



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-34897

54. TÍTULO Una composición y método de tratamiento
para condiciones urogenitales.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL AG1 K.38/08, A61P13/00,
15/00, 31/00

71. SOLICITANTE Zengen, Inc.

DOMICILIO Woodland Hills, California USA.

74. APODERADO D.ña Maria Rodriguez D'Alenun

22. BOGOTÁ, D. C., Abril 10/06.

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10 04 2006

1) SOLICITUD DE			
☒ Patente de invencion		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capitulo I		☐ Capitulo II	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre ZENGEN, INC Dirección 6429 Independence Avenue, Woodland Hills, CA 91367 USA Nacionalidad o domicilio Woodland Hills, CA, USA Lugar de constitución CA, USA Telefono Fax E Mail	IDENTIFICACION CC ☐ NIT ☐ CE ☐ OTRO ☐ Cual NUMERO	
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre DILIA MARIA RODRIGUEZ D ALEMAN Dirección Carrera 11 N 86 53 Piso 6 Bogota D C Telefono 6181088 Fax 6350824 E Mail info@clarkemodet.com.co	IDENTIFICACION CC ☒ NIT ☐ CE ☐ OTRO ☐ NUMERO 41 654 882 TP. 20824 CSJ	
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre 1 CATANIA, Anna P, 2 LIPTON, James, M Dirección 1 15 Corso Italia 1 20122 Milan Italia, 2 #10,5800 Ownesmouth Ave, Woodland Hills, CA 91367 USA Nacionalidad o Domicilio 1 Italiano, 2 Estadounidense		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No PCT/US2004/029322 Fecha Sept 8 2004 Publicación Internacional No WO2005/025503 A2 Fecha MARZO 24 2005			
6) Titulo (54) UNA COMPOSICION Y METODO DE TRATAMIENTO PARA CONDICIONES UROGENITALES			
7) Clasificación Internacional A61K 38/08 A61P 13/00, 15/00, 31/00			
8) PRIORIDAD		33) Pais de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		ESTADOS UNIDOS	SEPT 8 2003
		(31) Numero de Solicitud 10/659 053	
9) Comprobante de pago N° 06 14,117 Fecha Feb 20, 2006			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario Ver reverso de esta pagina			

28

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-034897 00000-0000 Fea: 2006-04-10 17 15:36
Dep 2020 NUECREACIONES
Tra 11 PATENTEMII Eva 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089 2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 06 14,117
FECHA FEBRERO 20 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
CLARKE MODET Y CO	COLOMBCONSIGNACION	BANCO POPULAR	0 0 00110 6	49043310	20/02/2006	6,658,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005 01 01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	463,000 00
		TOTAL	\$ 463,000 00

SON CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE _____

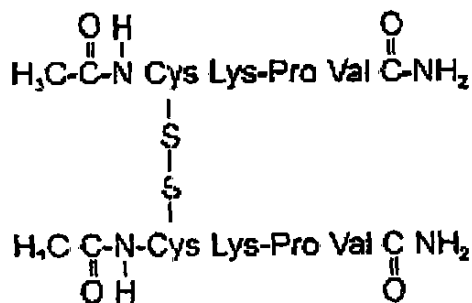
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
☐ Poderes si fuera el caso
☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
☐ Declaraciones
☒ Copia de la solicitud Internacional (Resumen descripción reivindicación Dibujos)
☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen descripción reivindicación Dibujos)
☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
☐ De ser el caso copia del contrato de acceso
☐ De ser el caso documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
☐ De ser el caso certificado de depósito del material biológico
☒ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
☐ De ser el caso información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
☒ Otros
- 1 Reporte internacional de búsqueda
 - 2 Notificación de la transmisión de el reporte internacional de búsqueda
 - 3 Opinión escrita ISA

11) FIGURA CARACTERÍSTICA



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE DILIA RODRIGUEZ D ALEMAN

FIRMA

C C 41 654 882 de Bogota TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario Ver reverso de esta pagina

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(43) International Publication Date
24 March 2005 (24.03 2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/025503 A2

(51) International Patent Classification⁷ A61K

(21) International Application Number
PCT/US2004/079322

(22) International Filing Date
8 September 2004 (08.09 2004)

(25) Filing Language English

(26) Publication Language English

(30) Priority Data
10/659 053 8 September 2003 (08.09 2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US) ZEN
CEN INC. [US/US] 6429 Independence Avenue Wood
land Hills CA 91367 (US)

(72) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only) CATANIA Anna
P [IT/IT] 15 Corso Italia 1 20122 Milan (IT) LIPTON
James, M [US/US] #10 5800 Owensmouth Ave Wood
land Hills CA 91367 (US)

(74) Agent PERKINS COIE LLP Michael J Wis David P
Devlin 10 Box 1208 Seattle WA 98111 1208 (US)

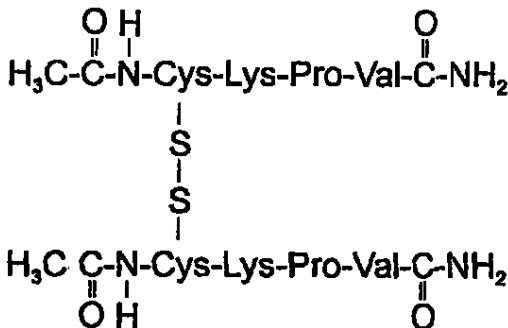
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available) AE AG AL AM
AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH CN
CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI
GB GD GL GH GM HR HU ID IL IN IS JP KI
KG KP KR KZ LC LK LR LS LI LU LV MA MD
MG MK MN MW MX MZ NA NI NO NZ OM PG
PI PT RO RU SC SD SE SG SK SI SY TJ TM
TN TR TT TZ UA UC US UZ VC VN YU ZA ZM
ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available) ARIPO (BW CH
CM KE LS MW MZ NA SD SI SZ TZ UG ZM
ZW) Eurasian (AM AZ BY KC KZ MD RU TJ TM)
European (AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI
FR GB GR HU IE IT LU MC NL PL PT RO SE SI
SK TR) OAPI (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ
GW ML MR NE SN TD TG)

Published
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations refer to the
Guidance Notes on Codes and Abbreviations appearing at the begin
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title A COMPOSITION AND METHOD OF TREATMENT FOR UROGENITAL CONDITIONS



(57) Abstract The present invention is directed to a
composition and method for treating uro genital conditions. On
embodiment disclosed is a pharmaceutical composition for use in
the treatment of uro genital conditions wherein said composition
comprises a KPV dimer a first preservative agent, a solvent an
alkalizer an acrylic acid based polymer a second preservative
agent and a gelatinizing agent. Another embodiment of th
invention is disclosed wherein the composition comprises C.KPV
(SEQ ID NO 5) dimer API Carbopol(r) NF propylparaben
NF methylparaben NI propylene glycol USP edetic acid
(EDTA) USP 2 M sodium hydroxide solution (NaOH) and
sterile water for injection USP Also disclosed are methods and
indications for use of the disclosed composition.

Xn
5

A COMPOSITION AND METHOD OF TREATMENT FOR UROGENITAL CONDITIONS

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] The present application is a Continuation in Part of U S Patent Application Serial No 09/535 066 filed March 23 2000 which claims priority to U S Provisional Application Serial No 60/126 233 filed March 24 1999 The present application is also a Continuation in Part of U S Patent Application Serial No 10/442 683 filed May 21 2003 which claims priority to U S Provisional Application Serial No 60/382 887 filed May 21 2002 all of which are fully incorporated by reference including drawings as if fully set forth herein

TECHNICAL FIELD OF INVENTION

[0002] The present invention relate to the field of treatment for urogenital conditions

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Uro genital conditions or diseases commonly affect both men and women These conditions include infections and/or inflammation of the urinary system and the genital system For example according to the National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) most women will have at least one form of vaginitis in their lifetime Vaginitis *National Institute of Child Health and Human Development Publications On line* www.nichd.nih.gov/publications/pubs/vag1.htm The causes for vaginitis range from bacterial fungal or viral infections to irritations from chemicals in creams sprays or even clothing that are in contact with this area

67

Id For women with bacterial and fungal infections these infectious agents often originate from the rectal area and migrate across the perineum to reach the vagina or the urethra

[0004] A common type of vaginitis is candidiasis or yeast infection that is most commonly caused by *Candida albicans*. The *Candida* species are part of an individual's normal flora of microbial organisms present in skin, mouth, and the gastrointestinal tract. *Robbins Pathologic Basis of Disease 5th ed* Saunders Co Philadelphia (1994) p. 354. They also live in small numbers in a woman's vagina. They grow best in warm, moist surfaces such as the vagina or the oral cavity. They are normally non-pathogenic, but when a change in their environment occurs, such as in response to a woman's hormonal changes in menopause, pregnancy, or in response to stress, they can overgrow to cause a yeast infection. These changes can also occur in immunosuppressed or compromised individuals such as people undergoing chemotherapy, taking immunosuppressants, or afflicted with AIDS.

[0005] Current treatment for candidiasis includes over-the-counter drugs with active ingredients such as butoconazole nitrate (Femstat[®]), clotrimazole (Gyne Lotrimin[®] and others), miconazole (Monistat[®] and others), and tioconazole (Vagistat[®]). These drugs are topically applied in the vagina and break down *Candida*'s cell wall. Other similar treatments include prescription drugs with active ingredients in the same family such as fluconazole (Diflucan[®]), terconazole (Terazol[®]), and ketoconazole (Nizoral[®]).

[0006] Although vaginitis has been commonly associated with *Candida*, bacterial vaginosis is actually the most common vaginal infection in women of reproductive age according to the NICHD. Vaginitis *supra*. Overgrowing of bacteria in the vagina

§
7

causes bacterial vaginosis much like *Candida* but the drugs used for its treatment are different

[0007] On the other hand men can also contract *Candida* infections on their penis involving the glans and the prepuce. Balanoposthitis a nonspecific infection of the glans and prepuce is caused by a wide variety of organisms including fungi such as *Candida* and pyogenic bacteria such as *Staphylococci Sp*. Robbins Pathologic Basis of Disease 5th ed Saunders Co Philadelphia (1994) p 1008

[0008] *Staphylococci* are gram positive bacteria that are normally present in skin and other mucosal membranes of the body. *Staphylococcus aureus* in particular is a virulent pathogen that causes a myriad of conditions and diseases stemming from skin lesions endocarditis respiratory infection food poisoning and toxic shock syndrome. For women using highly absorbent tampons it is known that *S. aureus* can colonize the vagina and secrete a toxin called toxic shock syndrome toxin (TSST 1). According to the Food and Drug Administration approximately half of the toxic shock syndrome cases reported today are associated with tampon use during menstruation and usually in young women. Tampons and Asbestos, Dioxin, & Toxic Shock Syndrome, FDA Center for Devices and Radiological Health (July 23 1999) www.fda.gov/cdrh/ocd/tamponsabs.html

[0009] *S. aureus* infections are commonly treated with methicillin. Although it is very effective some strains of *S. aureus* have developed resistance to methicillin and only a few antibiotics can successfully treat methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. One of these antibiotics commonly used for MRSA is vancomycin. A strain of *S. aureus* however with reduced susceptibility to vancomycin (VISA) has already been identified. Khurshid M A et al Staphylococcus aureus with Reduced Susceptibility to Vancomycin – Illinois. 1999



first identified. Identification requires time but more so requires a gynecological examination for women to determine the specific infectious agents or lack thereof.

[0013] With the increased use of antibiotics and other drugs, microorganisms such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* are increasingly developing resistance to currently available drugs. Thus, a continuing need exists for new classes of drugs that can combat the broad spectrum of infectious agents. It has been discovered that dimers comprising Lysine-Proline-Valine as well as other alpha MSH based peptides disclosed herein are effective in treating urogenital conditions.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0014] The present invention is directed to a system for treating uro-genital conditions. One aspect of this invention involves a treatment comprising one or more polypeptides with an amino acid sequence including KPV (SEQ ID NO 1), MEHFRWG (SEQ ID NO 2), HFRWGKPV (SEQ ID NO 3), VPKC (SEQ ID NO 5), s-s-CKPV (SEQ ID NO 5) or SYSMEHFRWGKPV (SEQ ID NO 4) for treatment of uro-genital conditions. VPKC s-s-CKPV is an example of a 'KPV dimer' wherein a disulfide bond exists between N terminal cysteines of each monomer. Hereon in this disclosure, 'CKPV dimer' will be the term used to identify this form of a KPV dimer, i.e., two CKPV monomers linked through a disulfide bond, i.e., VPKC (SEQ ID NO 5) s-s-CKPV (SEQ ID NO 5). It is contemplated that other KPV dimers may be used in the disclosed composition.

[0015] Uro-genital conditions can include infections, inflammation, or both. In one preferred embodiment of the invention, the uro-genital condition includes infection and/or inflammation of the vagina, vulva, urinary tract, penis, and/or the rectum. In

Z
A

another preferred embodiment of the invention the one or more polypeptides are dissolved in a carrier. In another preferred embodiment of the invention the one or more polypeptides are associated with a tampon for preventing toxic shock syndrome. In another preferred embodiment the one or more polypeptides are associated with a contraceptive for prevention of sexually transmitted diseases or infections. In another preferred embodiment the one or more polypeptides are associated with a suppository for insertion into the vagina or rectum. In another preferred embodiment of the invention the one or more polypeptides are dissolved in a liquid carrier for douching the vagina.

[0016] In one aspect of the invention a pharmaceutical composition is disclosed for use in the treatment of urogenital conditions comprising a KPV dimer, preservative agents, a solvent, an alkalizer, an acrylic acid based polymer, and a gelatinizing agent.

[0017] In another aspect of the invention a pharmaceutical composition for use in the treatment of uro-genital conditions comprises an acrylic acid based polymer, for example Carbopol® National Formulary (hereon NF) propylparaben NF, methylparaben NF, propylene glycol, United States Pharmacopeia (hereon USP) edetic acid (hereon EDTA) USP, the CKPV dimer (which is also identified by the Trademark CZEN002™), Active Pharmaceutical Ingredient (hereon API), 2 M sodium hydroxide solution (hereon NaOH) and sterile water for injection USP. It is contemplated that certain ingredients listed may be modified, replaced or eliminated.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0018] Figure 1 shows the inhibitory effects of alpha MSH peptides on the growth of *S. aureus*.

- [0019] Figure 2 shows the effects of alpha MSH peptides on urokinase induced growth of *S aureus*
- [0020] Figure 3 shows the inhibitory effects of alpha MSH peptides on the growth of *C albicans*
- [0021] Figure 4 compares the anti fungal activities of alpha MSH peptides with fluconazole
- [0022] Figures 5A to 5D show the inhibitory effects of alpha MSH peptides on *C albicans* germ tube formation
- [0023] Figure 6 shows the enhanced neutrophil killing effects of alpha-MSH peptides against *C albicans*
- [0024] Figures 7 8 and 9 show the mechanism by which alpha MSH peptides inhibit the growth of *C albicans*
- [0025] Figures 10 13 show the inhibitory effects of alpha MSH peptides on viral replication and expression in chronically infected cells
- [0026] Figure 14 shows the mechanisms by which alpha MSH peptides inhibit viral replication expression and reactivation
- [0027] Figure 15 shows the inhibitory effects of alpha MSH peptides on viral replication and expression in acutely infected cells
- [0028] Figure 16 shows a representation of one chemical structure of a KPV dimer
- [0029] Figure 17 shows that at the same molarity a KPV dimer (the CKPV dimer) is more than twice as effective as the KPV monomer in treating *C albicans*
- [0030] Figure 18 shows that at the same molarity a KPV dimer (the CKPV dimer) is more than twice as effective as the KPV monomer in treating *C krusei*
- [0031] Figure 19 shows that at the same molarity a KPV dimer (the CKPV dimer) is more than twice as effective as a KPV monomer in treating *C glabrata*

11

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0032] The references cited below are hereby incorporated by reference as if fully set forth herein. The present invention involves composition and method for treating uro-genital conditions with the use of alpha melanocyte stimulating hormone (alpha MSH) peptides and dimers thereof. Alpha MSH is an ancient thirteen amino acid peptide (SEQ ID NO 4) produced by post translational processing of the larger precursor molecule proopiomelanocortin. It shares the 1-13 amino acid sequence with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) also derived from proopiomelanocortin. Alpha MSH is known to be secreted by many cell types including pituitary cells, monocytes, melanocytes, and keratinocytes. It can be found in the skin of rats, in the human epidermis, or in the mucosal barrier of the gastrointestinal tract in intact and hypophysectomized rats. See e.g. Eberle A. N. The Melanotrophins, Karger Basel, Switzerland (1998); Lipton J. M. et al. Anti-inflammatory Influence of the Neuroimmunomodulator alpha MSH, *Immunol Today* 18: 140-145 (1997); Thody A. J. et al. MSH Peptides are Present in Mammalian Skin, *Peptides* 4: 813-815 (1983); Fox J. A. et al. Immunoreactive α -Melanocyte Stimulating Hormone, Its Distribution in the Gastrointestinal Tract of Intact and Hypophysectomized Rats, *Life Sci* 18: 2127-2132 (1981).

[0033] Alpha-MSH peptides are known to have potent antipyretic and anti-inflammatory properties, yet they have extremely low toxicity. They can reduce production of host cells, proinflammatory mediators *in vitro*, and can also reduce production of local and systemic reactions in animal models for inflammation. The core alpha MSH sequence (4-10) (SEQ ID NO 2) for example, has learning and memory behavioral effects but little antipyretic and anti-inflammatory activity. In

contrast the active message sequence for the antipyretic and anti inflammatory activities reside in the C terminal amino-acid sequence of alpha MSH that is Lysine Proline-Valine (Lys-Pro Val or KPV') (SEQ ID NO 1) This tripeptide has activities *in vitro* and *in vivo* that parallel those of the parent molecule The anti inflammatory activity of alpha MSH peptides are disclosed in the following two patents which are hereby incorporated by reference U S Patent No 5 028 592 issued on July 2 1991 to Lipton J M entitled Antipyretic and Anti-inflammatory Lys Pro Val Compositions and Method of Use U S Patent No 5 157 023 issued on October 20 1992 to Lipton J M entitled Antipyretic and Anti inflammatory Lys Pro Val Compositions and Method of Use see also Catania A et al α -Melanocyte Stimulating Hormone in the Modulation of Host Reactions *Endocr Rev* 14 564 576 (1993) Lipton J M et al Anti inflammatory Influence of the Neuroimmunomodulator alpha MSH *Immunol Today* 18 140-145 (1997) Rajora N et al alpha MSH Production Receptors and Influence on Neoptenn. in a Human Monocyte/macrophage Cell Line *J Leukoc Biol* 59 248 253 (1996) Star R A et al Evidence of Autocrine Modulation of Macrophage Nitric Oxide Synthase by alpha MSH, *Proc Nat'l Acad Sci (USA)* 92 8015-8020 (1995) Lipton J M et al Anti inflammatory Effects of the Neuropeptide alpha MSH in Acute Chronic and Systemic inflammation, *Ann N Y Acad Sci* 741 137-148 (1994) Fajora N et al alpha MSH Modulates Local and Circulating Tumor Necrosis Factor α in Experimental Brain Inflammation *J Neurosci* 17 2181 2186 (1995) Richards D B et al Effect of a MSH (11 13) (lysine proline valine) on Fever in the Rabbit Peptides 5 815 817 (1984) Hiltz M E et al Anti inflammatory Activity of a COOH terminal Fragment of the Neuropeptide alpha-MSH *FASEB J* 3 2282 2284 (1989)

13

[0034] In addition to its anti-inflammatory and anti-pyretic function one aspect of the present invention involves the anti-microbial or anti-infection activity of alpha MSH peptides. As described below, alpha MSH peptides have significant anti-infection uses including, for example, use in reducing the viability of microbes, reducing the germination of yeast, killing microbes without reducing the killing of microbes by human neutrophils, for treating inflammation associated with microbial infection without reducing microbial killing, increasing the accumulation of cAMP in microbes and inhibiting the replication and expression of viral pathogens.

[0035] In a preferred embodiment of the invention, these anti-microbial or anti-infection activities are most particularly associated with the C-terminal amino-acid sequence – KPV (SEQ ID NO 1). This tripeptide, along with its dimers and other alpha MSH peptides, are effective over a very broad range of concentrations including picomolar concentrations that normally occur in human plasma. Nanomolar and micromolar concentrations yield more potent concentrations.

[0036] As discussed in the background section, uro-genital conditions are not confined to one single cause. Multiple organisms and infectious agents, from bacteria and fungi to viruses, individually or in combination, can cause a wide variety of conditions including vaginitis, vulvitis, urethritis, balanoposthitis, candidiasis, sexually transmitted diseases, and toxic shock syndrome. For treatment of these conditions, alpha MSH peptides can be applied locally to the site of the infection and/or inflammation by methods known in the art. For example, alpha MSH peptides can be dissolved in solutions such as phosphate buffer saline, hyaluronate, methylcellulose, carboxymethylcellulose, or ethanol. Common carriers such as ointment, cream, gel, dissolvable pill, aerosol spray, suppository, liquid solution for douche, or the absorbent material of tampons can carry alpha-MSH peptides as

14

active ingredients for treating uro genital conditions. These carriers can be applied to the site of the infection or inflammation by an applicator such as syringes or syringe like apparatus, bandages, catheters, tubes with a plunger, spatula or other types of flat surface applicators, condoms, sponges, diaphragms, tampon applicators or fingers.

[0037] More specifically, one preferred embodiment of the invention is to dissolve alpha MSH peptides in a liquid based carrier. This carrier carrying the solvated alpha MSH peptides is then stored in a pressurized canister. Upon release of the carrier by a release valve or other mechanisms from the pressurized canister, an aerosol foam is formed and captured into a syringe or a syringe-type apparatus. The syringe is then partially inserted into the vagina and its contents delivered into the vaginal canal. The syringe or syringe type apparatus and its opening can also be molded to different size, shapes, and lengths to accommodate insertion into different uro genital areas such as the urethra and may also be used in the rectum.

[0038] Another preferred embodiment of the invention is a suppository that comprises a carrier. This carrier, such as a gel or glycerin, is solid or semi solid at room temperature, but melts at body temperature when inserted into the vagina or rectum. This carrier carrying the solvated alpha MSH peptides are delivered into the site of uro genital condition when the carrier melts.

[0039] Delivering alpha MSH peptides to the outside area of the uro-genital area such as the vulva or the glans and prepuce of the penis can be achieved by topically applying a cream, ointment, gel, spray, foam, or balm, the compositions of which are already well known in the art.

[0040] In another aspect of the invention, tampons can be treated with alpha MSH peptides during the manufacturing process. The presence of alpha MSH in tampons

Z
15

may inhibit the growth of microorganisms such as *Staphylococcus aureus* that secretes the toxic shock syndrome toxin (TSST 1). The processes for making tampons are already well known in the art. Treatment of the tampon's absorbent material with alpha MSH or its derivatives may be accomplished by first soaking the absorbent material in a solution of alpha MSH peptides. The absorbent material can then be allowed to dry. Alternatively, alpha MSH may be sprinkled onto the tampon's absorbent material as dry powder.

[0041] In another aspect of the invention, alpha MSH peptides may be delivered to the site of the infection by using contraceptives such as condoms, diaphragms, sponges, or other barrier type mechanisms used for preventing pregnancy or sexually transmitted diseases. Alpha MSH peptides can be dissolved in the lubricant used in condoms, in the gel or foam used together with the diaphragms, or in any other spermicidal solution used in conjunction with condoms, diaphragms, or sponges.

[0042] In another aspect of the invention, alpha MSH peptides may be dissolved in a liquid for use with a douche. The liquid can be delivered by the douche into the vagina for treating infection and/or inflammation.

[0043] In another aspect of the invention, a pharmaceutical composition for use in the treatment of urogenital conditions comprises a CKPV dimer (SEQ ID NO. 5), preservative agents, a solvent, an alkalizer, Carbopol®, and a gelatinizing agent. The composition may further comprise a chelating agent. These ingredients may be modified, replaced, or eliminated. A CKPV dimer (SEQ ID NO. 5) is preferred over other useful alpha MSH peptides as it has been shown to be more efficacious in treating vaginitis. See Example XII below.

7
16

[0044] In another aspect of the invention a pharmaceutical composition is disclosed for use in the treatment of uro-genital conditions wherein said composition comprises an acrylic acid-based polymer for example Carbopol® NF propylparaben NF methylparaben NF propylene glycol USP EDTA USP CKPV (SEQ ID NO 5) API 2 M NaOH and sterile water for injection USP Disclosed below is at least one embodiment of the invention presented in a 0.1% CKPV dimer (SEQ ID NO 5) batch of the composition weighing approximately 4Kg. A contemplated range of percentages of individual components of the invention are disclosed for different size quantities of the invention.

[0045] One type of acrylic acid based polymer is Carbopol®. Carbopol is a registered trademark for high molecular weight crosslinked acrylic acid based polymers available from Noveon Pharmaceuticals www.pharma.noveon.com/products/carbopol.asp. The amount of Carbopol® for use in the disclosed composition ranges from at least about 60 to 100 g or at least about 1.5–2.5% of the composition. A preferred amount of Carbopol® is at least about 80 g or at least about 2% of the composition. It will be apparent to those skilled in the art that other known gelling agents may be utilized in addition to or in place of Carbopol provided they are effective to form a gel.

