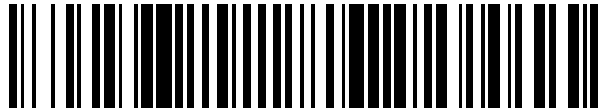


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 045**

51 Int. Cl.:

A01N 59/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08826313 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2141996**

54 Título: **Métodos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas utilizando compuestos de galio**

30 Prioridad:

02.04.2007 US 909658 P

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

16.04.2013

73 Titular/es:

**MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE (100.0%)
One Gustave L. Levy Place
New York, New York 10029, US**

72 Inventor/es:

**PERL, DANIEL P. y
MOALEM, SHARON**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 401 045 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas utilizando compuestos de galio.

1. Introducción

La presente es una solicitud de patente internacional PCT que reivindica la prioridad bajo 35 U.S.C. § 120 de la solicitud provisional de EEUU nº 60/909.658, presentada el 2 de abril de 2007.

La presente invención se refiere a métodos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas provocadas por diversos microorganismos extracelulares, incluyendo bacterias y hongos, utilizando compuestos de galio. En particular, la invención se refiere al uso farmacéutico de compuestos de galio para prevenir o tratar enfermedades infecciosas mediante su administración sistémica, tal como mediante una administración oral, una administración intravenosa, una administración intramuscular, una administración subcutánea, y similares. Las enfermedades infecciosas que pueden prevenirse o tratarse mediante la presente invención incluyen las provocadas por microorganismos que se sabe que son resistentes a antibióticos convencionales y/o fármacos.

2. Antecedentes de la invención

La aparición de un número cada vez mayor de microorganismos patógenos letales que son resistentes a los antibióticos convencionales y a otros agentes antimicrobianos se ha convertido en un gran problema para la salud pública a nivel mundial. La excesiva emisión de recetas/uso de antibióticos en seres humanos y animales de granja ha contribuido a un rápido desarrollo de cepas resistentes a antibióticos de diversos microorganismos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, conocido por ser una causa habitual de infecciones adquiridas en hospitales ("nosocómicas") que pueden extenderse al corazón, los huesos, los pulmones y la corriente sanguínea con consecuencias fatales si no se trata, ya estaba controlado por la penicilina a principios de la década de los cuarenta. Sin embargo, a finales de los sesenta, más del 80% de *Staphylococcus aureus* había desarrollado resistencia a la penicilina, y en 1972 se descubrió que 2% de *Staphylococcus aureus* era resistente a la metilicina. El porcentaje de bacterias resistentes a la metilicina continuó aumentando hasta 57,1% en 2002 ("Bad Bugs, No Drugs", por Infectious Diseases Society of America ("IDSA"), julio de 2004, basado en Centers for Disease Control ("CDC") National Nosocomial Infections Surveillance System, agosto de 2003).

De manera similar, el porcentaje de enterococos, una causa importante de endocarditis, así como otras infecciones nosocómicas, incluyendo bacteremia e infecciones del tracto urinario y de heridas, que son resistentes a la vancomicina (VRE) ha aumentado desde finales de los ochenta, y en 2002 más del 27% de las muestras de enterococos ensayadas procedentes de unidades de cuidados intensivos eran resistentes a la vancomicina (según IDSA, 2004, *supra*). Otras bacterias de las cuales se sabe que han desarrollado resistencia a antibióticos incluyen estafilococos negativos a coagulasa resistentes a metilicina ("CNS"), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ceftazidima, *Escherichia coli* resistente a ampicilina, *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, y similares. Además, la resistencia a fármacos ya no se limita a las infecciones adquiridas en el medio hospitalario, sino que se ha extendido a las infecciones adquiridas en el medio social, según prueba, por ejemplo, el total de 12.000 casos de infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (MRSA) adquiridas en el entorno social en instalaciones penitenciarias en Georgia, California y Texas entre 2001 y 2003 (2004, IDSA, *supra*).

Los microorganismos resistentes a antibióticos causan una enorme carga económica a la sociedad. Las enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos resistentes a fármacos requieren hospitalizaciones más largas, un coste más alto por medicaciones alternativas, más pérdida de días laborables, etc., y a menudo provocan la muerte. Según el informe del Institute of Medicine ("IOM") (1998, *Antimicrobial Resistance: Issues and Options*), las infecciones provocadas por MRSA cuestan una media de 31.400 dólares por caso a tratar. Se cree que el coste total para la sociedad estadounidense de los microorganismos resistentes a fármacos es de al menos 4.000 millones a 5.000 millones de dólares anuales.

