, ocular, mamario, adiposo, epitelial, endotelial, neuronal, muscular, pulmonar, epidermis y tejido óseo.

- 5 5. El oligómero de alginato o producto de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el sujeto es un sujeto con una infección preestablecida, un sujeto inmunocomprometido, un sujeto en cuidados intensivos o críticos, un sujeto que padece un traumatismo, un sujeto con una quemadura, un sujeto con una herida aguda y/o crónica, un sujeto neonatal, un sujeto de edad avanzada, un sujeto con cáncer, un sujeto con malnutrición, un sujeto alcohólico, un sujeto que padece una afección autoinmunitaria, un sujeto con secreción epitelial o endotelial reducida o anulada y/o
- 10 eliminación de la secreción, un sujeto que está recibiendo o se está recuperando de un tratamiento con antibióticos, un sujeto que está recibiendo o se está recuperando de un tratamiento con esteroides o un sujeto portador de un dispositivo médico.
- 15 6. El oligómero de alginato o producto de la reivindicación 5, en donde el sujeto se selecciona entre
- (i) un sujeto con una afección seleccionada entre VIH, septicemia, choque séptico, SIDA, un cáncer del sistema inmunitario, artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Crohn, EPOC, COAD, COAP, bronquitis, fibrosis quística, enfisema, cáncer de pulmón, asma, neumonía o sinusitis,
 - 20 (ii) un sujeto que se está preparando, recibiendo o se está recuperando de la quimioterapia y/o radioterapia, un sujeto que recibe un trasplante de órganos,
 - (iv) un sujeto residente en una institución de salud,
 - (v) un fumador, o
 - (vi) un sujeto con una afección o una enfermedad respiratoria.
- 25 7. El método de la reivindicación 1, en donde el hongo que no está en una biopelícula está sobre una superficie seleccionada de superficies de maquinaria o equipo de procesamiento, preparación, almacenamiento o dispensación de alimentos o bebidas, superficies de aparatos de aire acondicionado, superficies de maquinaria industrial, superficies de tanques de almacenamiento, superficies de equipos médicos o quirúrgicos, superficies de equipos acuáticos/marinos o las superficies de edificios y otras estructuras.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en donde la superficie se selecciona de equipos o superficies de procesamiento, almacenamiento, dispensación o preparación de alimentos, tanques, cintas transportadoras, suelos, drenajes, refrigeradores, congeladores, superficies de equipamiento, paredes, válvulas, correas, tuberías, conductos de aire acondicionado, aparatos de refrigeración, líneas de dispensación de alimentos o bebidas, intercambiadores de calor, cascos de barcos, conductos de agua de las unidades dentales, conductos de perforación de petróleo, lentes de contacto, estuches de lentes de contacto, catéteres, dispositivos protésicos o dispositivos médicos implantables.
- 35 9. El método de la reivindicación 1, en donde el hongo que no está en una biopelícula está en un material seleccionado de residuos clínicos/científicos, suelo, abono, productos animales y vegetales, alimentos para animales o seres humanos, productos de higiene personal, cosméticos, suministros de agua potable, suministros de aguas residuales, suministros agrícolas y suministros de agua, formulaciones insecticidas, formulaciones pesticidas, formulaciones herbicidas, lubricantes industriales, materiales de ingeniería, medios de cultivo celular y de tejidos, cultivos celulares y de tejidos, medios de cultivo vegetal y cultivos vegetales.
- 40 10. El método, el oligómero de alginato o producto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el oligómero de alginato tiene un grado medio de polimerización en número de 2 a 35, de 2 a 30, de 2 a 25 o de 2 a 20.
- 45 11. El método, el oligómero de alginato o producto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el oligómero de alginato tiene de 2 a 35 restos, de 2 a 30 restos, de 3 a 35 restos, de 3 a 28 restos, de 4 a 25 restos, de 5 a 20 restos, de 6 a 22 restos, de 8 a 20 restos o de 10 a 15 restos.
- 50 12. El método, el oligómero de alginato o producto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el oligómero de alginato tiene al menos 90 % o al menos 95 % de restos G.
- 55 13. El método, el oligómero de alginato o producto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde al menos el 80 % de los restos G están dispuestos en bloques G.