[0046] Propylparaben or 4-hydroxybenzoic acid propyl ester is a well known preservative. See The Merck Index p 1350 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996). The amount of propylparaben for use in the disclosed composition ranges from at least about 1.3g or 0.025–0.075% of the composition. A preferred amount of propylparaben is at least about 2g or at least about 0.05 % of the composition.

7
18

[0047] Methylparaben or 4-hydroxybenzoic acid methyl ester is a well known preservative. See The Merck Index p 1041 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996). The amount of methylparaben for use in the disclosed composition ranges from at least about 4-8g or at least about 0.1-0.2% of the composition. A preferred amount of methylparaben is at least about 6g or at least about 0.15% of the composition.

[0048] The preservatives may also be selected from the group consisting of phenoxyethanol, methylparaben, butylparaben, ethylparaben, propylparaben and potassium sorbate and combinations thereof.

[0049] Propylene glycol or 1,2-propanediol is a well known solvent with many uses in many areas of chemistry. See The Merck Index p 1348 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996). The amount of propylene glycol for use in the disclosed composition ranges from at least about 200-600g or at least about 5-15% of the composition. A preferred amount of propylene glycol is at least about 400g or at least about 10% of the composition.

[0050] The solvent may also be selected from the group consisting of ethanol, phenol, acetone, glycerol and isopropanol and combinations thereof.

[0051] EDTA or N,N'-1,2-ethanediylbis[N-(carboxymethyl)glycine] is a well known chelating agent. See The Merck Index p 593 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996). The amount of EDTA for use in the disclosed composition ranges from at least about 2-6g or at least about 0.05-0.15% of the composition. A preferred amount of EDTA is at least about 4g or at least about 0.1% of the composition.

18

- [0052] The chelating agent may also be selected from the group consisting of Coenzyme Q10 Zinc L Cysteine L Methionine L Lysine Glutathione and EDTA and combinations thereof
- [0053] The CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is one form of dimer that may be used with the present invention The amount of CKPV (SEQ ID NO 5) for use in the disclosed composition ranges from at least about 2.6g or 0.05-0.15% of the composition A preferred amount of CKPV dimer (SEQ ID NO 5) is at least about 4g or 0.1% of the composition
- [0054] 2M NaOH solution is a well known caustic used as an alkalizer See The Merck Index p 1477.8 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996) The amount of 2M NaOH for use in the disclosed composition is that quantity sufficient to bring the composition to a preferred pH of 4.0 ± 0.1
- [0055] The alkalizer may also be selected from the group consisting of N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N (2-ethanesulfonic acid) (hereon HEPES) 2M NaOH 2 (N-Morpholino)ethanesulfonic acid (hereon MES hydrate) 3 (N-Morpholino)propanesulfonic acid (hereon MOPS) N-tris[Hydroxymethyl]methyl-3-aminopropanesulfonic acid (hereon TAPS) bis(2-Hydroxyethyl)amino tris(hydroxymethyl)methane (hereon Bis Tris) or combinations thereof
- [0056] Sterile water for injection is a commonly known and used gelatinizing agent when taking powders or other solids to gels Sterile water for injection for use in the disclosed composition is that quantity sufficient and up to at least about 3500-3550g or at least about 87-89% of the composition
- [0057] Other gelatinizing agents may also be selected from the group consisting of water sterile water distilled water sterile saline and combinations thereof

10

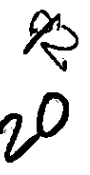
[0058] A 4 Kg 0.1 percent CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer gel batch of the composition preferably comprises

Carbopol® NF	80.0g
Propylparaben NF	2.0g
Methylparaben NF	6.0g
Propylene glycol USP	400.0g
EDTA USP	4.0g
The CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer API	4.0g
2M NaOH Solution	Quantity sufficient to pH 4.0 ± 0.1
Sterile water for injection USP	350.4g

[0059] As disclosed above and below, an effective amount of the CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer, when used as a therapeutic, ranges in picomolar to nanomolar concentrations. Micromolar concentrations are more potently effective. The dosage of the pharmaceutical composition disclosed herein ranges from 50-150 µg/ml. A preferred dose of the pharmaceutical composition described herein is 100 µg/ml.

[0060] The following examples demonstrate the ability and application of alpha MSH peptides to combat infection. Methods in microbiology, molecular biology, and cell culture used but not explicitly described in this disclosure have already been amply reported in the scientific literature. These methods are well within the ability of one skilled in the art.

[0061] The peptides used in the following examples include a dimer of CKPV (SEQ ID NO. 5), alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4), (4-10) (SEQ ID No. 2), (6-13) (SEQ ID NO. 3), and (11-13) (SEQ ID NO. 1), all of which were N-acetylated and C-amidated.



and ACTH (1-39) (SEQ ID NO 9) and (18-39) (SEQ ID NO 10) (CLIP). These peptides were prepared by solid phase peptide synthesis and purified by reversed phased high performance liquid chromatography. Figure 16 shows a representation of one chemical structure for a KPV dimer, i.e. the CKPV dimer (SEQ ID NO 5). Dimers can be formed by adding cysteines at the N termini of any of the above polypeptides and allowing the cysteines of two polypeptides to form a disulfide bond. Both homo-dimers and hetero-dimers can be formed using this method.

[0062] A KPV dimer may be formed when the N termini of two KPV peptides are joined by a linker. VPKC (SEQ ID NO 5) s-s CKPV (SEQ ID NO 5) is an example of a KPV dimer formed by adding a cysteine at the N terminal of a KPV peptide and allowing the cysteines of then two CKPV peptides to form a disulfide bond (s-s). In other words VPKC (SEQ ID NO 5) s-s CKPV (SEQ ID NO 5) is formed when two KPV (SEQ ID NO 1) peptides are linked by a -Cys-s-s-Cys- linker. The linker can be any kind of chemical bond that links the N terminals of two KPV peptides together. It is preferred that the linker be Cys s s Cys- DCys s s Cys- Pen- s-s Cys Pen s s DCys DPen s s Cys DPen s-s-DCys -DPen-s s DPen -Pen s s-Pen hCys-s s Cys- hCys s s DCys hCys-s-s hCys- DhCys s-s DhCys- - DhCys- s s hCys hCys s s-Pen hCys s s-DPen or DhCys-s s DPen.

[0063] It is more preferred that the linker be -Cys Cys-. The term Pen refers to Penicillamine. The Term Cys refers to Cysteine. The Term hCys refers to homocysteine. The prefix D refers to the dextro form of an amino acid. Accordingly, it is preferred that the KPV dimer be VPK Cys (SEQ ID NO 5) s-s Cys KPV (SEQ ID NO 5) VPK DCys (SEQ ID NO 6)-s-s-Cys-KPV (SEQ ID NO 5) VPK Pen- s s Cys KPV (SEQ ID NO 5) VPK Pen s s DCys KPV (SEQ ID NO 6) VPK DPen s s Cys-KPV (SEQ ID NO 5) VPK DPen s-s-DCys-KPV (SEQ ID NO

7/2

6) VPK-DPen s-s DPen KPV VPK Pen s-s-Pen KPV VPK hCys (SEQ ID NO 7) s s Cys-KPV (SEQ ID NO 5) VPK-hCys (SEQ ID NO 7)-s-s-DCys KPV (SEQ ID NO 6) VPK hCys (SEQ ID NO 7) s s-hCys KPV (SEQ ID NO 7) VPK DhCys (SEQ ID NO 8) s-s DhCys KPV (SEQ ID NO 8) VPK DhCys (SEQ ID NO 8) s-s hCys KPV (SEQ ID NO 7) VPK hCys (SEQ ID NO 7) -s-s Pen-KPV VPK hCys (SEQ ID NO 7)-s s DPen-KPV or VPK DhCys (SEQ ID NO 8)-s s-DPen KPV It is more preferred that the KPV dimer a CKPV (SEQ ID NO 5) dimer i.e VPK Cys (SEQ ID NO 5) s-s Cys KPV (SEQ ID NO 5)

[0064] Although the specific amino acid sequences described here are effective it is clear to those familiar with the art that amino acids can be substituted in the amino acid sequence or deleted without altering the effectiveness of the peptides. Thus different KPV dimers are contemplated in this disclosure. Further it is known that stabilization of the α -MSH sequence¹ can greatly increase the activity of the peptide and that substitution of D amino acid forms for L forms can improve or decrease the effectiveness of peptides. For example a stable analog of α MSH [Nle⁴ D-Phe⁷ α MSH which is known to have marked biological activity on melanocytes and melanoma cells is approximately ten times more potent than the parent peptide in reducing fever. Holdeman M and Lipton J M Antipyretic Activity of a Potent α -MSH Analog *Peptides* 6: 273-5 (1985). Further adding amino acids to the C-terminal α MSH (11-13) sequence can reduce or enhance antipyretic potency (Deeter L B, Martin L W, Lipton J M Antipyretic Properties of Centrally Administered α MSH Fragments in the Rabbit *Peptides* 9: 1285-8 (1989). Addition of glycine to form the 10-13 sequence slightly decreased potency the 9-13 sequence was almost devoid of activity whereas the potency of the 8-13 sequence

was greater than that of the 11-13 sequence. It is known that Ac-[D-K¹¹] α -MSH 11-13 NH₂ has the same general potency as the L-form of the tripeptide α -MSH 11-13. Hiltz, M. E., Catania, A., Lipton, J. M., Anti-inflammatory Activity of α -MSH (11-13) Analogs: Influences of Alterations in Stereochemistry, *Peptides* 12: 767-771 (1991).

[0065] Substitution with the D form of valine in position 13 or with the D form of lysine at position 11 plus the D form of valine at position 13 resulted in greater anti-inflammatory activity than with the L form tripeptide. Thus, a dimer created with the D form may be another effective KPV dimer. These examples indicate that alterations in the amino acid characteristics of the peptides can influence activity of the peptides or have little effect, depending upon the nature of the manipulation. It is also believed that biological functional equivalents may be obtained by substitution of amino acids having similar hydrophobic values. Thus, for example, isoleucine and leucine, which have a hydrophobic index +4.5 and +3.8, respectively, can be substituted for valine, which has a hydrophobic index of +4.2, and still obtain a protein having like biological activity. Alternatively, at the other end of the scale, lysine (-3.9) can be substituted for arginine (-4.5) and so on. In general, it is believed that amino acids can be successfully substituted where such amino acid has a hydrophobic score of within about +/- 1 hydrophobic index unit of the replaced amino acid. The antimicrobial properties of biological functional equivalents can be measured through their inhibitory effect on the colony forming units in bacteria or fungi, or through their inhibitory effect on the HIV expression or transcription, as disclosed in the examples of the description of this invention.

23

[0066] Statistical significance disclosed in the examples below was analyzed using one way analysis of variance and the Student's t test. Probability values greater than 0.05 were considered significant.

EXAMPLE 1

[0067] This example illustrates the anti-microbial properties of alpha-MSH peptides against *Staphylococcus aureus*.

[0068] Cultures of *S. aureus* (ATCC 29213) were obtained from the collection of the Department of Microbiology, Ospedale Maggiore di Milano. *S. aureus* (1×10^6 /ml in Hank's balanced salt solution) was incubated in the presence or absence of alpha-MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4), alpha-MSH (11-13) (SEQ ID NO. 1) or the CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer at concentrations in the range of 10^{-15} to 10^{-4} M for two hours at 37°C. Cells were then washed in cold distilled water and diluted with HBSS to a concentration of 100 organisms/ml. One milliliter aliquots were dispensed on blood agar plates and incubated for 24 hours at 37°C. Viability of the microorganisms was estimated from the colonies formed. In another set of experiments, 500 units of urokinase, a *S. aureus* growth enhancer, were also incubated with the bacteria (10^5 /100ml) for four hours at 37°C in a shaking water bath together with the peptides.

[0069] Figure 1 shows that alpha-MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4), alpha-MSH (11-13) (SEQ ID NO. 1) and the CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer all inhibited *S. aureus* colony formation. These inhibitory effects occurred over a wide range of concentrations and were significant ($p > 0.01$) with peptide concentrations of 10^{-12} to 10^{-4} M. Figure 2 shows that alpha-MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4) and alpha-MSH (11-13) (SEQ ID NO. 1) at concentrations of 10^{-6} M significantly countered the growth-enhancing effect of urokinase. Thus, alpha-MSH peptides can inhibit the growth of *Staphylococcus*.

24

aureus an agent known to cause toxic shock syndrome associated with tampon use
vaginitis UTIs urethritis and balanoposthitis

EXAMPLE II

[0070] This example illustrates the anti fungal properties of alpha MSH peptides
against *Candida albicans*

[0071] Clinical isolates of *C. albicans* were obtained from the collection of the
Department of Microbiology Ospedale Maggiore di Milano Cultures of *C. albicans*
were maintained on Sabouraud s agar slants and periodically transferred to
Sabouraud s agar plates and incubated for 48 hours at 28°C To prepare stationary
growth phase yeast a colony was taken from the agar plate transferred into 30 ml of
Sabouraud dextrose broth and incubated for 72 hours at 32°C Cells were
centrifuged at 1000xg for ten minutes and the pellet was washed twice with distilled
water Cells were counted and suspended in Hank s balanced salt solution (HBSS)
to the desired concentration Viability determined by exclusion of 0.01% methylene
blue remained greater than 98%

[0072] At 1×10^6 /ml in HBSS these fungi were incubated in the presence or absence
of alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4) alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO. 1) or the
CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer at concentrations ranging from 10^{-15} to 10^{-4} M for two
hours at 37°C Cells were then washed in cold distilled water and diluted with HBSS
to a concentration of 100 organisms/ml One-milliliter aliquots were then dispensed
on blood agar plates and incubated for 48 hours at 37°C The organism s viability
was estimated from the number of colonies formed

[0073] Figure 3 shows that alpha MSH(1-13) (SEQ ID NO. 4) alpha MSH(11-13)
(SEQ ID NO. 1) and the CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer greatly reduced the ability of

25

C albicans to form colonies at concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-4} M ($p < 0.01$ vs control). Thus, this demonstrates that alpha MSH peptides can inhibit the growth of *Candida albicans*, an agent known to cause candidiasis, vaginitis, urethritis, and balanoposthitis.

EXAMPLE III

[0074] This example compares the anti-infection activities of alpha MSH peptides to fluconazole, an established anti-fungal agent.

[0075] Alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4), (4-10) (SEQ ID NO 2), (6-13) (SEQ ID NO 3), (11-13) (SEQ ID NO 1), ACTH (1-39) (SEQ ID NO 9), (18-39) (SEQ ID NO 10), and fluconazole at concentrations of 10^{-8} to 10^{-4} M were tested against *C albicans* using the same procedures as in Example II. Figure 4 shows that compared with fluconazole, alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1), (6-13) (SEQ ID NO 3), and (1-13) (SEQ ID NO 4) were most effective against *C albicans*. Their inhibitory activities were similar to fluconazole at the same molar concentration. In contrast, the core alpha MSH sequence (4-10) (SEQ ID NO 2), which has behavioral effects but little anti-inflammatory activity, caused approximately 50% inhibition of colony forming units (CFU). Although this inhibitory effect was substantial ($p < 0.01$ vs control), it was significantly less potent than alpha MSH fragments bearing the KPV signal sequence, i.e., alpha MSH (6-13) (SEQ ID NO 3) and (11-13) (SEQ ID NO 1) ($p < 0.01$), or the parent molecule alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) ($p < 0.05$). Figure 4 also shows that ACTH (1-39) (SEQ ID NO 9) and the ACTH fragment (18-39) (SEQ ID NO 10) did not reduce *C albicans* viability. Even at a higher concentration of 10^{-4} M, which is not shown in the figures, ACTH peptides were likewise ineffective.

2/2
28

[0076] Thus this example demonstrates that alpha MSH peptides are as effective as fluconazole in inhibiting *Candida* s growth

EXAMPLE IV

[0077] This example illustrates that alpha MSH peptides inhibit the germination or germ tube formation of *C. albicans*. Germ tube formation is a significant part of the pathogenesis of *C. albicans* infection. This pathogenesis involves adhesion to host epithelial and endothelial cells and morphologic switching from the ellipsoid blastospore to various filamentous forms e.g. germ tubes, pseudohyphae and hyphae. Gow N A. Germ Tube Growth of *Candida albicans*. *Curr Topics Med Myco* 8: 43-55 (1997).

[0078] *C. albicans* from stationary phase cultures were washed twice with distilled water and suspended in HBSS to a final concentration of 2×10^6 /ml. Hyphal growth was induced by addition of 10% inactivated horse serum (GIBCO/ BRL, Paisley, Great Britain) to yeast incubated for 45 minutes at 37°C with continuous shaking. Horse serum was then removed by washing cells twice with HBSS and incubation was further continued for 60 minutes at 37°C in the presence of alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4), (6-13) (SEQ ID NO. 3) or (11-13) (SEQ ID NO. 1) at a concentration of 10^{-6} M with continuous shaking. The percentage of filamentous cells was evaluated under a light microscope with the aid of a hemocytometer. Experiments were run in triplicate and at least 200 cells were scored. Photomicrographs were taken with a MC100 camera attached to an Axioskop Zeiss microscope.

[0079] Figures 5A to 5D show that co incubation of *C. albicans* with alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO. 4) or (11-13) (SEQ ID NO. 1) inhibited germ tube formation induced

by horse serum Alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) caused 28 32% reduction in the number of filamentous cells while alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) caused 54 58% reduction Although not shown in the figures alpha MSH (6 13) (SEQ ID NO 3) similarly had approximately 50% reduction in the number of filamentous cells Thus this demonstrates alpha MSH peptides can inhibit one mode of *Candida* pathogenesis by inhibiting its germ tube formation

EXAMPLE V

[0080] Reduced killing of pathogens is a dire consequence of therapy with corticosteroids and other nonsteroidal anti inflammatory drugs during infection Stevens D L Could Nonsteroidal Anti inflammatory Drugs (NSAIDs) Enhance Progression of Bacterial Infections to Toxic Shock Syndrome? *Clin Infect Dis* 21 977 80 (1997) Capsoni F et al Effect of Corticosteroids on Neutrophil Function Inhibition of Antibody-dependent Cell Mediated Cytotoxicity (ADCC) *J Immunopharmacol* 5 217 30 (1983) This example illustrates that alpha MSH peptides inhibit the growth of infectious agents without comprising the ability of human neutrophils to combat these infections This example further shows that alpha MSH peptides can actually enhance the ability of neutrophils to kill these infectious agents

[0081] Venous blood (20 ml) from healthy volunteers was anticoagulated with heparin Neutrophils were then isolated using dextran sedimentation and centrifugation with Ficoll Hypaque (Sigma Chemical Co St Louis Missouri USA) Erythrocytes were lysed via hypotonic shock with the resulting neutrophils representing at least 97% of the cell suspension Cell viability estimated by trypan

28

blue exclusion was greater than 98% Neutrophils were resuspended in HBSS for the experiments

[0082] *C. albicans* (1×10^6) were opsonized with human AB serum in a shaking water bath for 30 minutes at 37°C They were then incubated with neutrophils in the presence of medium alone or medium with alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) or alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) in concentrations ranging from 10^{-15} to 10^{-4} M in a shaking water bath for two hours at 37°C After incubation the culture tubes were placed on ice to stop growth and extracellular organisms were washed twice with centrifugation at 1000 x g at 4°C A 2.5% sodium deoxycholate solution was added to the suspension and the tubes were shaken for five minutes Cold distilled water was then added to obtain a suspension of 10^6 cells/ml Two 1/100 serial dilutions in HBSS were made to obtain a final suspension of 100 cells/ml One-milliliter aliquots were then dispensed on blood agar plates and incubated for 48 hours at 37°C Colony forming units were counted at the end of the incubation period with experiments running in triplicate and repeated using blood from five different donors

[0083] Figure 6 shows that alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) and (11-13) (SEQ ID NO 1) actually enhanced neutrophil killing of *C. albicans* when administered at concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-4} M ($p < 0.01$) This shows that this enhanced killing occurred over a very broad range of concentrations including picomolar concentration which is similar to the concentration of alpha MSH found in human plasma

[0084] Thus this example demonstrates that alpha-MSH peptides can simultaneously combat against infection and inflammation which may also be applied to candidiasis vaginitis urethritis balanoposthitis or hemorrhoids

29

[0085] This example suggests the cellular mechanism by which alpha MSH peptides exert anti-microbial properties in general and anti fungal properties in particular

[0086] *C albicans* (10^8 /ml) permeabilized with toluene/ethanol were incubated at 37°C with continuous shaking in the presence or absence of 10^{-6} M alpha MSH (1 13) (SEQ ID NO 4) (11 13) (SEQ ID NO 1) or forskolin an agent known to increase intracellular cAMP. The reactions were stopped after three minutes by the addition of ice cold ethanol. cAMP levels were measured in duplicate using a commercial enzyme immunoassay kit (Amersham United Kingdom) after extraction via the liquid phase method according to the manufacturer's instructions. In a related experiment *C albicans* was also exposed to dideoxyadenosine (ddAdo Sigma) a potent inhibitor of adenylyl cyclase at concentrations of 25 50 and 100 x 10^{-5} M for two hours and to alpha MSH peptides for two additional hours. The effects of forskolin and ddAdo on the ability of *C albicans* to form colonies were determined according to the procedures described in Example II

[0087] Figure 7 shows that alpha MSH (1 13) (SEQ ID NO 4) and (11 13) (SEQ ID NO 1) enhanced cAMP content in *C albicans*. This cAMP increase was of the same order of magnitude as that induced by equimolar forskolin. Figure 8 shows that along with alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) and (11 13) (SEQ ID NO 1) forskolin also significantly inhibited the growth of *C albicans* relative to the control group ($p < 0.01$). Figure 9 shows that ddAdo has the ability to reverse the effect of alpha MSH (1 13) (SEQ ID NO 4) and (11 13) (SEQ ID NO 1) on the growth of *C albicans*.

[0088] This example demonstrates that alpha MSH peptides most likely inhibit growth of *C. albicans* and other microorganisms by increasing its cAMP level which in turn inhibits mRNA and protein synthesis. See e.g. Bhattacharya A et al Effect of Cyclic AMP on RNA and Protein Synthesis in *Candida albicans* *Biochem Biophysics Res Commun* 77 1433-44 (1977)

EXAMPLE VII

[0089] This example illustrates the ability of alpha MSH peptides to inhibit viral replication in human cells. More specifically, alpha MSH inhibited the replication and expression of HIV 1 in chronically infected human monocytes.

[0090] The chronically HIV 1 infected promonocytic U1 cell line is an *in vitro* model of latent HIV infection in monocytes. These cells carry two integrated proviral copies of HIV and constitutive expression of HIV is very low. Viral replication, however, as measured by RNA transcription, p24 antigen, or reverse transcriptase release, can be activated with different stimuli such as TNF α , IL 6, IL 10, PMA or crowding of cells.

[0091] To determine the effects of alpha MSH peptides on HIV replication, these cells were maintained in log phase of growth in a complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 10mM Hepes), 2 mM L glutamine (Sigma Aldrich), 10% heat inactivated FCS (Hyclone Laboratories, Logan, UT, USA), penicillin at 100 units/ml and streptomycin at 100 μ g/ml (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) in log phase of growth. Pilot experiments were first performed to determine optimal cell density, stimuli concentration, and kinetics of HIV 1 p24 antigen production using these culture conditions. Before use, cells were washed three times with HBSS to remove extracellular viruses. Cells were then plated on 24-well flat bottomed plates.

7
31

at a concentration of 2×10^5 /ml (final volume of one ml) with medium alone or medium plus TNF α (10ng/ml) (R&D Systems Oxford England UK) in the presence or absence of alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) or (11-13) (SEQ ID NO 1) in concentrations from 10^{-15} to 10^{-4} M

[0092] In further experiments alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) alone at 10^{-5} M was added to U1 cells stimulated with TNF α (10ng/ml) IL-6 (20ng/ml) IL-10 (20ng/ml) (R&D Systems Oxford England UK) PMA (1ng/ml) (Sigma Aldrich) or in crowding conditions. Crowding was achieved by seeding U1 cells at a density of 2×10^5 /ml and maintaining them in culture at 37°C in 5% CO₂ without changing media for seven days. Cultures activated with cytokines or PMA were maintained for only 48 hours. Supernatants were then removed by centrifugation and assayed for p24 antigen using commercially available ELISA kits from Cellular Products Inc. in Buffalo NY USA. Reverse transcriptase releases were also measured using a commercially available kit ELISA Retrosys RT assay from Innovagen Lund Sweden. For these experiments addition of alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) occurred on day one and each condition was tested in triplicate.