A pesar de la necesidad urgente de nuevos fármacos para controlar la resistencia antimicrobiana, el desarrollo de nuevos antibióticos se ha frenado considerablemente en los últimos años a medida que el centro de atención del desarrollo de productos en el campo farmacéutico se ha desplazado hacia las enfermedades crónicas, en lugar de las enfermedades agudas, tales como las infecciones bacterianas agudas, principalmente debido a una mayor rentabilidad asociada con el tratamiento de las primeras (marzo de 2004, por U.S. Food and Drug Administration ("FDA"), Innovation/Stagnation: Challenge and Opportunity on the Critical Path to New Medical Products; y diciembre de 2003, por Sellers, L.J., "Big Pharma bails on anti-infectives research", *Pharmaceutical Executive*, 22). Según IOM y FDA, sólo se han desarrollado dos nuevas clases de antibióticos en los últimos 30 años: las oxazolidinonas en 2000, y los lipopéptidos en 2003, y ya se ha indicado resistencia a las oxazolidinonas.

El galio es un elemento semimetálico del grupo IIIa que se ha utilizado durante muchos años para diagnosticar los neoplasmas y la inflamación en el campo de la medicina nuclear. El galio también ha demostrado algo de eficacia en el tratamiento del cáncer (Adamson *et al.*, 1975, *Cancer Chemothe. Rept.*, 59:599-610; Foster *et al.*, 1986, *Cancer Treat Rep.*, 70:1311-1319; Chitambar *et al.*, 1997, *Am. J. Clin. Oncol.*, 20:173-178), hipercalcemia relacionada con cáncer sintomática (Warrell *et al.*, 1989, en "Gallium in the treatment of hypercalcemia and bone metastasis",

Important Advances in Oncology, pp. 205-220, J.B. Lippincott, Filadelfia; Bockman *et al.*, 1994, Semin. Arthritis Rheum., 23:268-269), reabsorción ósea (Warrell *et al.*, 1984, J. Clin. Invest., 73:1487-1490; Warrell *et al.*, 1989, *supra*), enfermedades autoinmunitarias y rechazo de aloinjertos (Matkovic *et al.*, 1991, Curr. Ther. Res., 50:255-267; Whitacre *et al.*, 1992, J. Neuro. Immunol., 39:175-182; Orosz C.G. *et al.*, 1996, Transplantation, 61:783-791; Lobanoff M.C. *et al.*, 1997, Exp. Eye Res., 65:797-801), estimulación de la curación de heridas y reparación de tejidos (Bockman *et al.*, patente de EEUU nº 5.556.645; Bockman *et al.*, patente de EEUU nº 6.287.606) y ciertas infecciones, tales como la sífilis (Levaditi C. *et al.*, 1931, C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat., 192:1142-1143), infecciones intracelulares bacterianas, fúngicas o parasitarias, tales como tuberculosis, histoplasmosis, y leishmaniasis, respectivamente (Olahanmi *et al.*, 1997, J. Invest. Med., 45:234A; Schlesinger *et al.*, patente de EEUU nº 6.203.822; Bernstein, *et al.*, publicación de solicitud de patente internacional nº WO 03/053347), infección por *Pseudomonas aeruginosa* (Schlesinger *et al.*, patente de EEUU nº 6.203.822), y tripanosomiasis (Levaditi C. *et al.*, *supra*).

Aunque el mecanismo exacto de la actividad de galio contra la reabsorción ósea y la hipercalcemia no se entiende bien, se cree que sus propiedades antiproliferativas contra células del cáncer y sus actividades antimicrobianas son debidas probablemente a su competición con el hierro férrico (es decir, Fe³⁺) por la captación por las células del cáncer o los microorganismos (Bernstein, 1998, Pharmacol. Reviews, 50(4):665-682). El hierro es un elemento fundamental para la mayoría de los organismos vivos, incluyendo muchos patógenos, y es necesario para la síntesis del ADN y para diversas reacciones de oxidación-reducción (Byers *et al.*, 1998, Metal Ions Bio. Syst., 35:37-66; Guerinot *et al.*, 1994, Annu. Rev. Microbiol., 48:743-772; Howard, 1999, Clin. Microbiol. Reviews, 12(3):394-404). Se sabe que el Ga³⁺ tiene unas químicas de coordinación y en disolución similares a las del Fe³⁺ (Shannon, 1976, Acta Crystallographica, A32:751-767; Huheey *et al.*, 1993, en Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity, ed. 4, Harper Collins, NY; Hancock *et al.*, 1980, en Org. Chem., 19:2709-2714) y se comporta de forma muy similar al Fe³⁺ *in vivo* uniéndose a la proteína transportadora de hierro transferrina (Clausen *et al.*, 1974, Cancer Res., 34:1931-1937; Vallabhajosula *et al.*, 1980, J. Nucl. Med., 21:650-656). Se especula que el galio entre en los microorganismos a través de sus mecanismos de transporte de hierro e interfiere con su síntesis de ADN y de proteínas.

La patente de EEUU nº 5.997.912 describe un método para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la administración de compuestos de galio por vía intravenosa, oral o mediante aerosol, y la publicación de solicitud de patente de EEUU nº 2006/0018945 describe un método para prevenir o inhibir la formación de un crecimiento de una biopelícula utilizando compuestos del galio.

La patente de EEUU nº 6.203.822 y la solicitud de patente internacional nº WO 03/053347 describen métodos para tratar a pacientes infectados por bacterias intracelulares, en particular, especies del género *Mycobacterium*, mediante la administración intravenosa u oral de compuestos de galio a pacientes infectados por esta clase de bacterias (véase también Olakanmi *et al.*, 2000, Infection and Immunity, 68(10):5619-5627). Estos organismos principalmente infectan a macrófagos, que se sabe que almacenan una gran cantidad de hierro y sobreexpresan los receptores de transferrina. Los compuestos de galio administrados por vía parenteral u oral son captados con facilidad por los macrófagos a través de los receptores de transferrina y después, ya dentro de estas células, son captados por el organismo infeccioso, interfiriendo con ello en el metabolismo del organismo.

Las actividades antimicrobianas del galio frente a microorganismos distintos a organismos intracelulares aún no se han explorado en profundidad.

Además, el uso de compuestos de galio frente a un número cada vez mayor de microorganismos resistentes a múltiples antibióticos aún no ha sido explorado.

3. Sumario de la invención

Esta invención se basa en el descubrimiento de los inventores de que los compuestos de galio son eficaces para controlar el crecimiento de una diversidad de microorganismos patógenos extracelulares, incluyendo los microorganismos de los cuales se sabe que son resistentes a los antibióticos convencionales y/o fármacos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos extracelulares, comprendiendo dicho método la administración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un compuesto de galio. Los microorganismos extracelulares excluyen *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella spp.*, pero incluyen otros microorganismos patógenos extracelulares dependientes del hierro. Estos microorganismos pueden ser bacterias u hongos, que infectan a organismos hospedantes, incluyendo mamíferos y aves, y más en particular seres humanos. Estos microorganismos incluyen, pero no se limitan a bacterias dentro de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chlamydia*, *Coxilla*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Tropheryma*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Capnocytophaga*, *Erysipelothrix*, *Listeria*, *Yersinia*, y similares; y hongos, tales como *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Malassezia furfur*, *Pityriasis versicolor*, *Exophiala werneckii*, *Trichosporon beigeli*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*, *Epidermophyton spp.*, *Fusarium spp.*,

Zygomycetes spp., *Rhizopus spp.* *Mucor spp.*, etc.

En otra realización preferida, los microorganismos a los que se dirige la presente invención son resistentes al menos a un antibiótico o compuesto antimicrobiano distinto de un compuesto de galio. En una realización específica, este microorganismo resistente a fármacos incluye, pero no se limita a *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina (VRE), *E. coli* resistente a ampicilina (por ejemplo, *E. coli* O157:H7), *Salmonella typhi* resistente a fluoroquinolona, *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima, y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolona, y similares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos extracelulares, distintos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella spp.*, comprendiendo dicho método la administración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un compuesto de galio, y al menos otro agente antimicrobiano. Estos otros agentes antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a agentes antibacterianos, tales como antibióticos convencionales, agentes antifúngicos, y otros agentes naturales o sintéticos con actividades antimicrobianas.

3.1. Definiciones

El término "sujeto", tal como se emplea en la presente, se refiere a un animal, incluyendo un ave de corral (por ejemplo, pollo, pavos y similares), y un mamífero, tal como un mamífero no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, etc.) y un primate (por ejemplo, monos y seres humanos), lo más preferiblemente un ser humano.