[0093] Figure 10 shows that alpha MSH (1-13) (SEQ ID NO 4) and (11-13) (SEQ ID NO 1) significantly inhibited p24 antigen release from TNF- α stimulated U1 cells over a broad range of concentrations. The most effective concentration for both peptides was 10^{-5} M causing 52.7% and 56.0% inhibition respectively. Figure 11 shows that alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) also inhibited p24 antigen and reverse transcriptase release from U1 cells induced by IL-6 IL-10 PMA and in crowding condition. In addition Figure 12 shows that alpha MSH(11-13) (SEQ ID

32

NO 1) also inhibited the transcription of both spliced and unspliced HIV 1 RNA in PMA stimulated U1 cells as measured by Northern Blot analysis

[0094] Thus this example demonstrates that alpha MSH peptides can inhibit transcription of viral genes through mediation of the TNF- α , IL-6 and IL 10 pathways

EXAMPLE VIII

[0095] This example further illustrates the ability of alpha MSH to inhibit viral replication and activation. More specifically this example illustrates that the addition of a neutralizing antibody to alpha MSH in U1 cells substantially increased p24-antigen release.

[0096] U1 cells were cultured similarly as described in Example VII. Endogenous alpha MSH produced by U1 cells was blocked with an affinity purified rabbit anti-alpha MSH antibody (Euro-Diagnostica, Malmo, Sweden) diluted 1:250 with medium. The control antibody was a rabbit IgG at the same dilution. Cells (2×10^5 /ml) treated with the anti-alpha MSH or the control antibody were coincubated with medium or PMA (1ng/ml). After 48-hour incubation at 37°C, supernatants were separated and tested for p24 antigen release. In crowding experiments with U1 cells cultured as described above, the anti-alpha MSH antibody or the control IgG was added on day one and the supernatants were harvested on day seven.

[0097] Figure 13 shows that blocking alpha MSH in resting, PMA induced or crowded U1 cells significantly increased the release of p24 antigen. This example strongly implies that viral replication is affected by alpha MSH.

33

EXAMPLE IX

[0098] This example illustrates the mechanism by which alpha-MSH peptides inhibit viral replication and expression. More specifically, alpha MSH peptides inhibited TNF α induced NF- κ B activation and binding.

[0099] To determine the level of NF κ B activity, nuclear extracts were prepared from 20×10^6 U1 cells (2×10^5 /ml in complete medium) stimulated for four hours with TNF α (20 ng/ml) in the presence or absence of 10^{-5} M alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1). Cells were washed once with cold PBS and twice with buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.5 mM PMSF and 0.5 mM DTT), centrifuged and incubated for ten minutes on ice in buffer A plus 0.1% NP-40. Afterwards, the supernatants were removed and the nuclear pellets were resuspended in 15 μ l of buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.42 M KCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM PMSF and 0.5 mM DTT), incubated for 15 minutes on ice, mixed and then centrifuged. The supernatants were diluted with 75 μ l of modified buffer D (20 mM Hepes pH 7.9, 0.05 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol, 0.5 mM PMSF and 0.5 mM DTT) and stored at $-80^\circ C$. The binding reaction was carried out for fifteen minutes at room temperature with 10 μ g of nuclear extract protein and 0.5 ng of ^{32}P -labeled NF- κ B (30,000 cpm/ μ l) or AP1 consensus in buffer A (12 mM Tris HCl pH 7.8, 60 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.3 mM DTT) plus 10% glycerol, 2 μ g/ml bovine serum albumin and 1 μ g/ml single stranded DNA (Pharmacia Biotech). The oligonucleotides for NF- κ B used in these studies were + gat cca agg gga ctt tcc gct ggg gac ttt cca tg (SEQ ID NO 11) and gat cca tgg aaa gtc ccc agc gga aag tcc cct tg (SEQ ID NO 12). Each oligonucleotide was annealed to its complementary strand and end labeled with ^{32}P - γ -ATP using polynucleotide kinase. For the



 34

determination of specific bands nuclear extracts were first incubated with 100 fold excess unlabeled probe for five minutes before incubation with a labeled probe The mixtures were then run on 5% (30:1) acrylamide gel in 1x TBE The gels were dried and autoradiographed

[00100] Figure 14 shows that TNF α greatly enhanced NF κ B binding activity but the co incubation of alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) at 10^{-5} M significantly reduced NF κ B activation Alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) however did not alter NF κ B activation in resting cells This suggests that alpha MSH peptides inhibit viral replication and expression through regulation of the NF- κ B binding

[00101] Replication of viral agents often depends on the state of activation of infected cells and is often regulated by interactions between viral and host factors These host factors may include TNF α and other cytokines such as the interleukins Similar to HIV 1 infection and activation herpes simplex virus also becomes reactivated from latency in response to host cytokines For example TNF α and IL 6 but not IL 1 and IL 3 have been shown to reactivate HSV infection Neutralization of IL 6 with antibody against IL 6 significantly inhibited HSV reactivation while neutralization of interferon alpha and beta did not See e g Baker M et al The Relationship between Interleukin-6 and Herpes Simplex Virus Type 1 Implications for Behavior and Immunopathology *Brain Behav Immun* 13(3) 201-11 (1999) Noisakran S et al Lymphocytes Delay Kinetics of HSV 1 Reactivation from in vitro Explants of Latent Infected Trigeminal Ganglia *J Neuroimmunol* 95(1-2) 126-35 (1999) Walev I et al Enhancement by TNF alpha of Reactivation and Replication of Latent Herpes Simplex Virus from Trigeminal Ganglia of Mice *Arch Virol* 140(6) 987-92 (1995) Domk-Optiz I et al Stimulation of Macrophages by Endotoxin

Results in the Reactivation of a Persistent Herpes Simplex Virus Infection *Scand J Immunol* 32(2) 69-75 (1990) Fauci A S Host Factors in the Pathogenesis of HIV induced Disease *Nature* 384 529 (1996)

[00102] TNF α or infection by viruses including HSV can cause targeted destruction of I κ B which in turn activates the nuclear translocation of NF κ B. Nuclear translocation promotes NF κ B binding to DNA operators for the transcription of a range of inflammatory agents including TNF α , IL-6 and other cytokines. The expression of these cytokines again further reactivates other HSV infected cells to produce HSV viruses. See e.g. Patel A et al Herpes Simplex Type 1 Induction of Persistent NF κ B Nuclear Translocation Increases the Efficiency of Virus Replication *Virology* 247(2) 212-22 (1998)

[00103] Thus by blocking NF κ B binding alpha MSH peptides inhibit the expression of more inflammatory cytokines that can reactivate HSV. This example and Examples VII-VIII show that alpha MSH peptides inhibit viral replication, expression and reactivation by inhibiting NF κ B binding in response to the body's cytokines or other viral infection.

EXAMPLE X

[00104] This example illustrates the ability of alpha MSH peptides to inhibit viral replication in acutely infected human cells. More specifically, alpha MSH inhibited the replication and expression of HIV 1 in acutely infected human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

[00105] PBMCs were isolated from normal donors by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Monocytes were isolated by Percoll gradient separation and allowed to differentiate into macrophages (MDM) in complete medium of RPMI plus 20%

36

FCS using 24-well tissue culture plates at 10^8 cells/ml for seven days. MDM were infected with monocytotropic HIVBa-I strain (1:10) overnight. The undiluted viral stock contained 10^7 infectious units/ml. After 24 hours, MDM were washed and resuspended in complete medium and replaced three times a week for three weeks. Reverse transcriptase releases were measured weekly post-infection using a commercially available kit: ELISA Retrosys RT assay from Innovagen, Lund, Sweden. 10^{-5} M alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) was added at the time of HIV infection and then daily until harvests.

[00106] Figure 15 shows that alpha MSH significantly inhibited reverse transcriptase release in acutely infected MDM. This inhibitory effect was more pronounced on day six but was still statistically significant on day 21.

[00107] Thus, this example demonstrates that viral replication at the site of infection can be inhibited by alpha MSH peptides. Consequently, the sexual transmission of venereal diseases in general and HIV in particular can be inhibited by associating alpha MSH peptides with contraceptives such as condoms, diaphragms, or sponges used during sexual contact, and/or the post sexual contact application of suppositories, cream, ointment, gel, or aerosol foams containing alpha MSH peptides.

EXAMPLE XI

[00108] This example illustrates the biological functional equivalents of alpha MSH peptides.

[00109] Although specific amino acid sequences described here are effective, it is clear to those familiar with the art that amino acids can be substituted or deleted without altering the effectiveness of the peptides. Further, it is known that

stabilization of the alpha MSH sequence can greatly increase the activity of the peptide and that substitution of D-amino acid forms for L-forms can improve or decrease the effectiveness of the peptides. For example a stable analog of alpha MSH [Nle⁴ D Phe⁷] alpha MSH which is known to have marked biological activity on melanocytes and melanoma cells is approximately ten times more potent than the parent peptide in reducing fever. Further adding amino acids to the C terminal of alpha-MSH (11-13) (SEQ ID NO 1) sequence can reduce or enhance antipyretic potency. Addition of glycine to form the 10-13 sequence (SEQ ID NO 13) slightly decreased potency the 9-13 sequence (SEQ ID NO 14) was almost devoid of activity whereas the potency of the 8-13 sequence (SEQ ID NO 15) was greater than that of the 11-13 sequence (SEQ ID NO 1). It is known that Ac-[D K11]-alpha MSH 11-13 NH₂ has the same general potency as the L form of the tripeptide alpha MSH (11-13) (SEQ ID NO 1). Certain references however have shown substitution with D proline in position 12 of the tripeptide rendered it inactive. See e.g. Holdeman M et al. Antipyretic Activity of a Potent alpha MSH Analog. Peptides 6:273-5 (1985); Deeter L B et al. Antipyretic Properties of Centrally Administered alpha-MSH Fragments in the Rabbit. Peptides 9:1285-8 (1989); Hiltz M E. Anti-inflammatory Activity of alpha MSH (11-13) Analogs. Influences of Alterations in Stereochemistry. Peptides 12:767-71 (1991).

{00110} Biological functional equivalents can also be obtained by substitution of amino acids having similar hydropathic values. Thus for example isoleucine and leucine which have a hydropathic index +4.5 and +3.8 respectively can be substituted for valine which has a hydropathic index of +4.2 and still obtain a protein having like biological activity and thus present the opportunity for varying types of KPV dimers. Alternatively at the other end of the scale lysine (-3.9) can be substituted for

arginine (4 5) and so on. In general, it is believed that amino acids can be successfully substituted where such amino acid has a hydropathic score of within about ± 1 hydropathic index unit of the replaced amino acid.

EXAMPLE XII

[00111] *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* (clinical isolates) were obtained from the collection of the laboratory of Microbiology, Ospedale Maggiore di Milano. Six different isolates for each yeast strain were used. *Candida Sp.* cells were maintained on Sabouraud's agar slants and periodically transferred to Sabouraud's agar plates and incubated for 48 h at 28° C. To prepare stationary growth phase yeast, a colony was taken from the agar plates and transferred into 5 ml Sabouraud dextrose broth and incubated for 48 h at 32° C. Cells were centrifuged at 1 000 x g for 10 minutes and the pellet was washed twice with distilled water. Cells were counted and suspended in distilled water to obtain 10^7 yeast cells/ml. Viability determined by the exclusion of 0.01% methylene blue remained > 98%.

[00112] Tubes containing *Candida Sp.* cells 1×10^8 in 100 μ l distilled water were additioned with the CKPV dimer 10^{-7} to 10^{-4} M or KPV 10^{-4} M (final concentrations) dissolved in 100 μ l distilled water. Control tubes received 100 μ l of distilled water. All the tests were run in triplicate. After 2 h incubation at 37° C, yeast suspension from each vial was diluted with distilled water to obtain approximately 100 organisms/ml. One milliliter aliquots from each tube were dispensed on blood agar plates and incubated for 48 h at 37° C to count CFUs. Organism viability was estimated from the number of CFUs in each plate. Only experiments in which CFUs in control plates were between 80 and 120 with a variability in counts less than 10%.

39

were used to evaluate effects of the peptides. Experiments with smaller or greater numbers of colonies in control plates were considered technically inappropriate and excluded from analysis.

[00113] Results illustrated in Figures 17-19 and show the resulting CFUs under the conditions described above for the particular fungus identified. The figures include the resulting CFUs in the presence of no alpha MSH peptides (designated as 0 in Figures 17-19), 10⁻⁴ M of KPV [designated as -4 in Figures 17-19], 10⁻⁷ M of the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer [designated as -7 in Figures 17-19], 10⁻⁶ M of the CKPV dimer [designated as -6 in Figures 1-3], 10⁻⁵ M of the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer [designated as -5 in Figures 17-19] and 10⁻⁴ M of the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer [designated as -4 in Figures 17-19]. Figure 17 shows that at the same molarity the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is more than twice as effective as the KPV monomer in treating *C. albicans*. Figure 18 shows that at the same molarity the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is more than twice as effective as the KPV monomer in treating *C. krusei*. Figure 19 shows that at the same molarity the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is more than twice as effective as the KPV monomer in treating *C. glabrata*.

[00114] The preceding Examples I-XII demonstrate the anti-infection activities and uses of alpha MSH peptides. These data are intended only as examples and are not intended to limit the invention to these examples. It is understood that modifying the examples above does not depart from the spirit of the invention. It is further understood that the examples can be applied on their own or in combination with each other.

40

CLAIMS

- 1 A pharmaceutical composition comprising a KPV dimer a first preservative agent a solvent an alkalizer an acrylic acid based polymer a second preservative agent and a gelatinizing agent
- 2 The composition of claim 1 further comprising a chelating agent
- 3 The composition of claim 1 wherein the KPV dimer is CKPV (SEQ ID NO 5) dimer
- 4 The composition of claim 1 wherein the acrylic acid based polymer is Carbopol®
- 5 The composition of claim 1 wherein the first preservative is selected from the group consisting of phenoxyethanol methylparaben butylparaben ethylparaben propylparaben and potassium sorbate and combinations thereof
- 6 The composition of claim 1 wherein the second preservative is selected from the group consisting of phenoxyethanol methylparaben butylparaben ethylparaben propylparaben and potassium sorbate and combinations thereof
- 7 The composition of claim 5 wherein the first preservative is methylparaben
- 8 The composition of claim 6 wherein the second preservative is propylparaben
- 9 The composition of claim 1 wherein the solvent is selected from the groups consisting of propylene glycol ethanol phenol acetone glycerol and isopropanol and combinations thereof

7
41

- 10 The composition of claim 9 wherein the solvent is propylene glycol
- 11 The composition of claim 2 wherein the chelating agent is selected from the group consisting of Coenzyme Q10 Zinc L Cysteine L Methionine L Lysine Glutathione and EDTA and combinations thereof
- 12 The composition of claim 11 wherein the chelating agent is EDTA
- 13 The composition of claim 1 wherein the alkalizer is selected from the group consisting of HEPES 2M NaOH MES hydrate MOPS TAPS and Bis Tris and combinations thereof
- 14 The composition of claim 13 wherein the alkalizer is NaOH
- 15 The composition of claim 1 wherein the gelatinizing agent is selected from the group consisting of water sterile water distilled water sterile saline and sterile water for injection and combinations thereof
- 16 The composition of claim 15 wherein the gelatinizing agent is sterile water for injection
- 17 The composition of claim 3 wherein the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is at least about 0.05-0.15% of the composition
- 18 The composition of claim 17 wherein the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is at least about 0.1% of the composition
- 19 The composition of claim 4 wherein the Carbopol® is at least about 1.5-2.5% of the composition

2
42

- 20 The composition of claim 19 wherein the Carbopol® is at least about 2% of the composition
- 21 The composition of claim 7 wherein the methylparaben is at least about 0.1-0.2% of the composition
- 22 The composition of claim 21 wherein the methylparaben is at least about 0.15% of the composition
- 23 The composition of claim 8 wherein the propylparaben is at least about 0.025-0.075% of the composition
- 24 The composition of claim 23 wherein the propylparaben is at least about 0.05% of the composition
- 25 The composition of claim 10 wherein the propylene glycol is at least about 5-15% of the composition
- 26 The composition of claim 25 wherein the propylene glycol is at least about 10% of the composition
- 27 The composition of claim 12 wherein the EDTA is at least about 0.05-0.15% of the composition
- 28 The composition of claim 27 wherein the EDTA is at least about 0.1% of the composition
- 29 The composition of claim 14 wherein the 2M NaOH is that quantity sufficient to bring the composition to a pH of 4.0 ± 0.1

37
43

- 30 The composition of claim 15 wherein the sterile water for injection is that quantity sufficient to create a gel
- 31 A pharmaceutical composition comprising Carbopol® propylparaben methylparaben propylene glycol CKPV (SEQ ID NO 5) dimer 2 M NaOH and sterile water for injection
- 32 The composition of claim 31 further comprising EDTA
- 33 The composition of claim 31 wherein the CKPV (SEQ ID NO 5) dimer is at least about 0.1% of the composition
- 34 The composition of claim 31 wherein the Carbopol® is at least about 2% of the composition
- 35 The composition of claim 31 wherein the methylparaben is at least about 0.15% of the composition
- 36 The composition of claim 31 wherein the propylparaben is at least 0.05% of the composition
- 37 The composition of claim 31 wherein the propylene glycol is at least about 10% of the composition
- 38 The composition of claim 32 wherein the EDTA is at least about 0.1% of the composition
- 39 The composition of claim 31 wherein the 2M NaOH is that quantity sufficient to bring the composition to a pH of 4.0 ± 0.1

44

40 The composition of claim 31 wherein the sterile water for injection is that quantity sufficient to create a gel

41 A pharmaceutical composition comprising 2% of Carbopol® 0.05% of propylparaben 0.15% of methylparaben 10% of propylene glycol 0.1%g of EDTA 2M NaOH in a quantity sufficient to bring the composition to a pH of 4.0 ± 0.1 0.1% of CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer and sterile water for injection quantity sufficient to create a gel

42 A method of treating urogenital conditions comprising the use of a pharmaceutical composition comprising at least about 2% of Carbopol® at least about 0.05% of propylparaben at least about 0.15% of methylparaben at least about 10% of propylene glycol at least about 0.1% of EDTA 2M NaOH in a quantity sufficient to bring the composition to a pH of 4.0 ± 0.1 at least about 0.1% of CKPV (SEQ ID NO. 5) dimer and sterile water for injection quantity sufficient to create a gel