El término "sistémico" o la expresión "por vía sistémica", tal como se emplean en la presente, se refieren a una administración de compuestos de galio a un sujeto de una manera mediante la cual el compuesto se distribuye a través de todo el cuerpo del sujeto principalmente a través del sistema circulatorio, tal como el sistema cardiovascular, incluyendo el corazón y los vasos sanguíneos, y el sistema linfático, incluyendo los nódulos linfáticos, los vasos y conductos linfáticos. Así, las administraciones sistémicas del compuesto de galio incluyen la administración oral y la administración parenteral, incluyendo las administraciones intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal, así como supositorios, y similares. En ciertas situaciones, la administración sistémica también puede proporcionar la ventaja de un contacto directo del compuesto con los organismos causativos, sin pasar por los sistemas circulatorios. Por ejemplo, el compuesto de galio que se administra por vía oral puede ejercer su efecto no sólo a través de la distribución sistémica, sino también a través del contacto directo con los microorganismos que infectan el tracto digestivo.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere a la cantidad de compuestos de galio suficiente para prevenir una enfermedad o un trastorno asociados con microorganismos patógenos. Una cantidad profilácticamente eficaz puede referirse a la cantidad de compuestos de galio suficiente para prevenir o suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos o para matar a los microorganismos patógenos en un sujeto.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se emplea en la presente, se refiere a la cantidad de compuestos de galio suficiente para tratar, controlar o mejorar una enfermedad o un trastorno provocados por organismos patógenos en un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de compuestos de galio suficiente para reducir el número de microorganismos patógenos, para suprimir el crecimiento de microorganismos patógenos (es decir, estasis), o para matar a los microorganismos patógenos en los sitios afectados o en la corriente sanguínea de un sujeto. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de compuestos de galio significa la cantidad de los compuestos de galio solos, o en combinación con otras terapias y/u otros fármacos, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, el control o la mejora de una enfermedad o un trastorno.

4. Descripción detallada de la invención

4.1. El galio y el transporte del hierro

La mayoría de los microorganismos, con unas pocas excepciones (por ejemplo, *Lactobacillus spp.*, véase Archibald, 1983, FEMS Microbiol. Lett., 19:29-32; Weinberg, 1997, Perspectives in Biology and Medicine, 40(4):578-583; y *Borrelia burgdorferi*, véase Posey *et al.*, 2000, Science, 288:1651-1653), necesitan el hierro para su supervivencia (Weinberg, 1978, Microbiol. Rev., 42:45-66; Neilands, 1972, Struct. Bond., 11:145-170). A pesar del hecho de que el hierro es uno de los metales más abundantes, su disponibilidad para los microorganismos está limitada debido a su existencia en forma de compuestos insolubles (óxidos-hidróxidos) en entornos aerobios (Guerinot, 1994, *supra*; Spiro *et al.*, 1966, J. Am. Chem. Soc., 88:2721-2725; Vander Helm *et al.*, 1994, en Metal ions in fungi, vol. 11, pp. 39-98, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY). Por consiguiente, los microorganismos, tales como bacterias y hongos, han desarrollado diversos mecanismos para adquirir hierro frente a su disponibilidad limitada en el entorno (Howard, 1999, *supra*).

Uno de estos mecanismos es la síntesis de potentes compuestos quelantes de hierro denominados sideróforos. Los microorganismos producen sideróforos, que se unen a Fe^{3+} en el entorno y son transportados hacia el interior de las

células de los microorganismos a través de sistemas de transporte específicos, en donde el Fe^{3+} se libera como Fe^{2+} y después se almacena. Los sideróforos conocidos incluyen hidroxamatos, tales como ácido rodotorúlico, coprógenos, ferricromos, y fusarininas; policarboxilatos; fenolatos-catecolatos y desferioxamina (Howard, 1999, *supra*). Otros mecanismos incluyen la internalización directa del hierro complejoado con sideróforos o transportadores de hierro del hospedante (por ejemplo, transferrina y lactoferrina), mecanismos de reductasa asociados a membranas, y mecanismos mediados por receptores, así como mecanismos de transferencia directa mediados por membranas (Howard, 1999, *supra*; Crosa, 1997, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61:319-336; Payne, 1994, *Methods Enzymol.*, 235:329-344). La disponibilidad de hierro a través de estos mecanismos está muy ligada a la virulencia de los microorganismos (Litwin *et al.*, 1993, *Clin. Microbiol. Reviews*, 6(2):137-149), y cada organismo puede tener múltiples mecanismos alternativos para obtener hierro de entornos con escasez de hierro para mantener su crecimiento y su supervivencia (por ejemplo, véase Spatafora *et al.*, 2001, *Microbiology*, 147:1599-1610).