8
45

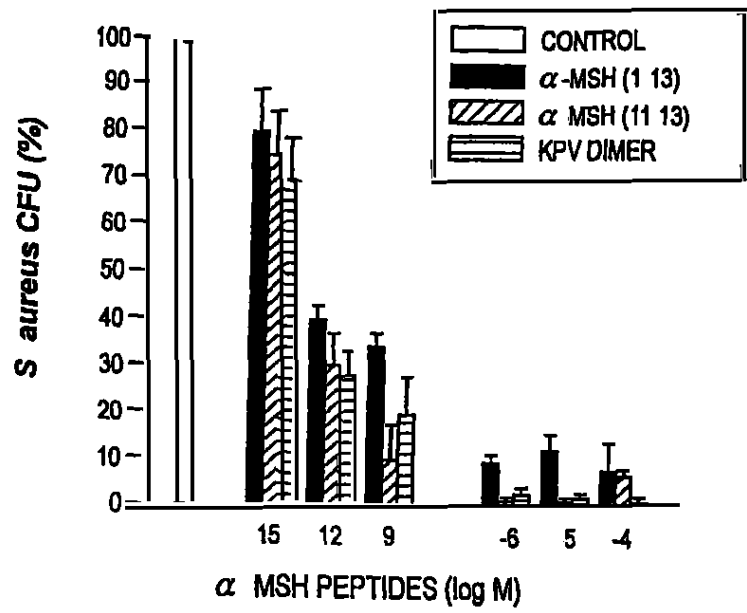


Fig 1

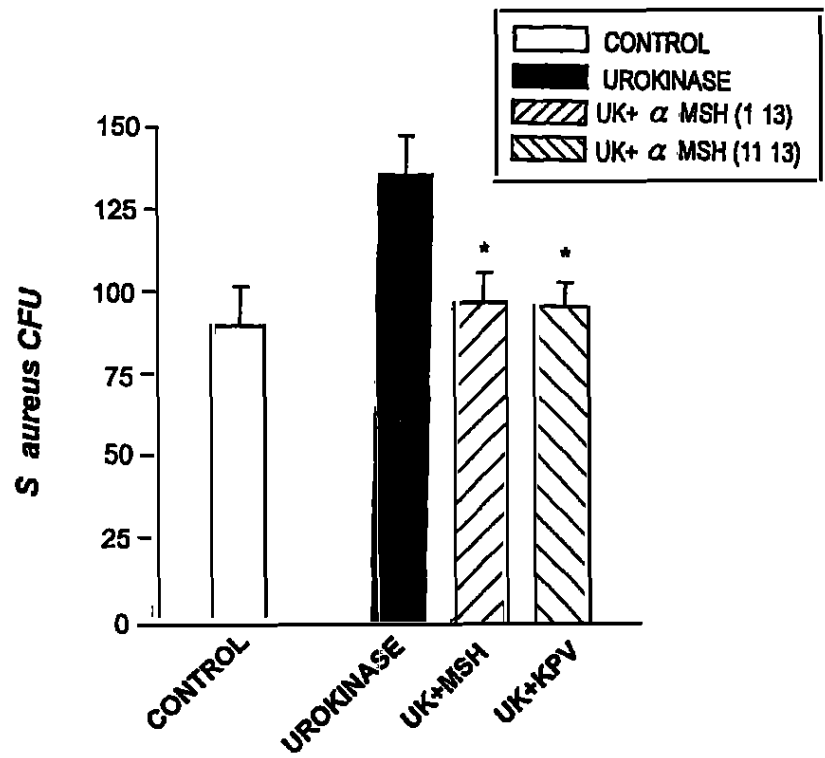


Fig 2

9/2
46

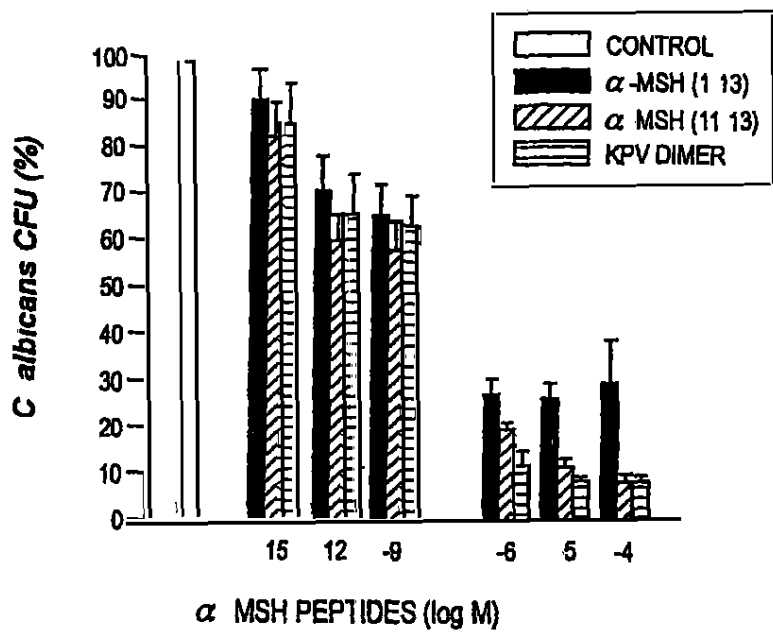


Fig 3

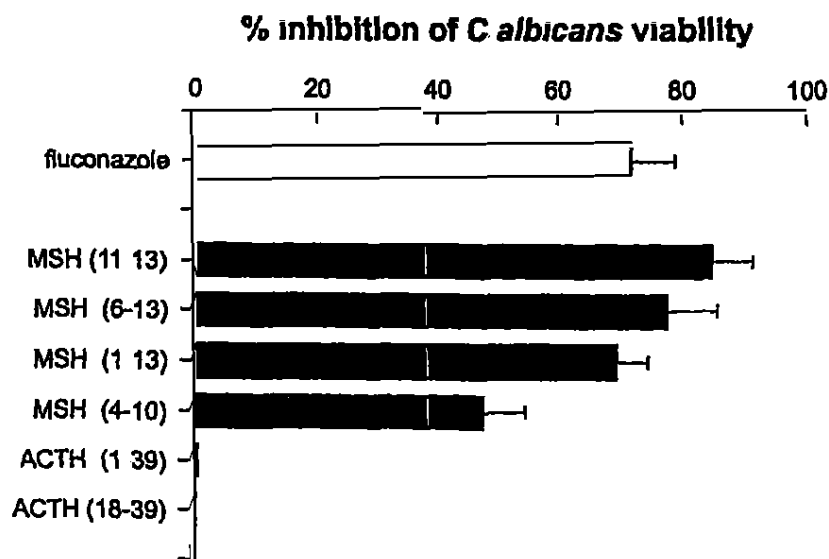


Fig 4

47
B

Fig 5A

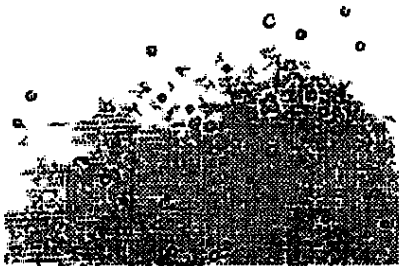


Fig 5B



Fig 5C

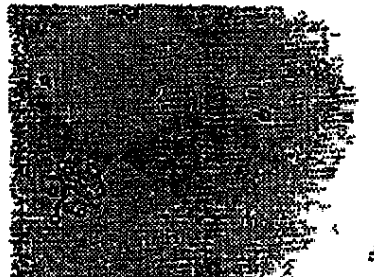


Fig 5D

48

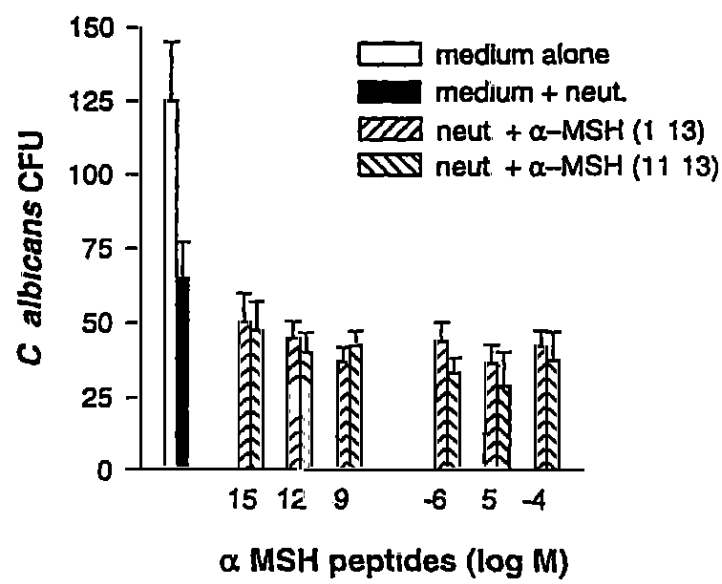


Fig 6

49

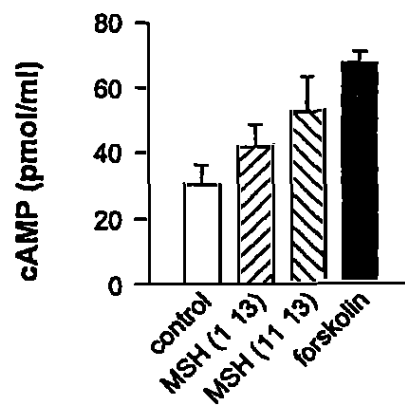


Fig 7

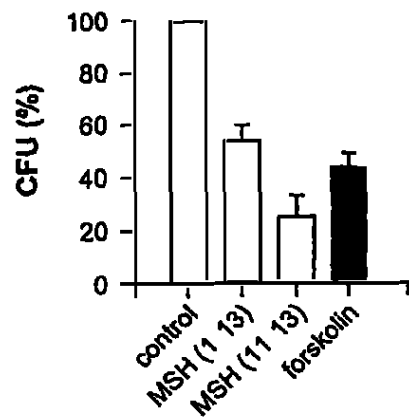


Fig 8

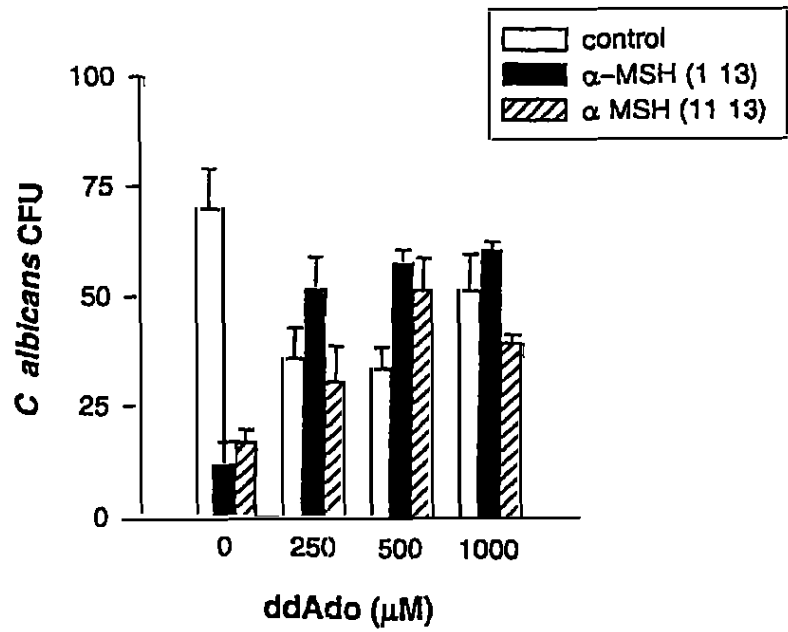


Fig 9

8

69

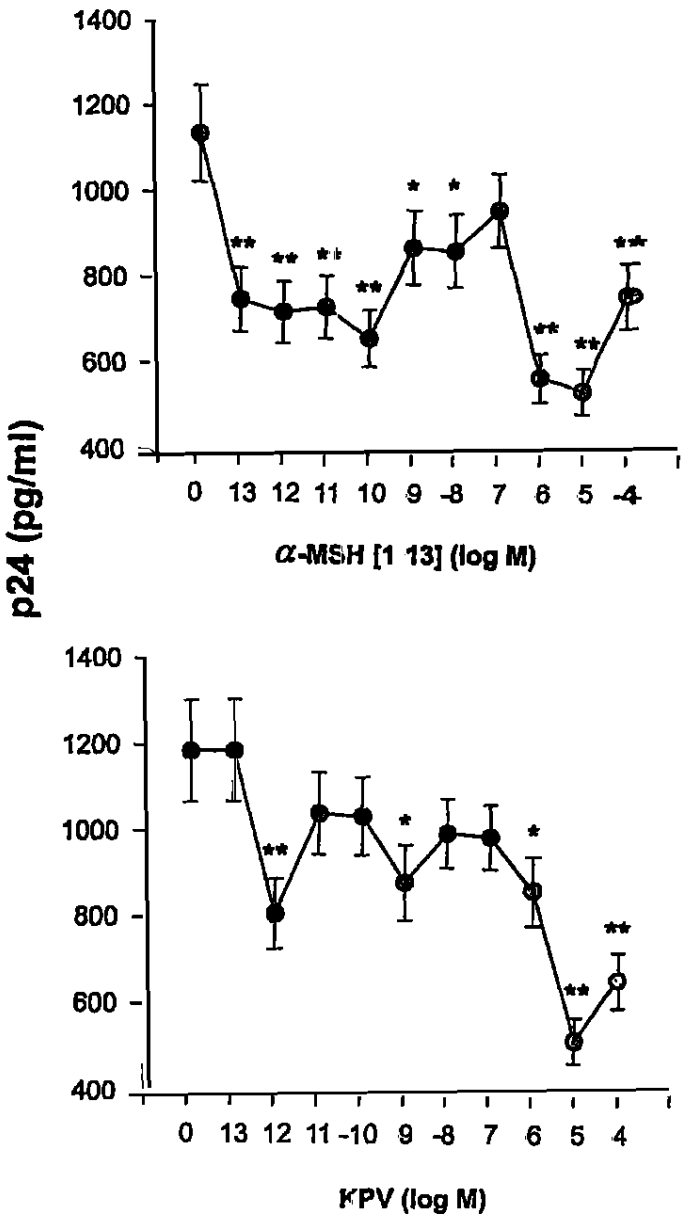


Fig 10

7.5
61

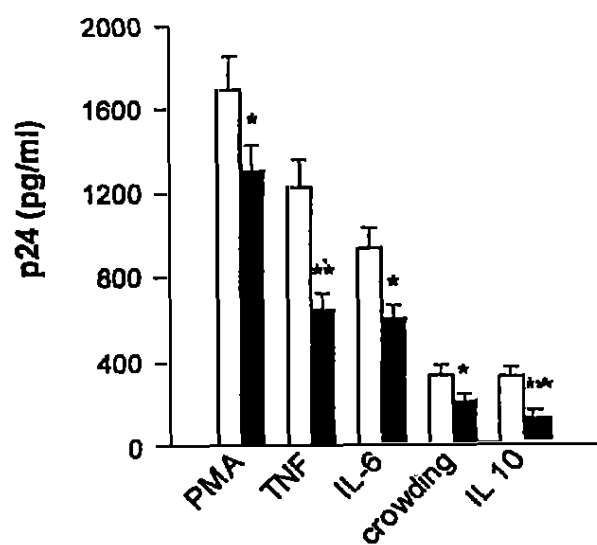
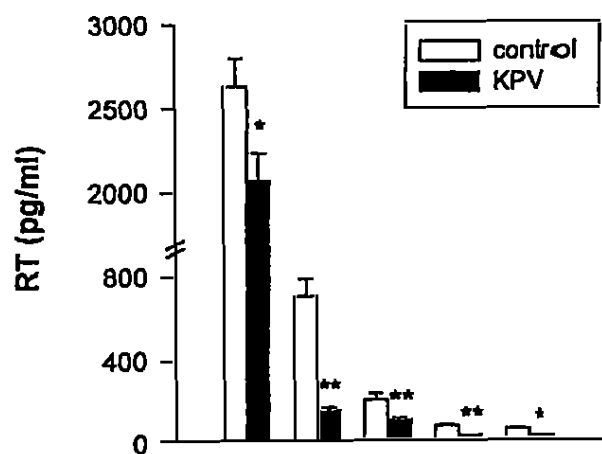


Fig 11

82

52

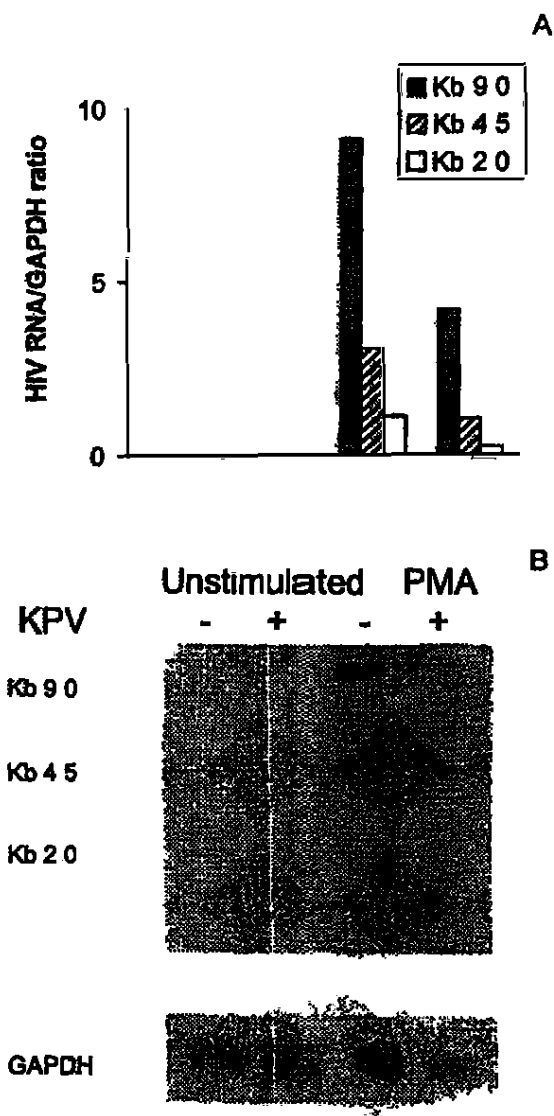


Fig 12

5/5
63

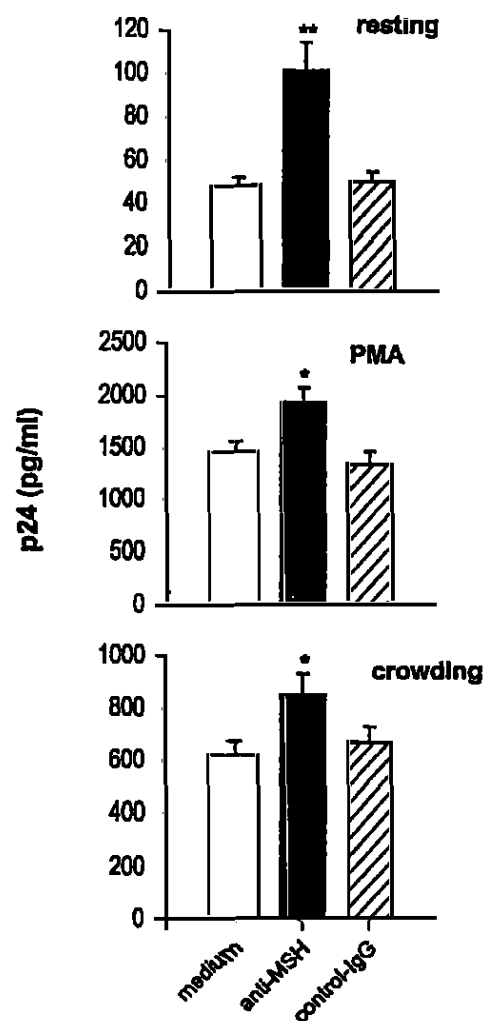


Fig 13

54
5

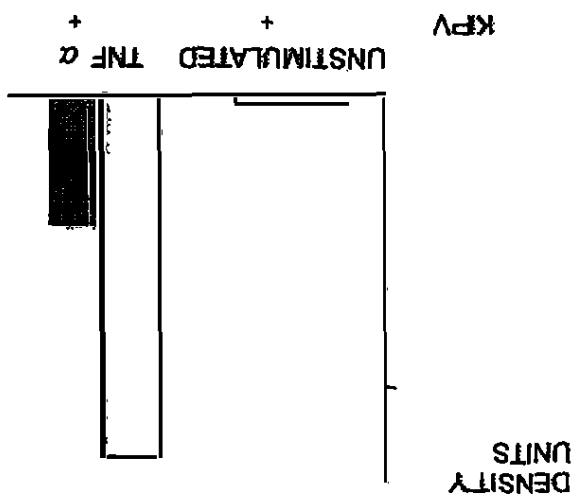


Fig 14

7/2
55

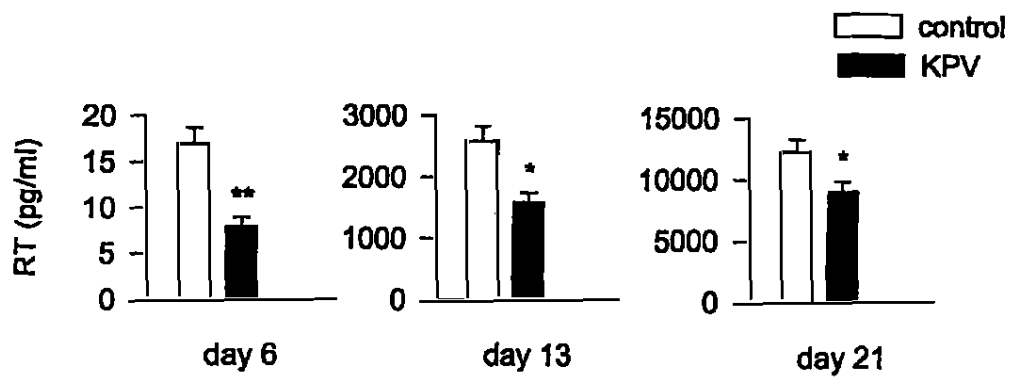


Fig 15

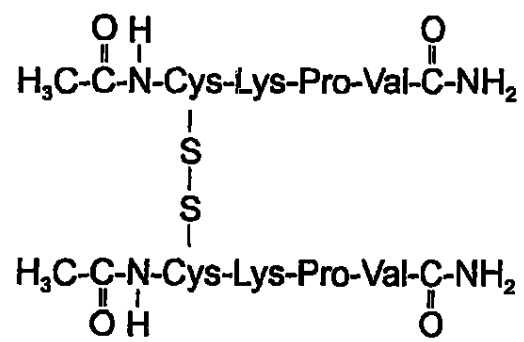


Fig 16

9/5/05

Fig 17

C. albicans (CFU)

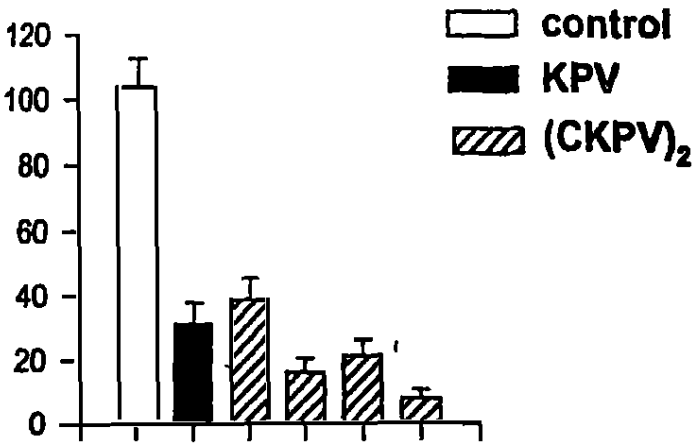


Fig 18

C. krusei (CFU)

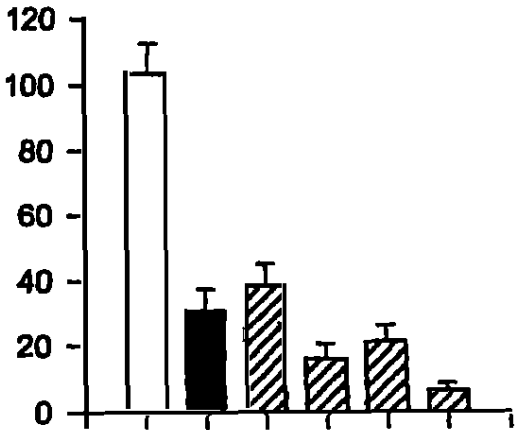
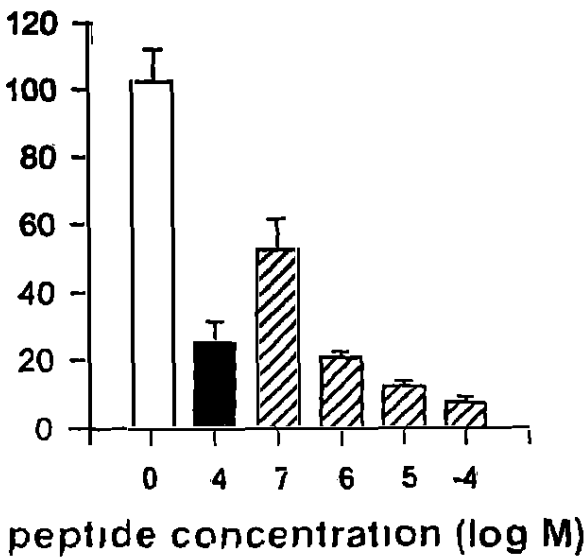


Fig 19

C. glabrata (CFU)



SEQUENCE LISTING

<110> ZENGGEN INC
Catania Anna P
Lipton James M

<120> COMPOSITION AND METHOD OF TREATMENT FOR UROGENITAL CONDITIONS

<130> 54275 8005 WO01

<150> US 10/659 053

<151> 2003-09-08

<150> US 09/535 066

<151> 2000-03-23

<150> US 60/126 233

<151> 1999-03-24

<150> US 10/442 683

<151> 2003-05-21

<150> US 60/382 887

<151> 2002-05-21

<160> 15

<170> PatentIn version 3 2

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 1

Lys Pro Val

1

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 2

Met Glu His Phe Arg Trp Gly

1

5

57

8/2
58

<210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 3

His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties/naturally occurring peptide

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5 10

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 5

Cys Lys Pro Val
1

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> C-terminal sequences of alpha-MSH/Cys is DCys

<400> 6

59

Trp Cys Lys Pro Val
1 5

<210> 7
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties/Cys is hCys

<400> 7

Arg Trp Cys Lys Pro Val
1 5

<210> 8
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties/Cys is DhCys

<400> 8

Cys Lys Pro Val
1

<210> 9
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties/naturally occurring peptide

<400> 9

Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val Gly Lys Lys
1 5 10 15

Arg Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro Ala Gly Glu Asp Asp Glu Ala Ser
20 25 30

Glu Ala Phe Pro Leu Glu Phe
35

<210> 10
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
 anti-fungal and anti-viral properties

<400> 10

Arg Pro Val Lys Val Tyr Pro Ala Glu Glu Asp Asp Glu Ala Ser Glu
 1 5 10 15

Ala Phe Pro Leu Glu Phe
 20

<210> 11
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide probes for NF- κ B

<400> 11

gat cca agg gga ctt tcc gct ggg gac ttt cca tg 35

<210> 12
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide probes for NF- κ B

<400> 12

gat cca tgg aaa gtc ccc agc gga aac tcc cct tg 35

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
 anti-fungal and anti-viral properties

<400> 13

Gly Lys Pro Val
 1

7/9
61

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 14

Trp Gly Lys Pro Val
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthesized polypeptide with anti-inflammatory anti-microbial
anti-fungal and anti-viral properties

<400> 15

Arg Trp Gly Lys Pro Val
1 5

70
62

UNA COMPOSICION Y METODO DE TRATAMIENTO PARA CONDICIONES
UROGENITALES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud es una continuación en parte de la Solicitud de Patente U S serie No 09/535 066 presentada en Marzo 23 2000 que reivindica prioridad de la Solicitud Provisional U S serie No 60/126,233, presentada en Marzo 24, 1999 La presente solicitud tambien es una continuación en parte de la Solicitud de Patente U S Serie No 10/442,683 presentada en Mayo 21 2003 que reivindica prioridad de la solicitud provisional U S Serie No 60/382 887 presentada en Mayo 21 2002, todas las cuales estan completamente incorporadas como referencia incluyendo los dibujos como si se estableciera completamente aqui

CAMPO TECNICO DE LA INVENCION

[0002] La presente invencion se relaciona con el campo del tratamiento para condiciones urogenitales

3
63**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] Las condiciones urogenitales de enfermedades afecta comunmente tanto a hombres como a mujeres. Estas condiciones incluyen infecciones y/o inflamación del sistema urinario y el sistema genital. Por ejemplo de acuerdo con el National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) la mayoría de las mujeres tendra al menos una forma de vaginitis en su vida. Vaginitis Child Health and Human Development-Publications On-line, www.nichd.nih.gov/publications/pubs/vag1.htm. Las causas de la vaginitis varian desde infecciones bacteriales, fungosas o virales a irritaciones quimicas en cremas, aspersiones o aun la ropa que está en contacto con esta area. Id. Para mujeres con infecciones bacteriales y fungosas, estos agentes infecciosos a menudo se originan desde el area del recto y migran a traves del perineo hasta alcanzar la vagina o la uretra.

[0004] Un tipo comun de vaginitis es la candidiasis o infección de la levadura que es mas comunmente originada por la *Candida albicans*. Las especies *Candida* son parte de la flora de organismos microbiales normales en los individuos presente en la piel, boca y el tracto

64

gastrointestinal *Robbins Pathologic Basis of Disease 5th*
ed Saunders Co , Filadelfia (1994) p 354 Ellos tambien
viven en pequeños numeros en la vagina de la mujer Ellos
crecen mejor en superficies calientes, humedas tal como la
vagina o la cavidad oral Ellas son normalmente no
patogenas pero cuando ocurre un cambio en su ambiente
tal como en la respuesta a los cambios hormonales de la
mujer en la menopausia embarazo o en respuesta al
estrés ellos pueden sobrecrecer para originar una
infección de levadura Estos cambios tambien pueden
ocurrir en individuos inmunosuprimidos o comprometidos tal
como las personas con tratamiento de quimioterapia, que
esta tomando inmunosupresores o que estan afligidas con
SIDA

[0005] El tratamiento habitual para la candidiasis
incluye drogas sin prescripción con ingredientes activos
tales como nitrato de butoconazol (Femstat[®]) clotrimazol
(Gyne-Lotreimin[®] y otros), miconazol (Monistat[®] y otros), y
tioconazol (Vagistat[®]) Estas drogas son aplicadas
topicamente en la vagina y descomponen la pared celular de
la *Candida* Otros tratamientos similares incluyen drogas
de prescripcion con ingredientes activos de la misma
familia tal como fluconazol (Diflucan[®]) terconazol
(Terazol[®]) y ketoconazol (Nizoral[®])

73
69

[0006] Aunque la vaginitis ha estado comunmente asociada con la *Candida*, la vaginosis bacterial es de hecho la infección vaginal mas comun en las mujeres en edad reproductiva de acuerdo con el NICHD Vaginitis supra El sobrecrecimiento de bacterias en la vagina es la causa que origina la vaginosis bacterial como *Candida*, pero las drogas utilizadas para su tratamiento son diferentes

[0007] De otra parte los hombres tambien pueden contraer infecciones por *Candida* en su pene que involucra los glandes y el prepucio La balanopostitis, una infección no especifica del glande y el prepucio por una amplia variedad de organismos que incluyen hongos tales como las bacterias *Candida* y pirogenia tales como *Estafilococos Sp Robbins Pathologic Basis of Disease 5th ed* , Saunders Co , Filadelfia (1994), p 1008

[0008] Los *Estafilococos* son bacterias gram positivas que están normalmente presentes en la piel y otras membranas de las mucosas del cuerpo El *estafilococos aureus* en particular es un patogeno virulento que origina una miriada de condicione y enfermedades que van desde lesiones de la piel, endocarditis, infección respiratoria envenenamiento por alimentos y sindromes de choque toxico

66

Para las mujeres que utilizan tampones altamente absorbentes, es conocido que el *S aureus* puede colonizar la vagina y secretar una toxina denominada toxina de síndrome de choque tóxico (TSST-1). De acuerdo con la administración de alimentos y drogas, aproximadamente la mitad de los casos de síndrome de choque tóxico reportados hoy están asociados con tampones usados durante la menstruación y usualmente en mujeres jóvenes. Tampons and Asbestos, Dioxin & Toxic Shock Syndrome FDA Center for Devices and Radiological Health (Julio 23 1999), www.fda.gov/cdrh/ocd/tamponsabs.html

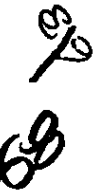
[0009] Las infecciones por *S aureus* son comunmente tratadas con meticilina. Aunque son muy efectivas, algunas cepas de *S aureus* han desarrollado resistencia a la meticilina, y solo unos pocos antibióticos pueden tratar exitosamente las infecciones de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Uno de estos antibióticos comunmente utilizados para MRSA es la vancomicina. Una cepa de *S aureus*, sin embargo, con susceptibilidad reducida a la vancomicina (VISA) ya ha sido identificada. Khurshid M A, et al, Staphylococcus aureus with Reduced Susceptibility to Vancomycin -Illinois, 1999 *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48 (51) 1165-1167 (2000) www.cdc.gov/epo/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4851a1.htm La

7
67

emergencia de cepas bacteriales resistentes a antibioticos ha creado la necesidad de formas alternativas de combatir infecciones bacteriales

[0010] Ademas de la infeccion por hongos y bacterias la vaginitis viral tambien es comun Estas infecciones son mas a menudo transmitidas a través del intercurso sexual La vaginitis viral incluye la infeccion por el virus herpes simplex (HSV) o el papilomavirus humano (HPV) Los virus HSV, por ejemplo, se replican en el area genital que es el sitio de entrada y tambien infectan las neuronas que enervan los genitales Para evitar el sistema inmune del cuerpo los virus HSV pueden permanecer latentes en estas neuronas y volver a reactivarse en respuesta a condiciones ambientales tales como el estres la inmunosupresion, la irradiación, o la infeccion viral Los tratamientos habituales para HSV incluyen drogas tales como el aciclovir, el famciclovir o valaciclovir

[0011] Como para el sistema urinario, de acuerdo con la Asociacion Medica Americana, las infecciones del tracto urinario (UTI) son uno de los desordenes mas comunes que urgen la visita al medico Women's Health, Urinary Tract Infections A Patient's Guide to Treatment, AMA Health Insight, On-Line Health Information for Everyone



assn org/insight/h_focus/wom_hlth/uti/uti htm Estas infecciones son originadas mas a menudo por la *Escherichia coli*, pero también pueden involucrar organismos tal como la *Candida Sp* y los *Estafilococos Sp* Id Estas infecciones pueden iniciar en la uretra y viajar hasta la vejiga originando cistitis. Finalmente estas aun pueden ascender a los riñones a traves de la uretra y originar pielonefritis. Ambos sistemas urinarios tanto del hombre como de la mujer pueden infectarse con estos microorganismos.

[0012] En razon a que las condiciones urogenitales no estan confinadas a una causa simple los tratamientos habituales requieren diferentes drogas para tratar causas especificas. Estas causa tienen que ser identificadas primero. La identificacion requiere tiempo pero mas aun requiere un examen ginecologico para las mujeres que determine los agentes infecciosos específicos o la falta de estos.

[0013] Con el uso creciente de antibioticos y otras drogas los microorganismos, tal como el *Estafilococos aureus* resistente a la meticilina, han desarrollado crecientemente resistencia a las drogas habitualmente disponibles. Asi, subsiste la necesidad continua de nuevas

clases de drogas que puedan combatir un amplio espectro de agentes infecciosos. Se ha descubierto que los dímeros que comprenden Lisina-Prolina-Valina así como también basados en alfa-MSH descritos aquí son efectivos en el tratamiento de condiciones urogenitales.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención está dirigida a un sistema para tratar las condiciones urogenitales. Un aspecto de esta invención involucra el tratamiento que comprende uno o más polipeptidos con una secuencia de aminoácidos que incluye KPV (ID de SEC No 1), MEHFRWG (ID de SEC No 2), HFRWGKPV (ID de SEC No 3), VPKC (ID de SEC No 5) -s-sCKPV (ID de SEC No 5) o SYSMEHFRWGKPV (ID de SEC No 4) para el tratamiento de condiciones urogenitales. El VPKC-s-s-CKPV es un ejemplo de un dímero KPV en donde el enlace disulfuro existe entre la cisteínas N-terminales de cada monómero. Aquí en esta descripción el dímero CKPV será el término utilizado para identificar esta forma de dímero KPV es decir, dos monómeros CKPV ligados a través de un enlace de disulfuro, es decir de VPKC (ID de SEC No 5) -s-s-CKPV (ID de SEC No 5). Se contempla que otros dímeros KPV se pueden utilizar en la composición descrita.

20

[0015] Las condiciones urogenitales pueden incluir infecciones inflamación, o ambas En una modalidad preferida de la invención la condición urogenital incluye infección y/o inflamación de la vagina la vulva el tracto urinario, el pene, y/o el recto En otra modalidad preferida de la invención, los uno o mas polipéptidos son disueltos en un portador En otra modalidad preferida de la invención los uno o mas polipéptidos están asociados con un tampón para evitar el síndrome de choque toxico En otra modalidad preferida el uno o mas polipeptidos estan asociados con un contraceptivo para la prevencion de enfermedades o infecciones sexualmente transmitidas En otra modalidad preferida el uno o mas polipeptidos estan asociados con un supositorio para la inserción en la vagina o el recto En otra modalidad preferida de la invención el uno o más péptidos estan disueltos en un portador liquido para duchar la vagina

[0016] En un aspecto de la invención, se describe una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de condiciones urogenitales que comprende un dimero KPV, agentes preservativos un solvente, un alcalizador un polimero basado en acido acrilico y un agente gelatinizante

7c
71

[0017] En otro aspecto de la invención, una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de condiciones urogenitales comprende un polímero basado en ácido acrílico por ejemplo Carbopol®, National Formulary (aquí NF) propilparabeno NF metilparabeno NF propileglicol Farmacopea de los Estados Unidos (aquí USP) ácido edético (aquí EDTA), USP el dímero CKPV, (que también se identifica por la marca CZEN002™) el Ingrediente Farmacéutico Activo (aquí API) solución de hidróxido de sodio 2M (aquí NaOH) y agua estéril para inyección USP. Se contempla que ciertos ingredientes listados pueden ser modificados, reemplazados o eliminados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0018] La figura 1 muestra los efectos inhibidores de los péptidos alfa-MSH en el crecimiento de *S aureus*.

[0019] La figura 2 muestra los efectos de los péptidos alfa-MSH sobre el crecimiento inducido por uroquinasa de *S aureus*.

[0020] La figura 3 muestra los efectos inhibidores de los péptidos alfa-MSH sobre el crecimiento de *C albicans*.

27
72

[0021] La figura 4 compara las actividades anti-fungosas de los peptidos alfa-MSH con fluconazol

[0022] La figura 5A a 5D muestran los efectos inhibidores de los péptidos alfa-MSH sobre la formacion del germen de tubo de *C albicans*

[0023] La figura 6 muestra los efectos de muerte del neutrófilo mejorado de los peptidos alfa-MSH contra *C albicans*

[0024] Las figuras 7, 8 y 9 muestran el mecanismo por medio del cual los péptidos alfa-MSH inhiben el crecimiento de *C albicans*

[0025] Las figuras 10-13 muestran los efectos inhibidores de los peptidos alfa-MSH sobre la replicacion viral y la expresión en células cronicamente infectadas

[0026] La figura 14 muestra los mecanismos por medio de los cuales los peptidos alfa-MSH inhiben la replicacion, la expresión y reactivación viral

73

[0027] La figura 15 muestra los efectos inhibidores de los peptidos alfa-MSH sobre replicacion viral la expresi3n en celulas agudamente infectadas

[0028] La figura 16 muestra una representaci3n de una estructura quimica de un d3mero KPV

[0029] La figura 17 muestra que la misma molaridad del dimero KPV (el dimero C<PV) es mas de dos veces tan efectiva como el monomero KPV para tratar *C albicans*

[0030] La figura 18 muestra que la misma molaridad del dimero KPV (el dimero C<PV) es mas de dos veces tan efectiva como el monomero KPV para tratar *C krusei*

[0031] La figura 19 muestra que la misma molaridad del dimero KPV (el dimero C<PV) es m3s de dos veces tan efectiva como el mon3mero KPV para tratar *C glabrata*

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

[0032] Las referencias citadas aqui se incorporan aqui como referencia tal como se establece aqui La presente invencion involucra la ccposicion y m3todo para tratar las condiciones urogenitales con los usos de hormonas

J
14

estimulantes, péptidos y dímeros de esta Alfa-MSH es un péptido de trece aminoácidos antiguo (ID de SEC No 4) producido mediante procesamiento post-transduccional de la molécula precursora mayor proopiomelanocortina. Esta comparte la secuencia de aminoácido 1-13 con la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), también derivada de la proopiomelanocortina. El alfa-MSH es conocido por ser secretado por muchos tipos de células que incluyen las células pituitarias, los monocitos, los melanocitos, y los queratinocitos. Este se puede encontrar en la piel de las ratas, en la piel humana o en la barrera de mucosa del tracto gastrointestinal en ratas intactas, hipofisectomizadas. Ver por ejemplo, Eberle A N Melanotrophins Karger Basel Switzerland (1998) Lipton J M, et al Anti-inflammatory Neuroimmunomodulator alpha-MSH, *Immunol Today* 18, 140-145 (1997) Thody, A J et al MSH Peptides are Present in Mammalian Skin, Peptides 4, 813-815 (1983) Fox, J A et al, Immunoreactive α -Melanocyte Stimulating Hormone, Its Distribution in the Tract of Intact and Hypophysectomized Rats *Life Sci* 18, 2127-2132 (1981)

[0033] Los péptidos alfa-MSH son conocidos por tener potentes propiedades antipiréticas y anti-inflamatorias, teniendo ellas una toxicidad extremadamente baja. Ellas

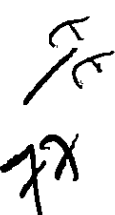


pueden reducir la producción de mediadores proinflamatorios de células huéspedes in Vitro, y también pueden reducir la producción de reacciones locales y sistémicas en modelos de animales para inflamación. La secuencia alfa-MSH núcleo (ID de SEC No 2), por ejemplo, tiene efectos de aprendizaje de memoria pero poca actividad antipirética y anti-inflamatoria. Como contraste, la secuencia de mensaje activo para las actividades antipiréticas y anti-inflamatorias residen en la secuencia de aminoácido C-terminal de alfa-MSH, esto es Lisina-Prolina-Valina (Lys-Pro-Val o KPV) (ID de SEC No 1). Este tripeptido tiene actividades in vitro e in vivo que son paralelas con aquellas de la molécula padre. La actividad anti-inflamatoria de los péptidos alfa-MSH se describen en las siguientes dos patentes, que se incorporan aquí como referencia: Patente U S No 5 028,592, emitida en Julio 2, 1991 por Lipton J M titulada Antipyretic and Anti-inflammatory Lys Pro Val Compositions y Method of Use; Patente U S No 5,157,023, emitida en Octubre 20 1992 por Lipton, J M titulada Antipyretic y Anti-inflammatory Lys Pro Val Compositions y Method of Use; ver también Catania A et al α -Melanocyte Stimulating Hormone in the Modulation of Host Reactions *Endocr Rev* 14, 564-576 (1993); Lipton, J M et Al, Anti-inflammatory Influence of the

76

Neuroimmunomodulator alpha-MSH, *Immunol Today* 18 140-145 (1997) Rajora, N, et al alpha-MSH Production Receptors and Influence Neopterin in a Human Monocyte/macrophage Cell Line *J Leukoc Biol* 59, 248-253 (1996) Star R A et Al Evidence of Autocrine Modulation of Macrophage Nitric Oxide Synthase by alpha-MSH, *Proc Nat l Acad Sci (USA)* 92, 8015-8020 (1995) Lipton J M et Al Anti-inflammatory Effects of the Neuropeptide alpha-MSH in Acute Chronic and Systemic inflammation *Ann N Y Acad Sci* 741 137-148 (1994) Fajora N, et Al, alpha-MSH Modulates Local and Circulating Tumor Necrosis Factor α in Experimental Brain Inflammation, *J Neuroosci*, 17, 2181-2186 (1995) Richards D B, et al, Effect of α -MSH (11-13) (Hisien-proline-valine) on Fever in the Rabbit, *Peptides* 5 815-817 (1984) Hiltz M E et al, Anti-inflammatory Activity of a COOH-terminal Fragment of the Neuropeptide alpha-MSH, *FASEB J* 3, 2282-2284 (1989)

[0034] Ademias de su funcion anti-inflamatoria y antipiretica, un aspecto de la presente invencion involucra la actividad anti-microbial o anti-infeccion de los péptidos alfa-MSH Como se describe adelante, los peptidos alfa-MSH tienen usos anti-infeccion significativos que incluyen Por ejemplo, el uso para



reducir la viabilidad de microbios, que reducen la germinación de levaduras, que matan los microbios sin reducir la muerte de los microbios por neutrófilos humanos, para tratar la inflamación asociada con infección microbiana sin reducir la muerte de microbios, incrementando la acumulación de cAMP en microbios, e inhibiendo la replicación y expresión de patógenos virales

[0035] En una modalidad preferida de la invención estas actividades anti-microbianas o anti-infección están más particularmente asociadas con la secuencia de aminoácido C-terminal-KPV (ID de SEC No 1) Este tripeptido, junto con sus dímeros y otros péptidos alfa-MSH, son efectivos sobre un amplio rango de concentraciones, que incluyen concentraciones picomolares que ocurren normalmente en el plasma humano Las concentraciones nanomolares y micromolares producen concentraciones más potentes

[0036] Como se discute en la sección de antecedentes las condiciones urogenitales no están confinadas a una causa simple Los organismos múltiples y los agentes infecciosos, provenientes de bacterias y hongos hasta virus, individualmente o en combinación, pueden originar una amplia variedad de condiciones que incluyen vaginitis,

-8
78

vulvitis, uretritis, balanofostitis, candidiasis, enfermedades sexualmente transmitidas, y síndrome de choque tóxico. Para el tratamiento de estas condiciones se pueden aplicar péptidos alfa-MSH localmente al sitio de la infección y/o inflamación por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos alfa-MSH se pueden disolver en soluciones tales como solución salina amortiguadora de fosfato, hialuronato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o etanol. Los portadores comunes tales como ungüento, cremas, geles, píldora disoluble, aspersor en aerosol, supositorios, solución líquida para duchas o material absorbente de tampones pueden llevar péptidos alfa-MSH como ingredientes activos para tratar las condiciones urogenitales. Estos portadores se pueden aplicar en el sitio de la infección o a la inflamación tal como jeringas o aparatos similares a jeringas, vendajes, catéteres, tubos con embozo, espátulas u otros tipos de aplicadores de superficie, condones, esponjas, diafragmas, aplicadores de tampón o dedo.

[0037] Más específicamente, una modalidad preferida de la invención es disolver los péptidos alfa-MSH en un portador basado en líquido. El portador que lleva los péptidos alfa-MSH solvatados son luego almacenados en un frasco presurizado. Luego de la liberación del portador

5
79

mediante una valvula liberadora u otro mecanismo proveniente del frasco pre urizado, se forma una espuma de aerosol y se captura en una jeringa o un aparato de tipo jeringa La jeringa es luego parcialmente insertada en la vagina y su contenido suministrado al canal vaginal La jeringa o el aparato tipo jeringa y su abertura puede ser moldeados sobre diferentes tamaños, formas y longitudes para acomodar la inserción a diferentes areas urogenitales tales como la uretra y tambien se puede utilizar en el recto

[0038] Otra modalidad preferida de la invencion es un supositorio que comprende un portador Este portador tal como gel o glicerina es solido o semi sólido a temperatura ambiente, pero se funde a temperatura del cuerpo cuando se inserta en la vagina o el recto Este portador que lleva los peptidos alfa-MSH solvatados se suministra en el sitio de la condicion urogenital cuando el portador se funde

[0039] El suministro de los peptidos alfa-MSH al área exterior del area urogenital tal como la vulva o los glandes y el prepucio del pene se puede lograr al aplicar topicamente una crema, unguento, gel, aspersion, o

20

balsamo cuyas composiciones son bien conocidas en la tecnica

[0040] En otro aspecto de la invencion, los tampones pueden ser tratados con peptidos alfa-MSH durante el proceso de elaboracion. La presencia de alfa-MSH en tampones pueden inhibir el crecimiento de microorganismos tales como *Estafilococos aureus* que secretan la toxina del sindrome de choque toxico (TSST-1). Los procesos para la elaboracion de tampones son ya conocidos en la técnica. El tratamiento de material absorbente de tampones con alfa-MSH o sus derivados se puede lograr al embeber primero el material absorbente en una solucion de peptidos alfa-MSH. El material absorbente se le permite entonces secarse. Alternativamente, alfa-MSH puede ser asperjado sobre el material absorbente del tampon como un polvo seco.

[0041] En otro aspecto de la invención, los peptidos alfa-MSH se pueden suministrar al sitio de la infeccion al utilizar contraceptivos tales como condones, diafragmas, esponjas u otros mecanismos tipo barrera utilizados para evitar el embarazo o las enfermedades sexualmente transmitidas. Los peptidos alfa-MSH se pueden disolver en el lubricante utilizado en los condones, el gel o espuma utilizada junto con el diafragmas o en cualquier otra

10
B1

solucion espermicida utilizada en conjunto con los condones, los diafragmas o las esponjas

[0042] En otro aspecto de la invencion los peptidos alfa-MSH se pueden disolver en un liquido para uso con una ducha El liquido se puede suministrar mediante la ducha en la vagina para tratar infeccion y/o inflamación

[0043] En otro aspecto de la invención, una composición farmaceutica para uso en el tratamiento de condiciones urogenitales comprende un dimero CKPV (ID de SEC No %), agentes preservativos un solvente, un alcalizador Carbopol®, y un agente gelatinizante La composición puede ademas comprender un agente quelante Estos ingredientes se pueden modificar reemplazar o eliminar Un dimero CKPV (ID de SEC No 5) se prefiere sobre otros peptidos alfa-MSH utiles tal como se ha mostrado mas eficaz para el tratamiento de vaginitis ver, Ejemplo XII adelante

[0044] En otro aspecto de la invención, se describe una composición farmaceutica para uso en el tratamiento de condiciones urogenitales en donde dicha composicion comprende un polimero basado en acido acrilico por ejemplo Carbopol®, NF propilparabeno, NF metilparabeno NF propileglicol, USP EDTA USP CKPV (ID de SEC No

5) API NaOH 2M y agua esteril para inyección USP Se describe adelante al menos una modalidad de la invención presentada en un dimero CKPV 0.1% (ID de SEC No 5) tanda de la composición que pesa aproximadamente 4 Kg. Un rango contemplado de porcentajes de componentes individuales de la invención se describen para diferentes cantidades de tamaño de la invención.

[0045] Un tipo de polímero basado en ácido acrílico es el Carbopol®. El Carbopol es una marca registrada para polímeros basados en ácido acrílico reticulado de alto peso molecular disponible de Noveon Pharmaceuticals www.pharma.noveon.com/products/carbopol.asp. La cantidad de Carbopol® para el uso en la composición descrita varía desde al menos aproximadamente 60 a 100 g o al aproximadamente 1.5-2.5% de la composición. Una cantidad preferida del Carbopol® es al menos aproximadamente 80 g o al menos aproximadamente 2% de la composición. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que otros agentes gelificantes conocidos puedan ser utilizados además de o en lugar de Carbopol, siempre y cuando ellos sean efectivos para formar un gel.

[0046] El propilparabeno, o propilester de ácido 4-hidroxibenzoico, es un preservativo bien conocido. Ver

27
83

The Merck Index p 1041, (Merck Research Laboratories 1996) La cantidad de propilparabeno para uso en la composicion descrita varia desde al menos aproximadamente 1-3 g o 0.025-0.075% de la composición. Una cantidad preferida del propilparabeno es al menos aproximadamente 2 g o al menos aproximadamente 0.05% de la composicion.

[0047] El metilparabenc, o metilester de acido 4-hidroxibenzoico, es un preservativo bien conocido. Ver The Merck Index p 1041, 12th Ed (Merck Research Laboratories, 1996) La cantidad de metilparabeno para uso en la composición descrita varia desde al menos aproximadamente 4-8 g o al menos aproximadamente 0.1-0.2% de la composición. Una cantidad preferida del metilparabeno es al menos aproximadamente 6 g o al menos aproximadamente 0.15% de la composicion.

[0048] Los preservativos pueden tambien ser seleccionados del grupo que consiste de fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno propilparabeno, y sorbato de potasio y combinaciones de estos.

[0049] El propilenglicol o 1,2-propanodiol, es un solvente bien conocido con muchos usos en muchas areas de

70
84

la química Ver, The Merck Index p 1348, 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996) La cantidad de propilenglicol para uso en la composición descrita varia desde al menos aproximadamente 200-600 g a al menos aproximadamente 5-15% de la composición Una cantidad preferida del propilenglicol es al menos aproximadamente 400 g o al menos aproximadamente 10% de la composición

[0050] El solvente tambien se puede seleccionar del grupo que consiste de etanol fenol, acetona glicerol e isopropanol y combinaciones de estos

[0051] EDTA o N N'-1,2-etanodilbis[N-(carboximetil)glicina] es un agente quelante bien conocido Ver The Merck Index p 593, 12th Ed (Merck Research Laboratories 1996) La cantidad de EDTA para uso en la composición descrita varia desde al menos aproximadamente 2-6 g o 0.05-0.15% de la composición Una cantidad preferida del EDTA es al menos aproximadamente 4 g o al menos aproximadamente 0.1% de la composición

[0052] El agente quelante tambien se puede seleccionar del grupo que consiste de Coenzima Q10, Zinc L-Cisteina, L-Mecionina L-Lisina y EDTA y combinaciones de estos

7
85

[0053] El dimero CKPV (ID de SEC No 5) es una forma de dimero que se puede utilizar con la presente invencion La cantidad de CKPV (ID de SEC No 5) para uso en la composicion descrita varia desde al menos aproximadamente 2-6 g o 0.05-0.15% de la composicion Una cantidad preferida de un dimero CKPV (ID de SEC No 5) es al menos aproximadamente 4 g o 0.1% de la composicion

[0054] Una solucion de NaOH 2M es un caustico bien conocido utilizado como alcalizador Ver, The Merck Index p 1477-8 12th Ed (Merck Research Laboratories, 1996) La cantidad de NaOH 2M para uso en la composicion descrita varia es aquella cantidad suficiente para llevar la composicion a un pH preferido de 4.0 ± 0.1

[0055] El alcalizador se puede seleccionar del grupo que consiste de N-(2-Hidroxietil)piperazina-N -(2-acido etanosulfonico) (aqui HEPES), NaOH 2M acido 2-(N-Morfolino) etanosulfonico (aqui hidrato MES) acido 3-(N-Morfolino) propanosulfonico (aqui MOPS) acido N-tris[Hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfonico (aqui TAPS), bis(2-Hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano (aqui Bis-Tris) o combinaciones de estos

86

[0056] El agua estéril para inyección es un agente gelatinizante comunmente conocido y utilizado cuando se toman polvos u otros solidos a geles El agua esteril para uso en la composicion descrita es aquella cantidad suficiente y hasta al menos aproximadamente 3,500-3,550 g o al menos aproximadamente 87-89% de la composicion

[0057] Otros agentes gelatinizantes tambien se pueden seleccionar del grupo que consiste de agua agua esteril, agua destilada, solucion salina esteril y combinaciones de estos

[0058] Una tanda 4 Kg de gel dimero CKPV 0 1% (ID de SEC No 5) de la composición preferiblemente comprende

Carbopol® NF	80 0 g
Propilparabeno NF	2 0 g
Metilparabeno NF	6 0 g
Propilenglicol, USP	400 0 g
EDTA USP	4 0 g
El dimero CKPV (ID de SEC No 5), API	4 0 g
Solucion de NaOH 2M	Cantidad suficiente para pH 4 0 ± 0 1
Agua esteril para inyeccion USP	3504 g

27
87

[0059] Como se describió anteriormente y adelante una cantidad efectiva del dímero CKPV (ID de SEC No 5) cuando se utiliza como terapéutico, varía en concentraciones picomolares a nanomolares. Las concentraciones micromolares son más potentemente efectivas. La dosis de la composición farmacéutica descrita aquí varía desde 50-150 µg/ml. Una dosis preferida de la composición farmacéutica descrita aquí es 100 µg/ml.

[0060] Los siguientes ejemplos demuestran la capacidad y aplicación de los péptidos alfa-MSH para combatir la infección. Los métodos en microbiología, biología molecular, y cultivos de células utilizados pero no explícitamente descritos en esta descripción ya han sido ampliamente reportados en la literatura científica. Estos métodos están dentro de la capacidad de un experto en la técnica.