Se ha indicado que el ion galio (Ga^{3+}) y el ión férrico (Fe^{3+}) tienen importantes similitudes bioquímicas, en particular, con respecto a su unión a proteínas y quelantes. Estas similitudes se atribuyen principalmente a su radio iónico comparable y a los grados de contribución iónica (electrostática) frente a covalente en la unión (para un informe, véase Bernstein, 1998, *supra*). Debido a estas similitudes, el Ga^{3+} puede imitar al Fe^{3+} en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, el Ga^{3+} se une a la transferrina (véase, por ejemplo, Clausen *et al.*, 1974, *Cancer Res.*, 34:1931-1937; Vallabhajosula *et al.*, 1980, *J. Nucl. Med.*, 21:650-656) y es transportado hacia el interior de la célula a través de una endocitosis mediada por transferrina (Chitambar, 1987, *Cancer Res.*, 47:3929-3934).

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se cree que el Ga^{3+} puede unirse competitivamente con los sideróforos y puede ser captado con facilidad por los microorganismos, en donde puede alterar la síntesis de ADN y de proteínas, o unirse a proteínas bacterianas y afectar al crecimiento de los microorganismos, conduciendo finalmente a la estasis o la muerte de los organismos. Como alternativa, es posible que el Ga^{3+} pueda ocupar las reductasas de membrana de los microorganismos y evitar que el Fe^{3+} se una a las reductasas para ser reducido a Fe^{2+} , que es más biodisponible que el Fe^{3+} . Puesto que la captación del galio no mata inmediatamente a los microorganismos sino que conduce más bien a una estasis inicial (es decir, un estado en el que el crecimiento o la multiplicación de los microorganismo están inhibidos), presenta un riesgo reducido de generar microorganismos resistentes. Además, debido a que el hierro es un elemento fundamental para que los microorganismos patógenos sobrevivan y a que las similitudes bioquímicas entre el hierro y el galio son tan grandes, también es menos probable que los microorganismos puedan desarrollar mecanismos que puedan discriminar el hierro del galio y hacerse resistentes al galio. El galio también puede evitar que un microorganismo produzca toxinas interfiriendo con su producción de enzimas de toxinas.

La presente invención aprovecha estas características de los compuestos de galio y proporciona métodos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas provocadas por dichos patógenos, incluyendo los que son resistentes al menos a un agente antimicrobiano distinto del galio.

4.2. Compuestos de galio

Los compuestos de galio adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier compuesto que contiene galio que sea farmacéuticamente aceptable y seguro para su uso en animales, tales como su uso en aves y mamíferos, en particular, para un uso en seres humanos. Los compuestos de galio se han utilizado en usos de diagnóstico y terapéuticos en seres humanos, y se sabe que son seguros para un uso en seres humanos (véase Foster *et al.*, 1986, *supra*; Todd *et al.*, 1991, *Drugs*, 42:261-273; Johnkoff *et al.*, 1993, *Br. J. Cancer*, 67:693-700).

Los compuestos de galio farmacéuticamente aceptables para su uso en la presente invención incluyen nitrato de galio, maltolato de galio, citrato de galio, fosfato de galio, cloruro de galio, fluoruro de galio, carbonato de galio, formiato de galio, acetato de galio, sulfato de galio, tartrato de galio, oxalato de galio, óxido de galio, y cualquier otro compuesto de galio que pueda proporcionar, de una manera segura, unos niveles eficaces del elemento galio en diversas aplicaciones.

4.3. Uso farmacéutico de los compuestos de galio

La presente invención está dirigida a métodos para prevenir o tratar enfermedades infecciosas mediante la administración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de compuestos de galio.

Los ejemplos de enfermedades infecciosas que puede tratarse mediante la presente invención son aquellas en las que el sujeto que se va a tratar puede beneficiarse de una administración sistémica de compuestos de galio e incluyen, pero no se limitan a las provocadas por bacterias extracelulares de especies de *Staphylococcus*, tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y similares; de *Enterococcus*, tales como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, y similares; de *Salmonella*, tales como *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, y similares; de *Escherichia*, tales como *Escherichia coli*, y similares; de *Streptococcus*, tales como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, y similares; de *Helicobacter*, tales como *Helicobacter pylori*, y similares; de *Campylobacter*, tales como *Campylobacter jejuni*, y similares; así como de especies de los géneros *Yersinia*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Tropheryma*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Capnocytophaga*,

Bacillus, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Listeria* y similares. Los ejemplos de enfermedades infecciosas que pueden tratarse mediante la presente invención también incluyen infecciones provocadas por hongos, tales como *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Malassezia furfur*, *Pityriasis versicolor*, *Exophiala werneckii*, *Trichosporon beigeli*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*, *Epidermophyton spp.*, *Fusarium spp.*, *Zygomycetes spp.*, *Rhizopus spp.* *Mucor spp.*, etc.