[0061] Los péptidos utilizados en los siguientes ejemplos incluyen un dímero de CKPV (ID de SEC No 5), alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4), (4-10) (ID de SEC No 2), (6-13) (ID de SEC No 3) y (11-13) (ID de SEC No 1), todos los cuales son N-acetilados y C-amidatados, y ACTH (1-39) (ID de SEC No 9) y (18-39) (ID de SEC No

10) (CLIP) Estos péptidos son preparados mediante síntesis de péptido de fase sólida y purificados mediante cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa. La figura 16 muestra una representación de una estructura química para un dímero KPV, es decir el dímero CKPV (ID de SEC No 5). Los dímeros se pueden formar al agregar cisteínas en el N-terminal de cualquiera de los anteriores polipéptidos y le permiten a la cisteína de los dos polipéptidos formar un enlace disulfuro. Ambos homodímeros y heterodímeros se pueden formar utilizando este método.

[0062] Un dímero KPV se puede formar cuando el N-terminal de dos péptidos KPV están unidos por un ligador. El VPKC (ID de SEC No 5) -s-s CKPV (ID de SEC No 5) es un ejemplo de un dímero KPV formado al agregar una cisteína al N-terminal de un péptido de KPV y permitirle a las cisteínas de, entonces, dos péptidos CKPV formar un enlace disulfuro (-s-s-). En otras palabras el VPKC (ID de SEC No 5) -s-s CKPV (ID de SEC No 5) se forma cuando dos péptidos KPV (ID de SEC No 1) están ligados por un ligador -Cys-s-s-Cys-. El ligador puede ser cualquier clase de unión química que enlace los N-terminales de dos péptidos KPV juntos. Se prefiere que el ligador sea -Cys-s-s-Cys-, -DCys-s-s-Cys-, -Pen-s-s-Cys-, -Pen-s-s-DCys-, -DPen-s-s-Cys-, -DPen-s-s-DCys-, -DPen-s-s-

DPen- -Pen-s-s-Pen hCys-s-s-Cys-, -hCys-s-s-DCys- -hCys-s-s-hCys- DhCys-s-s-DhCys-, -DhCys-s-s-hCys- hCys-s-s-Pen-, hCys-s-s-DPen- o-DhCys-s-s-DPen-

[0063] Es mas preferible que el ligador sea -Cys-Cys- El termino Pen se refiere a Penicilamina El termino Cys se refiere a cisteina El termino hCys se refiere a homocisteina El prefijo D se refiere a la forma dextro de un aminoacido De acuerdo, con esto se prefiere que el dimero KPV sea VPK-Cys (ID de SEC No 5)-s-s-Cys-KPV (ID de SEC No 5), VPK-DCys (ID de SEC No 6)-s-s-Cys-KPV (ID de SEC No 5), VPK-Pen-s-s-Cys-KPV (ID de SEC No 5) VPK-Pen-s-s-DCys-KPV (ID de SEC No 6), VPK-DPen-s-s-Cys-KPV (ID de SEC No 5), VPK-DPen-s-s-DCys-KPV (ID de SEC No 6) VPK-DPen-s-s-DPen-KPV, VPK-Pen-s-s-Pen-KPV, VPK-hCys (ID de SEC No 7)-s-s-Cys KPV (ID de SEC No 5), VPK-hCys (ID de SEC No 7)-s-s-DCys KPV (ID de SEC No 6), VPK-hCys (ID de SEC No 7)-s-s-hCys-KPV (ID de SEC No 7), VPK-DhCys (ID de SEC No 8)-s-s-DhCys-KPV (ID de SEC No 8) VPK-DhCys (ID de SEC No 8)-s-s-hCys-KPV (ID de SEC No 7), VPK-hCys (ID de SEC No 7)-s-s-Pen-KPV VPK-hCys (ID de SEC No 7)-s-s-DPen-KPV o VPK-DhCys (ID de SEC No 8)-s-s-DPen-KPV Es mas preferido que el dimero KPV un dimero CKPV (ID de SEC

2
90

No 5) por ejemplo, VPK-Cys (ID de SEC No 5)-s-s-Cys-KPV (ID de SEC No 5)

[0064] Aunque las secuencias de aminoácidos específicas descritas aquí son efectivas, es claro para aquellos familiarizados con la técnica que los aminoácidos pueden ser sustituido en la secuencia de aminoácidos suprimidos sin alterar la efectividad de los péptidos. Así diferentes dímeros KPV son contemplados en la descripción. Además es conocido que la estabilización de la secuencia alfa-MSH pueda incrementar grandemente la actividad del péptido y que la sustitución de las formas de D-aminoácido por formas L pueda mejorar o disminuir la efectividad de los péptidos. Por ejemplo, un análogo estable de α -MSH [NLe⁴ D-Phe⁷] α -MSH, que es conocido por tener una actividad biológica marcada sobre melanocitos y células de melanoma, es aproximadamente diez veces más potentes que el péptido padre para reducir la fiebre. M and Lipton, J M, Antipyretic Activity of a Potent α -MSH Analog, Peptides 6 273-5 (1985). Adicionalmente, agregar aminoácidos a las secuencias α -MSH C-terminal (11-13) puede reducir o mejorar la potencia antipirética (Deeter, L B Martin, L W Lipton, J M Antipyretic Properties of Centrally Administered α -MSH Fragments in the Rabbit Peptides 9, 1285-8 (1989). La adición de

F
a1

glicina para formar la secuencia 10-13 disminuye ligeramente la potencia la secuencia 9-13 se debe casi a la actividad, mientras que la potencia de la secuencia 8-13 es mayor que aquella de la se 11-13 Es conocido que el AC-[D-K¹¹] α -MSH 11-13-NH₂ tiene la misma potencia general que la forma L del tripeptido α -MSH 11-13 Hiltz M E Catania, A Lipton, J M , Anti inflammatory Activity of α -MSH (11-13) Analogs Influences of Alterations in Stereochemistry, *Peptides* 12, 767-71 (1991)

[0065] La sustitucion con la forma D de valina en la posicion 13 o con la forma D de lisina en la posición 11 mas la forma D de valina en la posicion 13 dieron como resultado una mayor actividad anti-inflamatoria que con la forma L de tripeptido Asi un dimero creado con la forma D puede ser otro dimero KPV efectivo Estos ejemplos indican que las alteraciones en las características del aminoacido de los peptidos puede influenciar la actividad de los peptidos o tener poco efecto, dependiendo de la naturaleza de la manipulación Se cree que los equivalentes funcionales biologicos pueden ser obtenidos mediante sustitucion de aminoácidos que tiene valores hidropaticos similares Asi por ejemplo, la isoleucina y la leucina que tienen un indice hidropatico +4.5 y +3.8 respectivamente, pueden se sustituidos por valina que

24
12

tiene un índice hidropático de +4.2 y obtener aun una proteína que tenga actividad biológica similar. Alternativamente, en otro extremo de la escala la lisina (-3.9) se puede sustituir por arginina (-4.5) y así sucesivamente. En general se cree que los aminoácidos pueden ser exitosamente sustituidos cuando tales aminoácidos tengan una calificación hidropática dentro de aproximadamente +/- 1 unidad de índice hidropático del aminoácido reemplazado. Las propiedades antimicrobiales de los equivalentes funcionales biológicos se pueden medir a través de su efecto inhibitorio de las unidades formadoras de colonia en bacterias u hongos, o a través de su efecto inhibitorio sobre la expresión o transcripción del HIV como se describe en los ejemplos de la descripción de esta invención.

[0066] La significancia estadística descrita en los ejemplos de adelante se analiza utilizando análisis de varianza de una vía y la prueba ensayo Student. Los valores de probabilidad mayores de 0.05 se consideran significativos.

EJEMPLO I

2
q3

[0067] Este ejemplo ilustra las propiedades anti-microbiales de los péptidos alfa-MSH contra *Estafilococos aureus*

[0068] Los cultivos de *S aureus* (ATCC 29213) se obtuvieron de la colección del Departamento de Microbiología, Ospedale Maggiore di Milano *S aureus* 1×10^6 /ml en una solución de sal balanceada de Hank) se incubaba en la presencia o ausencia de alfa-MSHH (1-13) (ID de SEC No 4), (11-13) (ID de SEC No 1), o el dímero CKPV (ID de SEC No 5) a concentraciones en el rango de 10^{-15} a 10^{-4} M durante dos horas a 37° C las células son entonces lavadas en agua destilada fría diluida con HBSS a una concentración de 100 organismos/ml Aliquotas de un mililitro son suministradas sobre placas de agar con sangre e incubadas durante 24 horas a 37° C la viabilidad de los microorganismos se estima de las colonias formadas En otro conjunto de experimentos, 500 unidades de euroquinasa, un mejorador de crecimiento de *S aureus* también se incubaba con las bacterias (10^5 /100 ml durante cuatro horas a 37° C en un baño de agua agitada junto con los péptidos

[0069] La figura 1 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4), (11-13) (ID de SEC No 1) y el dímero CKPV

25
24

(ID de SEC No 5) inhibieron todas las formaciones de colonia de *S aureus*. Estos efectos inhibitorio ocurrieron sobre una amplia variedad de concentraciones y fueron significativos ($p < 0.01$) con concentraciones de péptidos de 10^{-12} a 10^{-4} M. La figura 2 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) y alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) a concentraciones de 10^{-6} M se opuso significativamente al efecto mejorado de crecimiento de la uroquinasa. Así, los péptidos alfa-MSH pueden inhibir el crecimiento de *Estafilococos aureus*, un agente conocido por causar el síndrome de choque tóxico asociado con el uso de tampón vaginitis, UTI, uretritis y balanofostitis.

EJEMPLO II

[0070] Este ejemplo ilustra las propiedades antifúngicas de los péptidos alfa-MSH contra *Candida albicans*.

[0071] Los aislados clínicos de *C albicans* se obtuvieron de la colección del Departamento de Microbiología Ospedale Maggiore di Milano. Los cultivos de *C albicans* se mantuvieron sobre placas inclinadas de agar de Sabouraud y transferidas periódicamente a placas de agar de Sabouraud e incubadas durante 48 h a 28° C. Para preparar levaduras en fase de crecimiento

4
95

estacionario, se toma una colonia de la placa de agar transferida a 30 ml cepa de Sabouraud-dextrosa e incubada durante 72 horas a 32° C Las células se centrifugan a 1 000 x g durante 10 minutos y la pastilla se lava dos veces con agua destilada Las células se cuentan y se suspenden en una solución de sal balanceada de Hank (HBSS) hasta la concentración deseada La viabilidad determinada mediante la exclusión de 0.01% de azul de metileno permanece mayor del 98%

[0072] A 1×10^6 /ml en HBSS, estos hongos son incubados en la presencia o ausencia de alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) (11-13) (ID de SEC No 1), o el dímero CKPV (ID de SEC No 5) a concentraciones que varían desde 10^{-15} a 10^{-4} M durante dos horas a 37° C las células son entonces lavadas en agua destilada fría y diluidas con HBSS a una concentración de 100 organismos/ml Aliquotas de un mililitro son entonces dispensadas sobre placas de agar con sangre e incubadas durante 48 horas a 37° C La viabilidad de los organismos se estima del número de colonias formadas

[0073] La figura 3 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4), (11-13) (ID de SEC No 1) y el dímero CKPV (ID de SEC No 5) reducen la capacidad de *C. albicans* de

96

formar colonias a concentraciones que varían desde 10^{12} a 10^4 M ($p < 0.01$) de este control. Así, esto demuestra que los péptidos alfa-MSH pueden inhibir el crecimiento de *Candida albicans* un agente conocido por originar candidiasis, vaginitis, uretritis, y balanofostitis.

EJEMPLO III

[0074] Este ejemplo compara actividades anti-infección de los péptidos alfa-MSH con fluconazol un agente antifúngico establecido.

[0075] Alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) (4-10) (ID de SEC No 2) (6-13) (ID de SEC No 3), (11-13) (ID de SEC No 1), ACTH (1-39) (ID de SEC No 9), (18-39) (ID de SEC No 10) y fluconazol a concentraciones de 10^{-6} a 10^{-4} M se ensayan contra *C. albicans* utilizando los mismos procedimientos que en el ejemplo II. La figura 4 muestra que comparado con el fluconazol el alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) (6-13) (ID de SEC No 3) y (1-13) (ID de SEC No 4) son más efectivos contra *C. albicans*. Las actividades inhibitorias son similares a la de fluconazol a la misma concentración molar. Como contraste, el núcleo de la secuencia alfa-MSH (4-10) (ID de SEC No 2) que tiene efectos de comportamiento pero poca

12
97

actividad anti-inflamatoria, origina aproximadamente el 50% de la inhibición de las unidades formadoras de colonia (CFU). Aunque este efecto inhibidores substancial ($p < 0.01$ vs control) es significativamente menos potentes que los fragmentos de alfa-MSH que llevan la secuencia de señal KPV, es decir alfa-MSH (6-13) (ID de SEC No 3) y (11-13) (ID de SEC No 1) ($p < 0.01$), o la molécula padre alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) ($p < 0.05$). La figura 4 también muestra que el ACTH (1-39) (ID de SEC No 9) y el fragmento ACTH (18-39) (ID de SEC No 10) no redujeron la viabilidad de *C. albicans*. Aun a una concentración mayor de 10^{-4} M, que no se muestra en las figuras, los péptidos ACTH son similarmente inefectivos.

[0076] Así, este ejemplo demuestra que los péptidos alfa-MSH son tan efectivos como el fluconazol en la inhibición en el crecimiento de *Candida*.

EJEMPLO IV

[0077] Este ejemplo ilustra que los péptidos alfa-MSH inhiben la germinación o la formación de germen de tubo de *C. albicans*. La formación de gérmenes de tubo es una parte significativa de la patogénesis de la infección por *C. albicans*. Esta patogénesis involucra la adhesión a las

98
98

celulas de huesped epitelial y endotelial y el cambio morfologico de la blastospora elipsoide a varias formas filamentosas, por ejemplo tubos de germen, pseudohifae e hifae Gow, N A , Germ Tube Growth of Candida albicans Curr Topics Med Myco 8 43-55 (1997)

[0078] El *C. albicans* de los cultivos de fase estacionaria se lavaron dos veces con agua destilada y se suspendieron en HBSS a una concentraci3n final de 2×10^6 /ml El crecimiento hifal se induce mediante la adici3n de 10% de suero de caballo inactivo (GIBCO/BRL, Paisley Gran Bretaña) a levadura incubada durante 45 minutos a 37° C con agitaci3n continua El suero de caballo se remueve luego al lavar las celulas dos veces con HBSS y la incubaci3n se continua adicionalmente durante 60 minutos a 37° C en la presencia de α -MSH (1-13) (ID de SEC No 4) (6-13) (ID de SEC No 3) o (11-13) (ID de SEC No 1) a una concentraci3n de 10^{-6} M con agitaci3n continua El porcentaje de células filamentosas se evalua bajo un microcopio con luz con la ayuda de un hemocitometro Los experimentos se corrieron por triplicado y al menos se clasificaron 200 celulas Se tomaron fotomicrografias con una cámara MC 100 adherida a un microscopio Axioskop Zeiss

29
99

[0079] Las figuras 5A a 5D muestran que la co-incubación de *C albicans* con alfa-MSH (1- 13) (ID de SEC No 4) o (11-13) (ID de SEC No 1) inhiben la formación de germen de tubo inducida por suero de caballo. El alfa-MSH (1- 13) (ID de SEC No 4) origina 28-32% de reducción en el número de células filamentosas mientras que el alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) origina 54-58% de reducción. Aunque no se muestra en las figuras, el alfa-MSH (6-13) (ID de SEC No 3) de forma similar tiene un 50% de reducción aproximadamente en el número de células filamentosas. Así, esto demuestra que los péptidos alfa-MSH pueden inhibir un modo de patogénesis de *candida* al inhibir su formación de germen de tubo.

EJEMPLO V

[0080] La muerte reducida de patógenos es una consecuencia calamitosa de la terapia con corticosteroides y otras drogas anti-inflamatorias no esteroideas durante la infección. Stevens, D L Could Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAID) Enhance Progression of Bacterial Infections to Toxic Shock Syndrome? *Clin Infect Dis* 21 977-80 (1997) Capson, F et al Effect of Corticosteroids on Neutrophil Function Inhibition of Antibody-dependent Cell-Mediated

100

Cytotoxicity (ADCC) *J Immunopharmacol* 5 217-30 (1983)

Este ejemplo ilustra que los peptidos alfa-MSH inhiben el crecimiento de agentes infecciosos sin comprender la capacidad de los neutrófilos humanos para combatir estas infecciones Este ejemplo muestra además que los peptidos alfa-MSH pueden mejorar actualmente la capacidad de los neutrófilos para matar esto agentes infecciosos

[0081] Sangre venosa (20 ml) de voluntarios sanos se anticoagula con heparina Se aislaron entonces los neutrófilos utilizando sedimentación de dextrano y centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co St Louis, Missouri, USA) Se lisaron eritrocitos por via de choque hipotónico con los neutrófilos resultantes que representan al menos 97% de la suspension celular La viabilidad celular, estimada por la exclusión de tripan azul, es mayor del 98% Los neutrófilos se resuspendieron en HBSS para los experimentos

[0082] *C albicans* (1×10^9) se opsonizaron con suero AB humano en un baño de agua agitada durante 30 minutos a 37° C Ellas se incubaron con neutrofilos en la presencia de un medio solo o medio con alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) o alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) en concentraciones que varian de 10^{-15} a 10^{-4} M en un baño de

10/10

agua agitado durante dos horas a 37° C después de incubación los tubos de cultivo se colocaron en hielo para detener el crecimiento y los organismos extracelulares se lavaron dos veces con centrifugación a 1000-x g a 4° C Una solución de desoxicolato de sodio al 2.5% se agrega a la suspensión, y los tubos se agitan durante cinco minutos Se agrega entonces agua destilada fría para obtener una suspensión de 10^6 células/ml Dos diluciones seriales 1/100 en HBSS se hicieron para obtener una suspensión final de 100 células/ml Aliquotas de un mililitro se dispensaron luego sobre placas agar con sangre e incubaron durante 48 horas a 37° C Las unidades que forman colonias se contaron al final del periodo de incubación con experimento que corren por triplicado y que se repiten utilizando sangre de cinco donantes diferentes

[0083] La figura 6 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) y (11-13) (ID de SEC No 1) actualmente el neutrófilo mejorado mata el *C. albicans* cuando se administra a concentraciones que varían de 10^{-12} a 10^{-4} M ($p < 0.01$) Esto muestra que esta muerte mejorada ocurre sobre un muy amplio rango de concentraciones que incluyen concentración picomolar, que es similar a la concentración de alfa-MSH encontrada en el plasma humano

192

[0084] Así, este ejemplo demuestra que los péptidos alfa-MSH pueden combatir simultáneamente contra la infección e inflamación, que también pueden ser aplicados a candidiasis vaginitis uretritis balanopostitis, o hemorroides

[0085] Este ejemplo sugiere el mecanismo celular mediante el cual los péptidos alfa-MSH ejercen propiedades anti-microbiales en general y las propiedades anti-fungosas en particular

[0086] El *C. albicans* (1×10^6), permeabilizado con tolueno/etanol se incuban a 37° C con agitación continua en la presencia o ausencia de 10^6 M- alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) (11-13) (ID de SEC No 1) o forskolin un agente conocido por incrementar el cAMP intracelular. Las reacciones se detiene después de tres minutos mediante la adición de etanol enfriado con hielo. Se miden los niveles cAMP en duplicado utilizando un kit comercial de inmunoensayo de enzima (Amersham, Reino Unido) después de extracción por vía del método de fase líquido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un experimento relacionado, el *C. albicans* también se expuso a didesoxiadenosina (ddAdo Sigma), un potente inhibidor de

193

adenilil ciclase en concentraciones de 25 50 y 100×10^{-5} M durante dos horas, y a péptidos alfa-MSH durante dos horas adicionales. Los efectos del forskolin y el ddAdo en la capacidad del *C albicans* para formar colonias se determina de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo II.

[0087] La figura 7 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) o (11-13) (ID de SEC No 1) mejora el contenido cAMP en *C albicans*. Este incremento de cAMP es del orden de magnitud de aquel inducido por forskolin equimolar. La figura 8 muestra que junto con el plasma alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) y (11-13) (ID de SEC No 1) el forskolin también inhibe significativamente el crecimiento de *C albicans* relacionado con el grupo de control ($p < 0.01$). La figura 9 muestra que el ddAdo tiene la capacidad de reversar el efecto del alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) y (11-13) (ID de SEC No 1) en el crecimiento de *C albicans*.

[0088] Este ejemplo demuestra que los péptidos alfa-MSH muy probablemente inhiben el crecimiento de *C albicans* y otros microorganismos al incrementar su nivel de cAMP, que en cambio inhibe el mRNA y la síntesis de proteína. Ver por ejemplo, Bhattacharya A. Et al Effect Cyclic AMP on

f
104

RNA and Protein Synthesis in *Candida albicans*, *Biochem Biophysics Res Commun* 77 1433-44 (1977)

EJEMPLO VII

[0089] Este ejemplo ilustra la capacidad de los peptidos alfa-MSH para inhibir la replicacion viral en células humanas Mas especificamente el alfa-MSH inhibe la replicacion y expresion del HIV-1 en monocitos humanos infectados cronicamente

[0090] La linea celular promonocítica U1 infectada con HIV-1 cronicamente es un modelo in Vitro de la infecci3n HIV latente en monocitos Estas celulas pueden llevar dos copias provirales integradas de HIV, y la expresion constitutiva del HIV es muy baja La replicaci3n viral sin embargo segun se mide por transcripci3n de ARN, antígeno p24 o liberaci3n de transcripatasa reversa se puede activar con diferentes estímulos tales como TNF- α , IL-6 IL-10, PMA o apretamiento de células

[0091] Para determinar los efectos de los peptidos alfa-MSH en la replicaci3n de HIV estas celulas se mantienen en una fase log de crecimiento en un medio de cultivo completo (RPMI 1640 complementado con 10 mM de Hepes) 2

13
(09)

mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) 10% de FCS inactivado con calor (Hyclone Laboratories Logan, UT USA) penicilina en 100 unidades y estreptomycin en 100 µg/ml (Gibco Laboratories Grand Island, NY) en fase log de crecimiento Los experimentos piloto se desarrollaron primero para determinar la densidad celular optima, concentración de estímulos y cinéticos de producción de antígeno p24 HIV-1 que utilizan estas condiciones de cultivo Antes de uso, se lavaron las células tres veces con HBSS para remover los virus extracelulares Las células se colocan en placas de fondo plano de 24 pozos en una concentración de 2×10^5 /ml (volumen final de un ml) con medio solo o medio mas TNF- α (10 ng/ml) (R&D Systems Oxford, England UK) en la presencia o ausencia de alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No 4) o (11-13) (ID de SEC No 1) en concentraciones de 10^{-15} a 10^{-4} M

[0092] En experimentos adicionales el alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) solo a 10^{-5} M se agrega a células U1 estimuladas con TNF- α (10 ng/ml) IL-6 (20 ng/ml) IL-10 (20 ng/ml) (R&D Systems Oxford England, UK) PMA (1 ng/ml) (Sigma-Aldrich), o en condiciones de apretamiento El apretamiento se alcanza al sembrar células U1 en una densidad de 2×10^5 /ml y mantenerlas en cultivo a 37° C en 5% de CO₂ sin cambiar el medio durante siete días Los

8
(96)

cultivos activados con citoquinas o PMA se mantuvieron solo durante 48 horas. Los supernadantes se removieron luego mediante centrifugación y se ensayaron para antígeno p24 utilizando kits ELISA disponibles comercialmente de Cellular Products, Inc. in Buffalo, NY, USA. La liberación de transcriptasa reversa también se mide utilizando un kit disponible comercialmente, ensayo RT ELISA Retrosys de Innovagen Lund, Suecia. Para estos experimentos la adición de alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No. 1) ocurre en el día 1, y cada condición se ensaya por triplicado.

[0093] La figura 10 muestra que el alfa-MSH (1-13) (ID de SEC No. 4) o (11-13) (ID de SEC No. 1) inhibe significativamente la liberación de antígeno p24 de las células U1 estimuladas por TNF- α sobre un amplio rango de concentraciones. La concentración más efectiva de ambos péptidos es de 10^{-5} M originando 52.7% y 56.0% de inhibición respectivamente. La figura 11 muestra que el alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No. 1) también inhibe el antígeno p24 y libera la transcriptasa reversa de las células U1 inducidas por IL-6, IL-10, PMA y en condición de apretamiento. Adicionalmente, la figura 12 muestra que el alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No. 1) también inhibe la transcripción de ambos empalme y no empalme del ARN HIV-1.