Los compuestos de galio pueden administrarse mediante cualquier método que de como resultado la distribución o el transporte sistémico de los compuestos de galio, e incluye la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración intravenosa, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración intraperitoneal, y similares. En ciertas infecciones, la administración oral de los compuestos de galio proporciona no solo la distribución/transporte sistémico de los compuestos de galio hacia el área afectada, sino también un contacto directo de los compuestos con los microorganismos causativos en el área afectada, tal como dentro del tracto digestivo. Así, la administración oral de los compuestos de galio es especialmente útil para prevenir o tratar infecciones del tracto digestivo provocadas por diversos microorganismos que incluyen, pero no se limitan a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, y similares. *Helicobacter pylori*, que provoca úlceras gástricas y duodenales, gastritis, duodenitis, y cáncer gástrico, también es una buena diana para los métodos de la presente invención.

Además, los métodos de la presente invención pueden aplicarse para prevenir o tratar enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos que son resistentes al menos a un agente antimicrobiano distinto de los compuestos de galio. La expresión "agente antimicrobiano" utilizada en la presente se refiere a cualquier agente natural o sintético que mata microorganismos o que inhibe su crecimiento, de modo directo o indirecto, e incluye antibióticos convencionales, así como agentes quimioterapéuticos sintéticos, tales como sulfonamidas, isoniazid, AZT, antibióticos peptídicos sintéticos, y similares. Así, en una realización específica, las enfermedades infecciosas que pueden prevenirse o tratarse mediante la presente invención están provocadas por cepas resistentes a agentes antimicrobianos de los microorganismos mencionados anteriormente, en particular de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, y similares. De modo más específico, estos organismos resistentes a agentes antimicrobianos incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina (VRE), *E. coli* resistente a ampicilina (por ejemplo, *E. coli* O157:H7), *Salmonella typhi* resistente a fluoroquinolona, *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima, *Neisseria gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolona, y similares. Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier otro organismo patógeno que se haya hecho resistente a agentes antimicrobianos distintos del galio, siempre que dependan del hierro para su crecimiento y su supervivencia.

Los compuestos de galio que se van a utilizar en la presente invención pueden formularse de una manera convencional utilizando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Tal como se emplea en la presente, la expresión "vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y de retraso en la absorción, y similares, que sean compatibles con la administración farmacéutica. El uso de diversos vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Con respecto a los compuestos de galio, una fórmula inyectable de nitrato de galio (Ganite™) está disponible en el mercado en Genta Inc. (Berkeley Heights, NJ). Ganite™ es una disolución acuosa de $\text{Ga}(\text{NO}_3) \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y citrato de sodio deshidratado. Una fórmula oral del maltolato de galio desarrollada por Titan Pharmaceuticals, Inc. (san Francisco, CA) está en la actualidad en ensayos clínicos de fase II con pacientes con cáncer de próstata metastásico y mieloma múltiple refractario.

La cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, dosificación) de un compuesto de galio puede variar basándose en la naturaleza y la gravedad de la infección que se va a tratar, de los tipos de microorganismos etiológicos, de la localización del área afectada, del método de administración, de la edad y entorno inmunológico de un sujeto, de los tipos de compuestos de galio utilizados, así como de otros factores evidentes para los expertos en la técnica. Generalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de galio puede ser la cantidad que produce una concentración de galio en el área afectada del cuerpo o en el plasma sanguíneo de al menos aproximadamente 1 μM , al menos aproximadamente 50 μM , al menos aproximadamente 100 μM , al menos aproximadamente 500 μM , al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM, al menos aproximadamente 200 mM, hasta aproximadamente 500 mM. Debido a la baja toxicidad del galio, la cantidad puede aumentarse libremente hasta más de 500 mM pero menos que la cantidad que provoque toxicidad. Como referencia, se ha indicado que los adultos sanos pueden tolerar al menos aproximadamente 200 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ de nitrato de galio mediante infusión intravenosa durante al menos 7 días (véase la patente de EEUU n° 6.203.822, *supra*). Además, una administración oral de 100 mg hasta 1400 mg cada 24 horas como agente individual no provoca una toxicidad importante en pacientes con cáncer de ovario y pacientes con cáncer de pulmón (véase Collery *et al.*, 2002, "Gallium in cancer treatment", *Oncology/Hematology*, 42:283-296). Así, para los métodos de la presente invención, lo que se contempla es la administración de los compuestos de galio a una dosificación de al menos aproximadamente 10 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$, al menos aproximadamente 50 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$, al