*
107

en células U1 estimuladas con PMA como se mide mediante análisis Northern Blot

[0094] Así, este ejemplo demuestra que los péptidos alfa-MSH pueden inhibir la transcripción de genes virales a través de la mediación de las trayectorias TNF- α , IL-6 e IL-10

EJEMPLO VIII

[0095] Este ejemplo ilustra adicionalmente la capacidad del alfa-MSH para inhibir la replicación viral y la activación. Mas específicamente este ejemplo ilustra que la adición de un anticuerpo neutralizante células a alfa-MSH en células U1 substancialmente incrementa la liberación de antígeno p24

[0096] Se cultivan células U1 en forma similar como se describe en el ejemplo VII. El alfa-MSH endógeno producido por las células U1 se bloquea con un anticuerpo de conejo-anti-alfa-MSH de afinidad purificada (Euro-Diagnostica Malmö Suecia) diluido con 1:250 con medio. El anticuerpo de control es un IgG de conejo en la misma dilución. Las células (2×10^5 /ml) tratadas con el anti-alfa-MSH o el anticuerpo de control se coincuran con el medio o PMA (1

39
108

ng/ml) Despues de 48 horas de incubación a 37° C los supernadantes se separan y se prueban para liberación de antígeno p24 En experimentos de amontonamiento con células U1 cultivadas como se describio anteriormente el anticuerpo anti-alfa-MSH o el IgG de control se agrega en el dia 1 y los supernadantes se cosechan en el dia siete

[0097] La figura 13 muestra que el bloqueo de alfa-MSH en descanso, el PMA inducido o las células U1 amontonadas incrementan significativamente la liberacion del antígeno p24 Este ejemplo implica fuertemente que la replicacion viral se afecta por el alfa MSH

EJEMPLO IX

[0098] Este ejemplo ilustra el mecanismo por el que los peptidos alfa-MSH inhiben la replicacion viral y la expresión Mas especificamente los péptidos alfa-MSH inhiben el TNF- α inducido por la activacion y unión de NF-kB

[0099] Para determinar el nivel de actividad NF-kB, se preparan extractos nucleares de 20×10^6 células U1 (2×10^5 /ml en medio completo) estimulado durante cuatro horas con TNF- α (20 ng/ml) en la presencia o ausencia de 10^{-5} M alfa-

109

MSH (11-13) (ID de SEC No 1) Las células se lavan una vez con PBS frío y dos veces con amortiguador A (10 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de KCl, 0.5 mM de PMSF y 0.5 mM de DTT) centrifugado, e incubado durante 10 minutos en hielo en amortiguador A mas 0.1% NP-40 despues de esto, se remueven los supernadantes, y las pildoras nucleares se resuspenden en 15 μ l de amortiguador C (20 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.42 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 25% de glicerol, 0.5 mM de PMSF y 0.5 mM de DTT), incubado durante 15 minutos en hielo mezclado y luego centrifugado. Los supernadantes se diluyen con 75 μ l de amortiguador modificado D (20 mM Hepes pH 7.9, 0.5 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 20% de glicerol, 0.5 mM de PMSF y 0.5 mM de DTT), y almacenada a $-80^{\circ}C$. La reaccion de union se lleva acabo durante 15 minutos a temperatura ambiente con 10 μ g de proteina de extracto nuclear y 0.5 ng de NF-kB etiquetado ^{32}P (30 000 cpm/ μ l) o consensus AP1 en amortiguador A (12 mM Tris-HCl pH 7.8, 60 mM de KCl, 0.2 mM de EDTA, 0.3 mM de DTT) mas 10% de glicerol, 2 μ g/ml de albumina de suero bovino y 1 μ g/ml de ADN de hebra sencilla (Pharmacia Biotech). Los oligonucleotidos para el NF-kB utilizados es estos estudios son + gat cca agg gga ctt tcc gct ggg gac ttt cca tg (ID de SEC No 11) y -gat cca tgg aaa gtc ccc agc gga aag tcc cct tg (ID de SEC No 12). Cada oligonucleótido se recoció a su hebra

110

complementaria y el extremo etiquetado con ^{32}P - γ -ATP utilizando una quinasa de polinucleotido. Para la determinación de bandas específicas, primero se incubaron extractos nucleares con 100 veces exceso de sondas no etiquetadas durante 5 minutos antes de incubación con una sonda etiquetada. Las mezclas corrieron luego en 5% (30 l) de gel de archilamida en 1xTBE. Los geles se secan y se autoradiografían.

[00100] La figura 14 muestra que el $\text{TNF-}\alpha$ mejora grandemente la actividad de unión NF-kB pero la co-incubación del alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) a 10^{-5}M reduce significativamente la activación del NF-kB. El alfa-MSH (ID de SEC No 1), sin embargo no altera la activación del NF-kB en células en reposo. Esto sugiere que los péptidos alfa-MSH inhiben la replicación viral y la expresión a través de la regulación de la unión NF-kB.

[00101] La replicación de agentes virales a menudo depende del estado de activación de las células infectadas y frecuentemente se regula por las interacciones entre los factores de huésped y virales. Estos factores de huésped pueden incluir $\text{TNF-}\alpha$ y otras citoquinas tales como las interleuquinas. En forma similar a la infección por HIV-1 y la activación, también el virus del herpes simplex se

F
111

reactiva de la latencia en respuesta a citoquinas huésped. Por ejemplo, el TNF- α y el IL-6, pero no el IL-1 y el IL-3, se han mostrado que reactivan la infección HSV. La neutralización del IL-6 con anticuerpo contra IL-6 inhibe significativamente la reacción HSV mientras que la neutralización del interferón alfa y beta no. Ver por ejemplo, Baker, M, et al The Relationship between Interleukin-6 and Herpes Simplex Virus Type-1 Implications for Behavior and Immunopathology, *Brain Behav Immun* 13 (3) 201-11 (1999). Noisakran S et al Lymphocytes Delay Kinetics of HSV-1 Reactivation from in vitro Explants of Latent Infected Trigeminal Ganglia *J Neuroimmunol* 95 (1-2) 126-35 (1999). Walev I et al Enhancement by TNF- α of Reactivation and Replication of Latent Herpes Simplex Virus from Trigeminal Ganglia of Mice *Arch Virol* 140 (6) 987-92 (1995). Domk-Optiz, I et al Stimulation of Macrophages by Endotoxin Results in the Reactivation of a Persistent Herpes Simplex Virus Infection *Scand J Immunol* 32 (2) 69-75 (1990). Fauci A S, Host Factors in the Pathogenesis of HIV-induced Disease *Nature* 384 529 (1996).

[00102] El TNF- α o infección por virus que incluye HSV puede originar destrucción objetivada de I κ B que en cambio activa la traslocación nuclear del NF- κ B. La

112

traslocación nuclear promueve la unión del NF- κ B a los operadores de ADN para la transcripción de un rango de agentes inflamatorios que incluyen TNF- α , IL-6 y otras citoquinas. La expresión de estas citoquinas, de nuevo, reactiva adicionalmente otras células HSV infectadas para producir virus HSV. Ver por ejemplo Patel, A, et al, Herpes Simplex Type 1 Induction of Persistent NF- κ B Nuclear Translocation Increases the Efficiency of Virus Replication *Virology* 247(2) 212-22 (1998)

[00103] Así, al bloquear la unión NF- κ B, los péptidos alfa-MSH inhiben la expresión de más citoquinas inflamatorias que pueden activar el HSV. Este ejemplo y los ejemplos VII-VIII muestran que los péptidos alfa-MSH inhiben la replicación viral, la expresión y la reactivación al inhibir la unión NF- κ B en respuesta a las citoquinas del cuerpo u otra infección viral.

EJEMPLO X

[00104] Este ejemplo ilustra la capacidad de los péptidos alfa-MSH para inhibir la replicación viral en células humanas infectadas agudamente. Más específicamente, el alfa-MSH inhibe la replicación y expresión del HIV-1 en

7
113

celulas mononucleares sanguineas perifericas humanas infectadas (PBMC)

[00105] El PBMC se aisla de donantes normales mediante centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Los monocitos se aíslan mediante separación de gradiente Percoll y se le permite diferenciar en macrófagos (MDM) en medio completo de RPMI mas 20% de FCS que utiliza placas de 24 pozos para cultivo de tejido a 10^6 células/ml durante siete días. El MDM se infecta con cepa HIVBa-I monocitotrópica (10^7) durante la noche. El depósito viral no diluido contenía 10^7 unidades infecciosas/ml. Después de 24 horas el MDM se lava y se resuspende en medio completo, se reemplaza tres veces una semana, durante tres semanas se mide la liberación de transcriptasa reversa semanalmente post-infección utilizando un kit disponible comercialmente, ensayo RT ELISA Retrosys de Innovagen, Lund, Suecia. Se agrega 10^{-5} M alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) al tiempo de la infección por HIV y luego diariamente hasta cosecha.

[00106] La figura 15 muestra que el alfa-MSH inhibe significativamente la liberación de transcriptasa reversa en MDM infectado agudamente. Este efecto inhibidor se

114

pronuncia más en el sexto día pero todavía fue mas significativo en el día 21

[00107] Así este ejemplo demuestra que la replicación viral en el sitio de infección se puede inhibir por los péptidos alfa-MSH. Por consiguiente, la transmisión sexual de enfermedades venéreas en general y el HIV en particular se puede inhibir al asociar los péptidos alfa-MSH con contraceptivos tales como condones, diafragmas, o esponjas utilizadas durante el contacto sexual y/o la aplicación post contacto sexual de supositorios, cremas ungüentos, geles, o espumas de aerosol que contienen péptidos alfa-MSH.

EJEMPLO XI

[00108] Este ejemplo ilustra los equivalentes funcionales biológicos de los péptidos alfa-MSH.

[00109] Aunque las secuencias de aminoácido específico descritas aquí son efectivas, es claro que para aquellos familiarizados con la técnica que los aminoácidos se pueden sustituir o eliminar sin alterara la efectividad de los péptidos. Adicionalmente es conocido que la estabilización de la secuencia alfa-MSH puede incrementar

4
115

grandemente la actividad del péptido y que la sustitución de las formas de aminoácido D para formas L pueden mejorar o reducir la efectividad de los péptidos. Por ejemplo, un análogo estable de alfa-MSH [Nle4 Phe7]-alfa-MSH que se conoce por tener marcada actividad biológica sobre melanocitos y células de melanoma, es aproximadamente diez veces más potente que el péptido pariente en reducción de fiebre. Adicionalmente, agregar los aminoácidos al C-terminal de la secuencia alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1) puede reducir o mejorar la potencia antipirética. La adición de glicina para formar la secuencia 10-13 (ID de SEC No 13) reduce ligeramente la potencia, la secuencia 9-13 (ID de SEC No 14) es casi desprovista de actividad, mientras que la potencia de la secuencia 8-13 (ID de SEC No 15) es mayor que la de la secuencia 11-13 (ID de SEC No 1). Es conocido que el Ac-[D-K11]-alfa-MSH 11-13-NH₂ tienen la misma potencia general como la forma L del tri péptido alfa-MSH (11-13) (ID de SEC No 1). Ciertas referencias sin embargo han mostrado sustitución con D-prolina en la posición 12 del tri péptido dado indicativo. Ver por ejemplo, Holdeman, M et al. Antipyretic Activity of a Potent alpha-MSH Analog, *Peptides* 6, 273-5 (1985). Deeter, L B et al., Antipyretic Properties of Centrally Administered Fragments in the Rabbit, *Peptides* 9, 1285-8 (1989). Hiltz, M E. Anti-inflammatory Activity

A
116

of alpha-MSH (11-13) Analogs Influences of Alterations in Stereochemistry, Peptides 12,767-71 (1991)

[00110] Los equivalentes funcionales biológicos también se pueden obtener mediante sustitución de aminoácidos que tiene valores hidropáticos similares. Así, por ejemplo la isoleucina y la leucina que tienen un índice hidropático +4.5 y +3.8 respectivamente, se pueden sustituir por valina, que tiene un índice hidropático de +4.2, y obtener aún una proteína que tiene similar actividad biológica y así presentar la oportunidad para variar tipos de dímeros. KP.V. Alternativamente, en el otro extremo de la escala la lisina (-3.9) se puede sustituir por arginina (-4.5), y así sucesivamente. En general se cree que los aminoácidos se pueden sustituir exitosamente cuando tales aminoácidos tiene una calificación hidropática dentro de cerca de +/- una unidad de índice hidropática del aminoácido reemplazado.

EJEMPLO XII

[00111] El *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* (aislados clínicos) se obtuvieron de la colección de laboratorio de microbiología, Ospedale Maggiore di Milano. Seis aislados diferentes para cada cepa de levadura se utilizaron. Las

118

celulas *Candida Sp* Se mantuvieron en placas inclinadas de agar Sabouraud y transferidas periodicamente a placas agar Sabouraud e incubadas durante 48 h a 28° C para preparar levadura de fase de crecimiento estacionario se toma una colonia de las placas de agar y se transfiere en 5 ml de caldo de dextrosa Sabouraud e incubados durante 48 h a 32° C las células se centrifugan a 1,000 x g durante 10 minutos y la pastilla se lava dos veces con agua destilada Las células se cuentan y se suspenden en agua destilada para obtener 10^7 celulas de levadura/ml La viabilidad determinada por la exclusion de 0.01% de metileno azul mantuvo >98%

[00112] Los tubos que contiene celulas de *Candida Sp* 1×10^6 en 100 μ l de agua destilada se adicionan con el dimero CKPV 10^{-7} a 10^{-4} M o KPV 10^{-4} M (concentraciones finales) disueltas en 100 μ l de agua destilada Los tubos de control recibieron 100 μ l de agua destilada Todos los ensayos se corrieron por triplicado Despues de 2 horas de incubación a 37° C la suspensión de levadura de cada frasco se diluye con agua destilada para obtener aproximadamente 100 organismos/ml Alicuotas de un mililitro de cada tubo se dispensaron sobre placas agar con sangre e incubaron durante 48 horas a 37° C para conteo CFU La viabilidad de los organismos se estima a

L

118

partir del numero de CFU en cada placa Solo los experimentos en los cuales el CFU en las placas de control estaba entre 80 y 120 con una variabilidad en conteos menos del 10% se utilizan para evaluar efectos de los peptidos Los experimentos con numeros mas pequeños o mas grandes de colonias en las placas de control se consideran técnicamente inapropiados y se excluyen del análisis

[00113] Los resultados ilustrados en las figuras 17-19 y que muestran el CFU resultante bajo las condiciones descritas anteriormente para los hongos particulares identificados Las figuras incluyen el CFU resultante en la presencia de peptidos sin alfa-MSH (designados como 0 en las figuras 17-19), 10-4 M de KPV [designados como -4 en las figuras 17-19], 10-7 M del CKPV (ID de SEC No 5) dimero [designados como -7 en las Figuras 16-19] 10-6 M del dimero CKPV [designado como -6 en las figuras 1-3], 10-5 M del CKPV (ID de SEC No 5) dimero [designado como -5 en las figuras 17-19], y 10-4 M del CKPV (ID de SEC No 5) dimero [designado como -4 en las figuras 17-19] La figura 17 muestra que en la misma molaridad, el dimero CKPV (ID de SEC No 5) es mas de dos veces tan efectivo como el monómero KPV en el tratamiento de *C albicans* La figura 18 muestra que en la misma molaridad, el dimero CKPV (ID de SEC No 5) es mas de dos veces tan efectivo

9
#

119

como el monomero KPV en el tratamiento de *C. krusei*. La figura 19 muestra en la misma molaridad el dimerio CKPV (ID de SEC No 5) es más de dos veces tan efectivo como el monomero KPV en el tratamiento de *C. glabrata*.

[00114] Los ejemplos I-III precedentes demuestran las actividades anti-infección y usos de los peptidos alfa-MSH. Estos datos se destinan solo como ejemplos y no se pretende que limite la invención de estos ejemplos. Se entiende que modificar los ejemplos anteriores no se aparta del espíritu de la invención. Se entiende adicionalmente que los ejemplos se pueden aplicar solos o en combinación con los otros.

120

REIVINDICACIONES

- 1 Una composicion farmaceutica que comprende un dimero KPV un primer agente preservativo un solvente un alcalizador, un polimero basado en acido acrilico, un segundo agente preservativo y un agente gelatinizante
- 2 La composicion de la reivindicacion 1 que comprende adicionalmente un agente quelante
- 3 La composicion de la reivindicacion 1 en donde el KPV es dimero CKPV (ID de SEC No 5)
- 4 La composicion de la reivindicacion 1 en donde el polimero basado en acido acrilico es Carbopol®
- 5 La composicion de la reivindicacion 1 en donde el primer preservativo se selecciona a partir del grupo que consiste de fenoxietanol metilparabeno butilparabeno, etilparabeno propilparabeno y sorbato de potasio y combinaciones de estos
- 6 La composicion de la reivindicacion 1 en donde el segundo preservativo se selecciona a partir del

F
121

grupo que consiste de fenoxietanol metilparabeno
butilparabeno etilparabeno propilparabeno y
sorbato de potasio y combinaciones de estos

7 La composición de la reivindicación 5 en donde el
primer preservativo es metilparabeno

8 La composición de la reivindicación 6 en donde el
segundo preservativo es propilparabeno

9 La composición de la reivindicación 1 en donde el
solvente se selecciona a partir de los grupos que
consisten de propilenglicol etanol fenol acetona
glicerol e isopropanol y combinaciones de estos

10 La composición de la reivindicación 9 en donde el
solvente es propilenglicol

11 La composición de la reivindicación 2 en donde el
agente quelante se selecciona a partir del grupo que
consiste de Coenzima Q10, Zinc, L-Cisteína, L-
Mecionina, L-Lisina, y EDTA y combinaciones de
estos

12

12 La composición de la reivindicación 11 en donde el agente quelante es de EDTA

13 La composición de la reivindicación 1 en donde el alcalizador se selecciona a partir del grupo que consiste de HEPES, NaOH 2M hidrato MES, MOPS, TAPS y Bis-Tris y combinaciones de estos

14 La composición de la reivindicación 13 en donde el alcalizador es NaOH

15 La composición de la reivindicación 1 en donde el agente gelatinizante se selecciona a partir del grupo que consiste de agua, agua estéril, agua destilada, solución salina estéril y agua estéril para inyección y combinaciones de estos

16 La composición de la reivindicación 15 en donde el agente gelatinizante es agua estéril para inyección

17 La composición de la reivindicación 3 en donde el dímero CKPV (ID de SEC No 5) es al menos cerca de 0.05-0.15% de la composición

7

123

- 18 La composición de la reivindicación 17 en donde el dimero CKPV (ID de SEC No 5) es de al menos cerca de 0.1 % de la composición
- 19 La composición de la reivindicación 4 en donde el Carbopol® es de al menos de 1.5-2.5% de la composición
- 20 La composición de la reivindicación 19 en donde el Carbopol® es de al menos cerca del 2% de la composición
- 21 La composición de la reivindicación 7 en donde el metilparabeno es de al menos cerca de 0.1- 0.2% de la composición
- 22 La composición de la reivindicación 21 en donde el metilparabeno es de al menos cerca de 0.15% de la composición
- 23 La composición de la reivindicación 8 en donde el propilparabeno es de al menos cerca de 0.025-0.075% de la composición

124

- 24 La composición de la reivindicación 23 en donde el propilparabeno es de al menos cerca de 0.05% de la composición
- 25 La composición de la reivindicación 10 en donde el propilenglicol es de al menos cerca de 5-15% de la composición
- 26 La composición de la reivindicación 25 en donde el propilenglicol es de al menos cerca de 10% de la composición
- 27 La composición de la reivindicación 12 en donde el EDTA es de al menos cerca de 0.05-0.15% de la composición
- 28 La composición de la reivindicación 27 en donde el EDTA es de al menos cerca de 0.1% de la composición
- 29 La composición de la reivindicación 14 en donde el NaOH 2M es de una cantidad suficiente para llevar la composición a un pH de 4.0 ± 0.1

125

- 30 La composición de la reivindicación 15 en donde el agua estéril para inyección es de una cantidad suficiente para crear un gel
- 31 Una composición farmacéutica que comprende Cabopol® propilparabeno metilparabeno, propilenglicol, dimero CKPV (ID de SEC No 5), NaOH 2 M y agua estéril para inyección
- 32 La composición de la reivindicación 31 que comprende adicionalmente EDTA
- 33 La composición de la reivindicación 31 en donde el dimero CKPV (ID de SEC No 5) es al menos cerca de 0.1% de la composición
- 34 La composición de la reivindicación 31 en donde el Carbopol® es de al menos cerca de 2% de la composición
- 35 La composición de la reivindicación 31 en donde el metilparabeno es de al menos cerca de 0.15% de la composición

126

- 36 La composición de la reivindicación 31 en donde el propilparabeno es de al menos 0.05% de la composición
- 37 La composición de la reivindicación 31 en donde el propilenglicol es de al menos cerca del 10% de la composición
- 38 La composición de la reivindicación 32 en donde el EDTA es de al menos cerca de 0.1% de la composición
- 39 La composición de la reivindicación 31 en donde el NaOH 2M es de una cantidad suficiente para llevar la composición a un pH de 4.0 ± 0.1
- 40 La composición de la reivindicación 31 en donde el agua estéril para inyección es de una cantidad suficiente para crear un gel
- 41 Una composición farmacéutica que comprende 2% de Carbopol®, 0.05% de propilparabeno, 0.15% de metilparabeno, 10% de propilenglicol, 0.1% g de EDTA, NaOH 2M en una cantidad suficiente para llevar la composición a un pH de 4.0 ± 0.1 , 0.1% de dimero CKPV (ID de SEC No 5) y agua estéril para

E
128

inyección en una cantidad suficiente para crear un gel

- 42 Un metodo para tratar condiciones urogenitales que comprende el uso de una composicion farmaceutica comprende al menos cerca de 2% de Carbopol® al menos cerca de 0.05% de propilparabeno al menos cerca de 0.15% de metilparabeno al menos cerca de 10% de propilenglicol, al menos cerca de 0.1% de EDTA, NaOH 2M en una cantidad suficiente para llevar la composicion a un pH de 4.0 ± 0.1 al menos cerca de 0.1 % de dimero CKPV (ID DE SEC NO 5) y agua esteril para inyección en una cantidad suficiente para crear un gel