menos aproximadamente 100 mg/m²/día, al menos aproximadamente 200 mg/m²/día, al menos aproximadamente 300 mg/m²/día, al menos aproximadamente 500 mg/m²/día, al menos aproximadamente 600 mg/m²/día, al menos aproximadamente 700 mg/m²/día, o al menos aproximadamente 800 mg/m²/día, pero menos que la dosificación que provoca toxicidad.

- 5 La cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto de galio puede ser la cantidad suficiente para prevenir una enfermedad o un trastorno asociado con los microorganismos patógenos, y puede variar basándose en la localización del área afectada, de los tipos y el número de organismos patógenos en el área, de los tipos de compuestos de galio utilizados, así como de los métodos de aplicación y otros factores que son evidentes para los expertos en la técnica. Generalmente, la cantidad profilácticamente eficaz de un compuesto de galio puede ser la cantidad que produce una concentración de galio en el área afectada del cuerpo, o en el plasma sanguíneo, de al menos aproximadamente 0,1 µM, al menos aproximadamente 50 µM, al menos aproximadamente 100 µM, al menos aproximadamente 500 µM, al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos aproximadamente 50 mM, al menos aproximadamente 100 mM, hasta aproximadamente 200 mM. De nuevo, la cantidad de un compuesto de galio para objetivos profilácticos puede aumentarse libremente hasta más de 200 nM pero menos que la dosificación que provoca toxicidad.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para prevenir y/o tratar enfermedades infecciosas provocadas por microorganismos extracelulares, comprendiendo dicho método la coadministración a un sujeto que lo necesita de cantidades profiláctica o terapéuticamente eficaces, de modo individual o colectivo, de un compuesto de galio y al menos otro agente antimicrobiano. El término "coadministración" utilizado en la presente se refiere a la administración de un compuesto de galio y al menos otro agente antimicrobiano de modo secuencial en cualquier orden o de modo simultáneo, mediante el mismo método de administración o una combinación de diferentes métodos de administración, por ejemplo, mediante una administración intravenosa del compuesto de galio y una administración oral del otro agente antimicrobiano, o viceversa. Esta coadministración de uno o más agentes antimicrobianos con el compuesto de galio es especialmente beneficiosa debido a que los fármacos atacan a los organismos causativos mediante mecanismos completamente diferentes que no se solapan y/o porque el desarrollo de resistencia a agente antimicrobianos en los organismos puede implicar diferentes mecanismos para los diferentes agentes antimicrobianos, provocando con ello la erradicación casi completa de los organismos, por los propios fármacos o en combinación con las acciones del propio sistema inmunológico del hospedante, y la reducción o la eliminación de la oportunidad de que los organismos causativos desarrollen resistencia a los fármacos. Además, gracias a la baja toxicidad del galio, si se aumenta la dosificación del galio, una terapia de combinación puede reducir la dosificación de otro agente antimicrobiano hasta una cantidad menor que la requerida cuando este se utiliza por sí solo, reduciendo con ello sus efectos adversos. Además, la coadministración de un compuesto de galio y otro agente antimicrobiano puede producir un efecto sinérgico y, así, se requieren menos dosificaciones que las necesarias cuando cada uno de ellos se utiliza de modo individual.