128

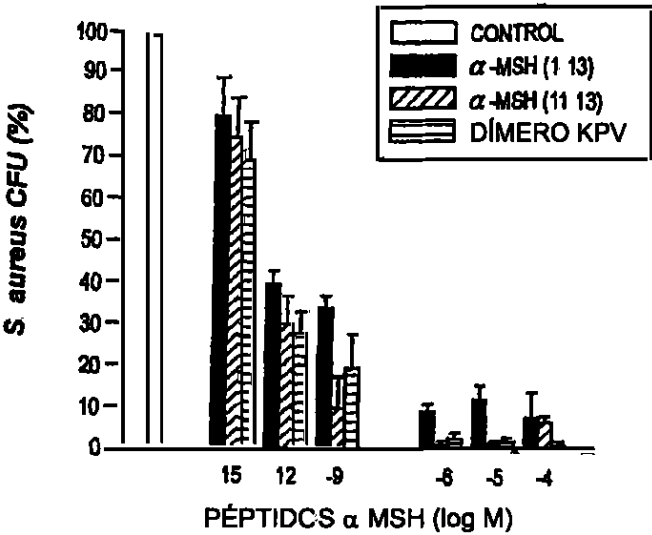


Fig 1

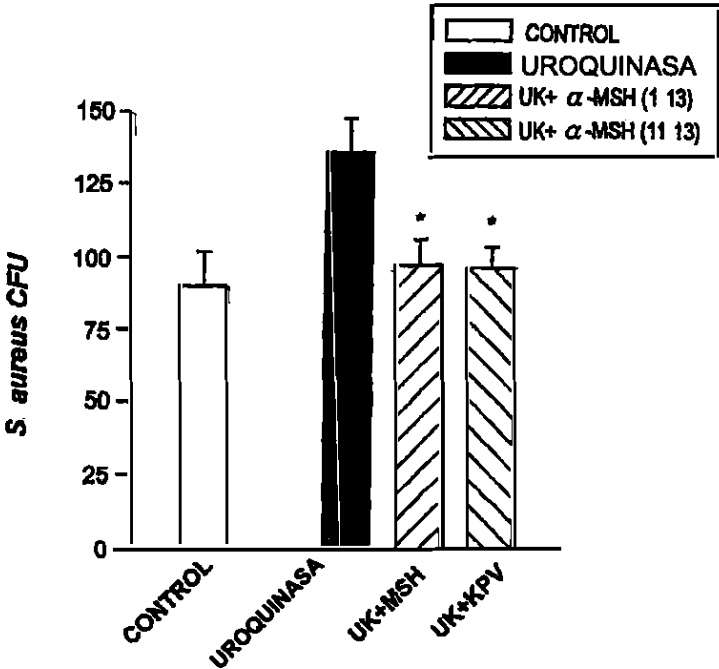


Fig 2

129

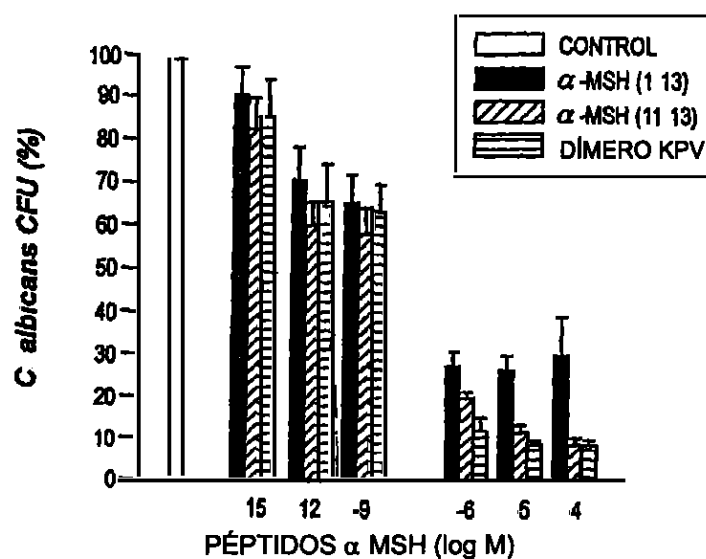


Fig 3

% de Inhibición de viabilidad de *C. Albicans*

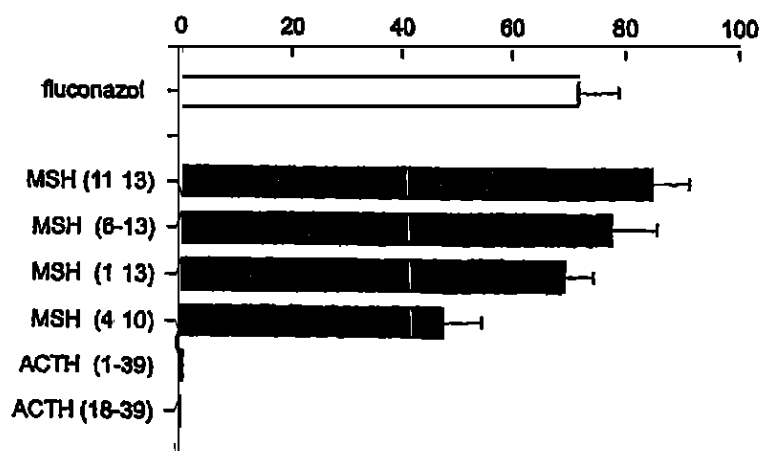


Fig 4

130-18

Fig 5A



Fig 5B

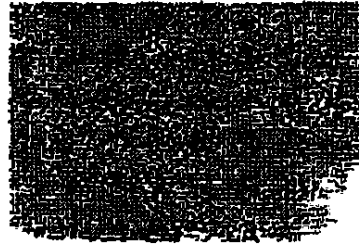


Fig 5C

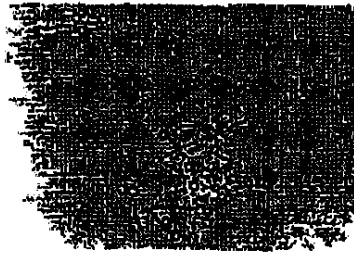


Fig 5D



131

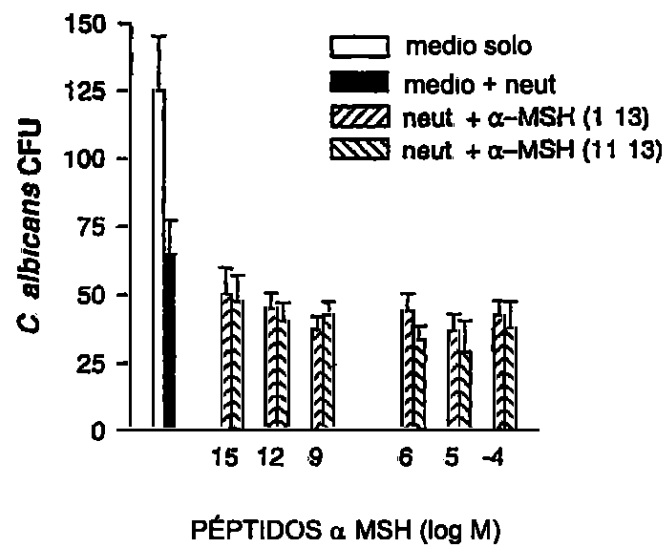


Fig 6

132

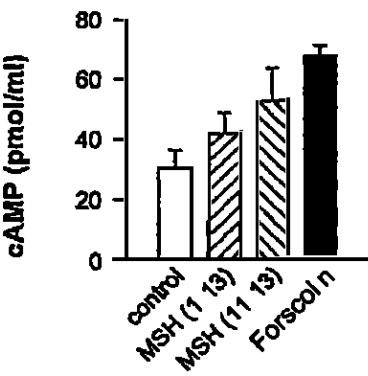


Fig 7

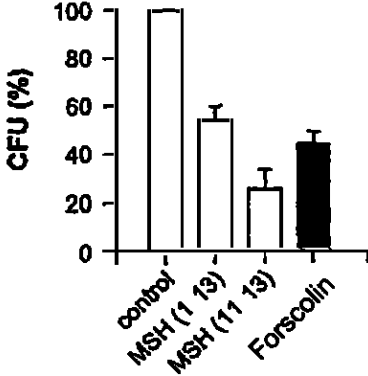


Fig 8

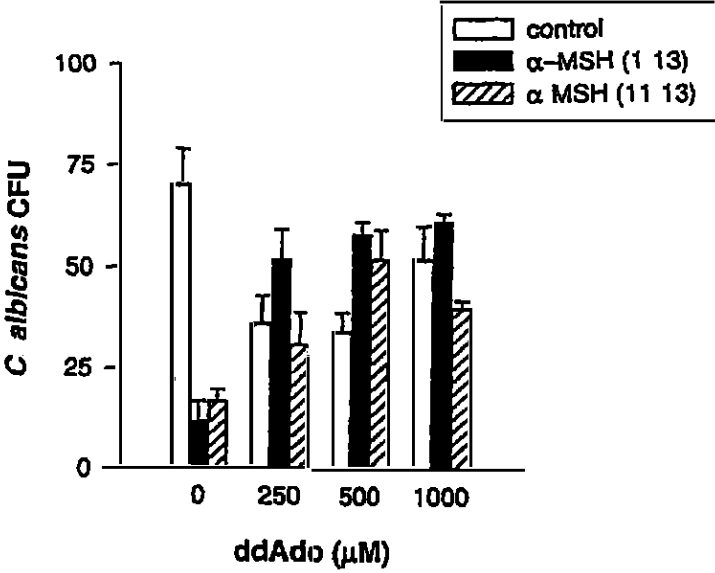


Fig 9

133³

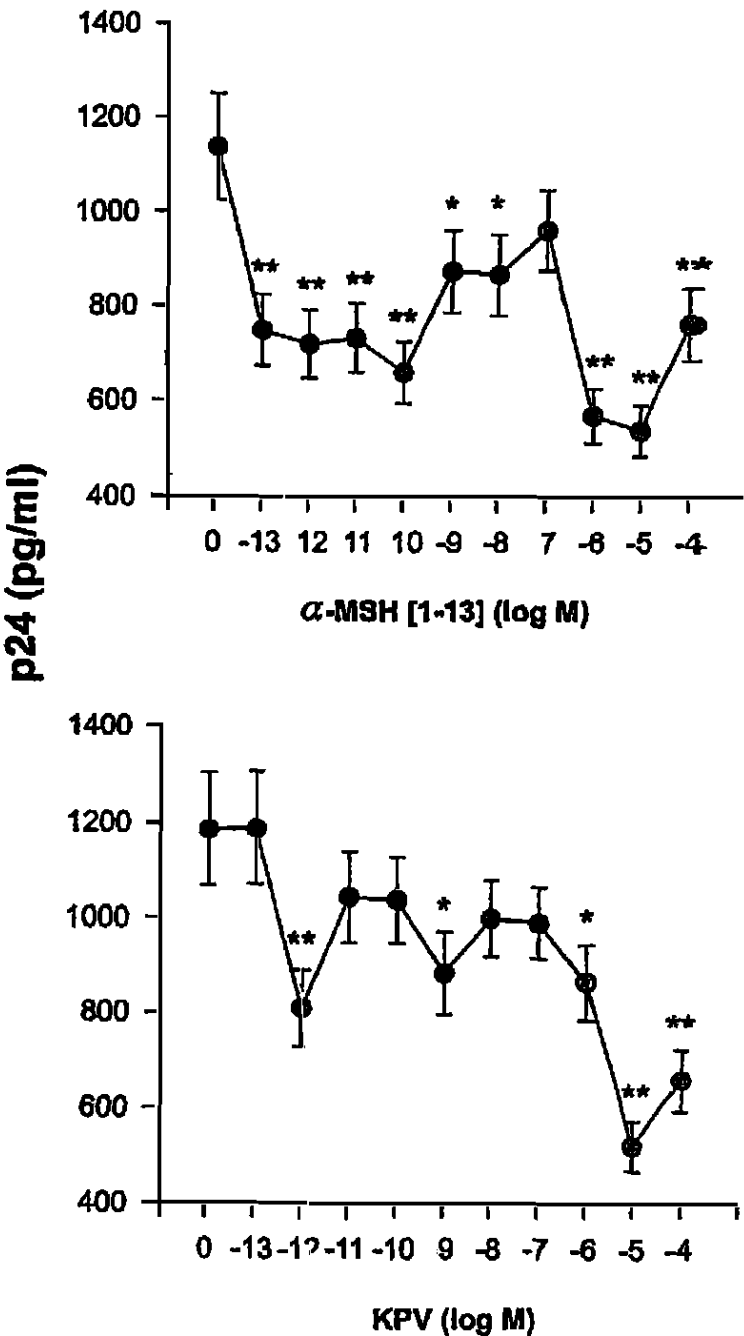


Fig 10

134

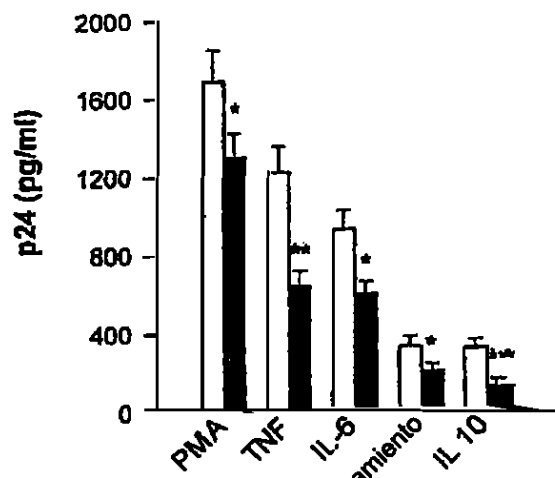
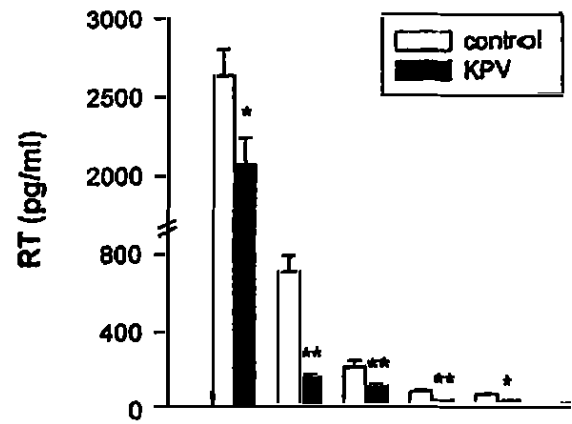


Fig 11

135

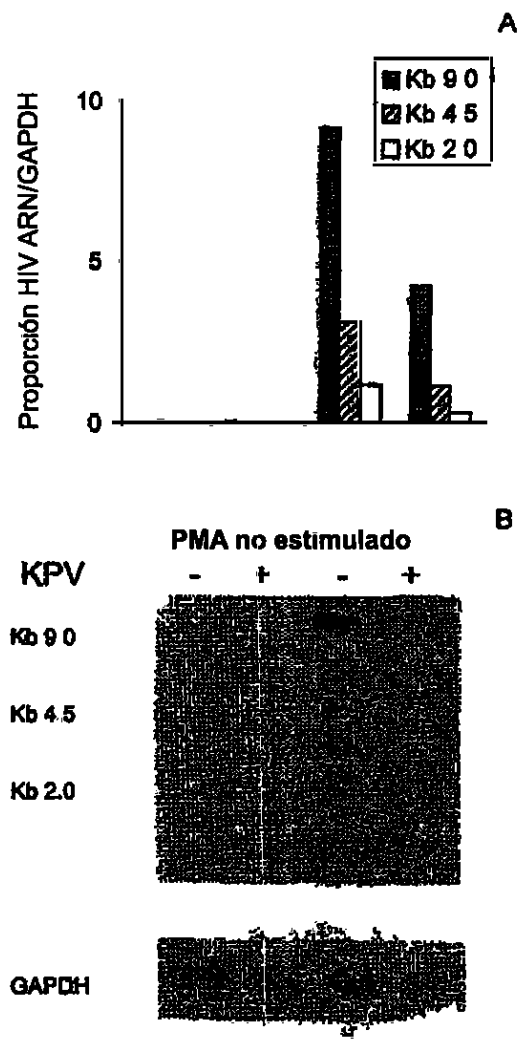


Fig 12

136

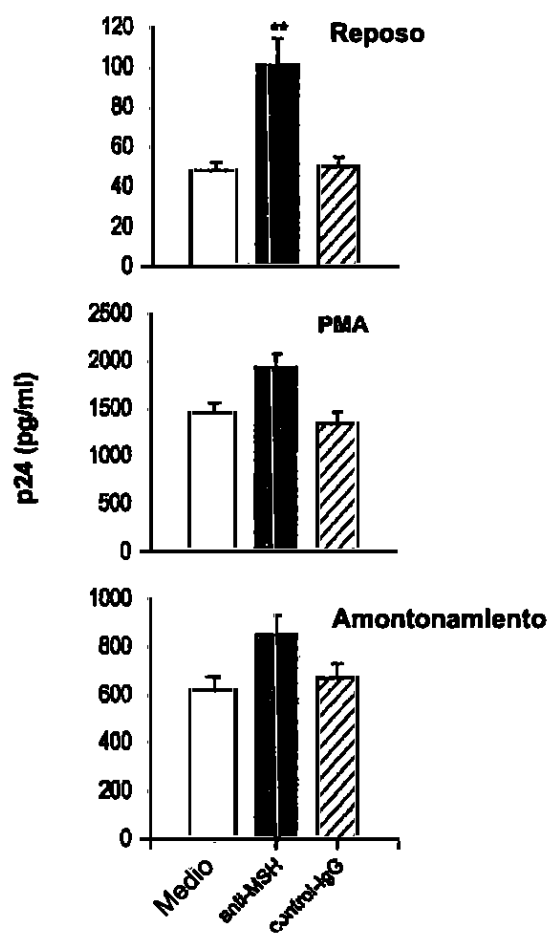


Fig 13

132 f3

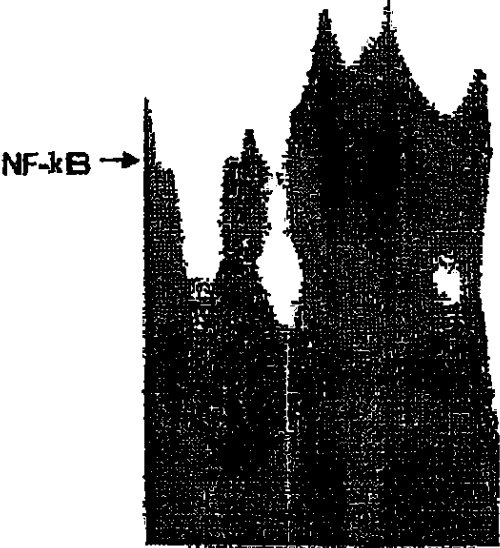
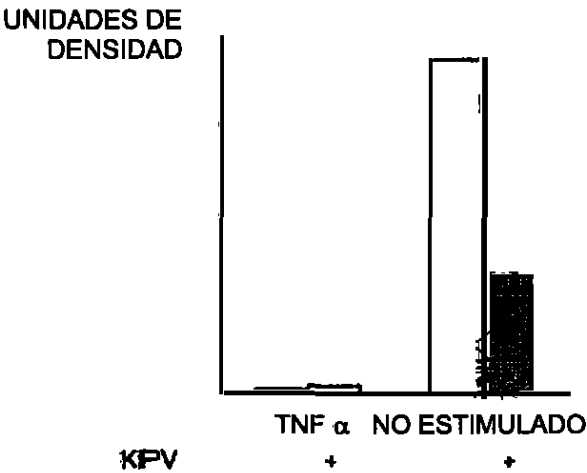


Fig 14

138-31

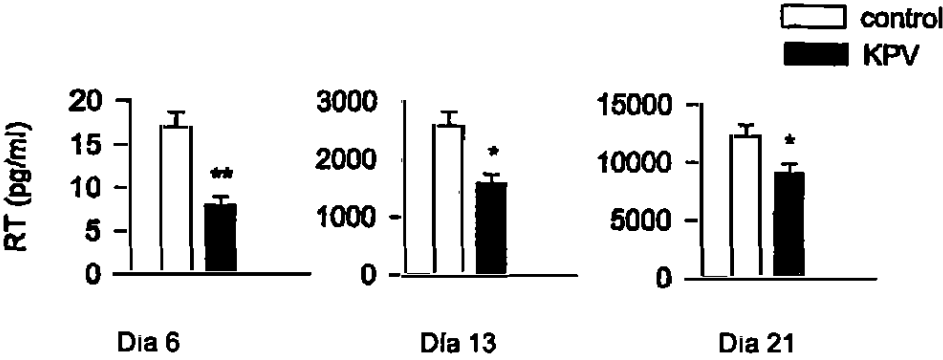


Fig 15

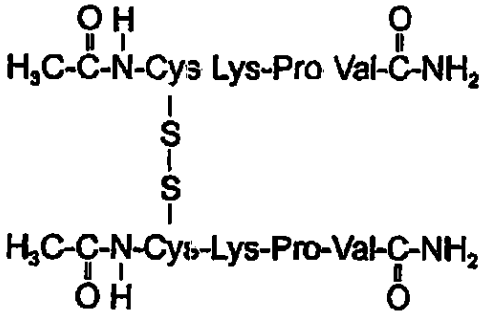
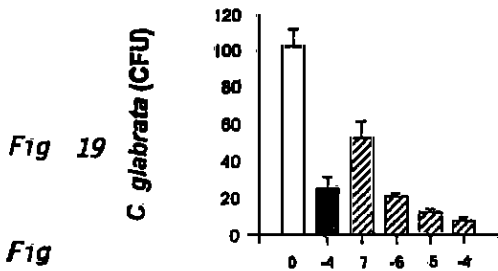
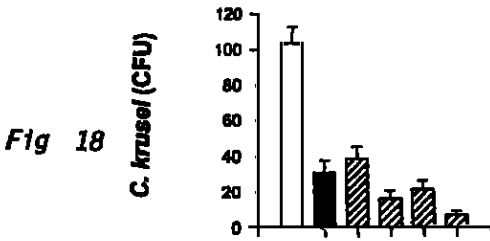
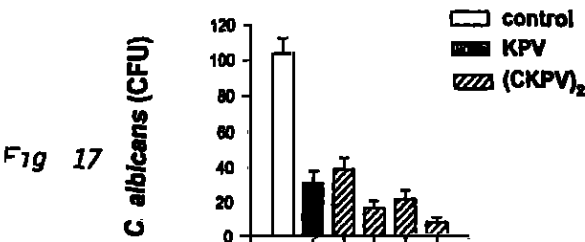


Fig 16

139



Concentracion de peptido (log M)

142

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/29322

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3
STN CAPLUS REGISTRY MEDLINE WEST
search terms: KFV preservative, alkali/acrylic polymer gelatin, CA, BOPOL, propylene glycol

54275 8005 WO 01

JPH/DS

RECEIVED

AUG 08 2005

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
MICHAEL J WISE
DAVID P DEVLIN
P.O. BOX 1208
SEATTLE, WA 98111-1208

DOCKETED**PCT PERKINS COIE LLP**

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) 04 AUG 2005

Applicant's or agent's file reference
542758005W01

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US04/29322

International filing date
(day/month/year) 08 September 2004 (08.09 2004)

Applicant
ZENGEN, INC.

- 1 ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46).

When? The time limit for filing such amendments is currently two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No. +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

- 2 ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest, the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis 1 and 90bis 2 respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. Such comments would not be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later). Otherwise, the applicant must, within 18 months from the priority date, perform the national phase before the designated Office.

In respect of other designated Offices, the time limit of 18 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IS/A/2 for details about the applicant's responsibilities by O, as well as the CT Applicant's Guide, Volume II National Chapters and the WIPO Handbook.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT Area ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22303-1450
Facsimile No. (703) 305-3233

Authorized Officer

Signature: [Signature]
Telephone No. (571) 277-1654

Form PCT/ISA/210 (January 2004)

(see notes on accompanying sheet)

144

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 542758005W01	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No. PCT/US04/29322	International filing date (day/month/year) 08 September 2004 (08.09.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 08 September 2003 (08.09.2003)
Applicant ZENGEN, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

Basis of the Report

1. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23 (b)).
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
3. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II).
4. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III).
5. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.
 ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

6. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38(6), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

7. With regard to the drawings,

- a. the number of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 16



as suggested by the applicant



as selected by this Authority because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority because this figure better characterizes the invention.

- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

145

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/29322

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) A61K 38/08

US CL 424/400

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. 424/400 514/17 18

Documentation searched other than minimum documentation in the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,803,044 B1 (CATANIA et al.) 12 October 2004 (12.10.2004) see entire document.	1-42
A	US 6,894,028 B2 (LIPTON et al.) 17 May 2005 (17.05.2005) see entire document.	1-42
A	US 6,780,838 B2 (LIPTON et al.) 24 August 2004 (24.08.2004) see entire document.	1-42

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See parent family annex.

Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

B earlier application or process published prior to the international filing date.

C document which may throw doubts on priority of (a) which is cited as constituting the prior art of an international application (as published).

D document relating to an oral disclosure, use, exhibition or demonstration.

F document published prior to the international filing date but later than the priority date.

T document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to disclose the principle or theory underlying the invention.

X document of particular relevance, the disclosure of which is considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone.

Y document of particular relevance, it claimed the disclosure of which is considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents such as constituting the state of the art.

Z document of the prior art which is not cited.

Date of actual completion of the international search

25 July 2005 (25.07.2005)

Date of mailing of the international search report

04 AUG 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT AUSA 3A/US
Communication for Patents
P.O. Box 14,0
Alexandria, Virginia 22303-450
Telephone No. (03) 305-3230

Search officer

Dr. John J. Johnson
Telephone No. (571) 272-1862

PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT DOCKETED

To:
MICHAEL J WISE
DAVID F. DEVLIN
P.O. BOX 1206
SEATTLE, WA 98111 1208WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis 1)

Date of mailing
(day/month/year) 04.11.2005

Applicant's or agent's file reference

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

542758005W01

International application No.

International filing date (day/month/year)

Priority date (day/month/year)

PCT/US04/29322

18 September 2004 (08.09.2004)

08 September 2003 (08.09.2003)

International Patent Classification (IPC) or International Classification and IPC

IPC(7) A61K 38/08 and US Cl. 424/400

Applicant

ZENGEN, INC.

1 This opinion contains indications relating to the following items

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis 1(e)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority (IPEA) except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1a(i) that a written opinion of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together where appropriate, with amendments, before the expiration of 2 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before its expiration of 12 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT Attr. SA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1-50
Alexandria, Virginia 22313-0050

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

B. Del Carmen

Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

143

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US94/29322

Box No. 1 Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23(h)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequences disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. mode of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

148

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/29322

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability citations and explanations supporting such statement			rial
1 Statement			
Novelty (N)	Claims 1-42		YES
	Claims NONE		NO
Inventive step (IS)	Claims 1-42		YES
	Claims NONE		NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-42		YES
	Claims NONE		NO
2. Citations and explanations			
Claims 1-42 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(3) because the prior art does not teach or fairly suggest the KPM compositions and uses thereof as instantly claimed.			
Claims 1-42 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus have industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.			

149

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, Article, Rule and Section refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, an opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g., the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How? Either by cancelling one or more existing claims by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims when, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no numbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 28.3(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/ may accompany amendments**Letter (Section 28.5(b))**

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the Statement under Article 19(1) (see below under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the holder's option. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Roy &
Asociados S.A.
Ingeniería de Software y Tecnología

150

Expediente No		06034897	No de Folia
Item		NO de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	1	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS		
Observaciones			
Arce Final			



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

2

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION (✓)	MODELO DE UTILIDAD ()	USUARIO ()	RADICADOR ()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente ✓	()	()	(✓)
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud ✓	()	()	(✓)
Descripción de la invención ✓	()	()	(✓)
Dibujos de ser estos pertinentes. ✗	()	()	(✓)
Comprobante de Pago de las tasas establecidas ✓	()	()	(✓)
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

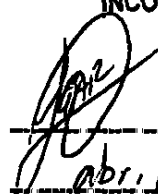
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación grafica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del Esquema Trazado	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable

Fecha


abr. 1 10 de 2006

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá
 2020

Doctor(a)
 RODRIGUEZ DILIA MARIA

377

REFERENCIA	Radicación No	06 34897
	Solicitud internacional	US2004/029322
	Fecha inicio fase nacional	10/04/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No	8430

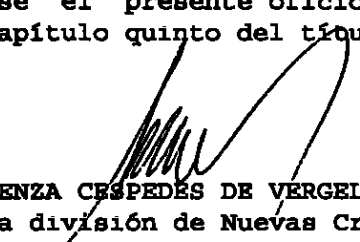
Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

1 La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486

2 La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante cuando ésta fuere persona jurídica

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486 se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerara abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2 literal e) del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No 10 de 2001.


 ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
 Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 AGO 2006 jramos

04-10-06