35 Otros agentes antimicrobianos que pueden coadministrarse con los compuestos de galio pueden ser agentes antibacterianos o agentes antifúngicos, dependiendo del tipo de organismo causativo. Los ejemplos de agentes antibacterianos incluyen, pero no se limitan a los incluidos en las clases de penicilinas, incluyendo ampicilina, flucloxacilina, dicloxacilina, meticilina, ticarcilina, piperacilina, carbapenemos, mecillinamos, y similares; cefemos, incluyendo cefalosporina y cefamicinas; sulfonamidas; aminoglicósidos, incluyendo amicacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, estreptomycin, tobramicina, apramicina, y similares; cloranfenicol; tetraciclinas, incluyendo clortetraciclina, oxitetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, rolitetraciclina, y similares; macrólidos, incluyendo eritromicina, azitromicina, claritromicina, diritromicina, roxitromicina, carbomicina A, josamicina, ictasamicina, oleandomicina, espiramicina, troleandomicina, tilosina/tilocina, telitromicina, cetromicina, ansamicina, y similares; lincosamidas, incluyendo lincomicina, clindamicina, y similares; estreptograminas, incluyendo micamicinas, pristinamicinas, oestreomicinas, virginiamicinas, y similares; glicopéptidos, incluyendo acantomycin, actaplanina, avoparcina, balhemicina, bleomicina B (bleomicina cobre), cloroorienticina, cloropolisporina, demetilvancomicina, enduracidina, galacardina, guanidilfungina, hacimicina, demetilvancomicina, N-nonanoilteicoplanina, fleomicina, platomicina, ristocetina, estafilocidina, talisomicina, teicoplanina, vancomicina, victomicina, xilocandina, zorbamicina, y similares; rifamicinas, incluyendo rifampicina, rifabutina, rifapentina, y similares; nitroimidazoles, incluyendo metronidazol, nitrotiazoles, y similares; quinolonas, incluyendo ácido nalidíxico, cinoxacina, flumequina, ácido oxolínico, ácido piromídico, ácido pipemídico, ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina, nadifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, pefloxacina, rufloxacina, balofloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, mesilato de pazufloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, tosufloxacina, clinafloxacina, gemifloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina, sitafloxacina, trovafloxacina, y similares; inhibidores de la dihidrofolato reductasa, incluyendo trimetoprim; oxazolidinonas, incluyendo linezolid, eperezolid, y similares; lipopéptidos, incluyendo gramicidinas, polimixinas, surfactina, y similares; y sus análogos, sales y derivados. Los ejemplos de agentes antifúngicos incluyen, pero no se limitan a polienos, tales como anfotericina, nistatin, pimaricina, y similares; fármacos de azol, tales como fluconazol, itraconazol, quetocol, y similares; fármacos de alilamina y morfolina, tales como naftifina, terbinafina, amorolfina, y similares; fármacos antifúngicos de antimetabolitos, tales como 5-fluorocitosina, y similares; y sus análogos, sales y derivados.

Los agentes antimicrobianos que deben utilizarse en combinación con los compuestos de galio en cualquier infección concreta pueden ser determinados mediante diversos métodos sencillos y habituales conocidos por los

expertos en la técnica. Por ejemplo, un microorganismo infeccioso aislado de un paciente puede ensayarse para su sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos utilizando un método de difusión en disco estandarizado (por ejemplo, el método de difusión en disco de Kirby-Bauer). Brevemente, en este método, una placa de agar apropiada se inocula de modo uniforme con el organismo de ensayo y se colocan sobre la superficie del agar discos de papel impregnados con concentraciones predeterminadas de diferentes antibióticos. Después de la incubación, se mide el diámetro de una zona circular, alrededor de los discos, en la que el crecimiento del organismo está inhibido. El diámetro de la zona de inhibición es una función de la cantidad de antibiótico en el disco, así como de la susceptibilidad del organismo al antibiótico. Los antibióticos a los cuales el organismo muestra susceptibilidad pueden utilizarse para un tratamiento de combinación con los compuestos de galio. Otros ejemplos de ensayos de susceptibilidad a antibióticos incluyen, pero no se limitan a un método de dilución en tubo de caldo de cultivo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de un agente antimicrobiano concreto frente a un organismo concreto. Estos métodos se describen en la siguiente sección 6.1.

Así, en una realización específica, una infección provocada por MRSA puede tratarse mediante la coadministración de un compuesto de galio y vancomicina o linezolid (por ejemplo, Zyvox™ de Pfizer, NY) a un sujeto que lo necesita. La vancomicina y Zyvox™, respectivamente, se utilizan en la actualidad como antibióticos apropiados para tratar las infecciones por MRSA. De manera similar, en otra realización específica, una infección provocada por VRE puede tratarse mediante la coadministración de un compuesto de galio y linezolid. En otra realización específica, una infección o una enfermedad/trastorno (por ejemplo, úlceras pépticas, gastritis, duodenitis, cáncer gástrico, y similares) provocados por *Helicobacter pylori* pueden tratarse mediante la coadministración de un compuesto de galio y claritromicina, amoxicilina y/o metronidazol. Otros agentes que directa o indirectamente inhiben o suprimen el crecimiento de *Helicobacter pylori* también pueden administrarse con el compuesto de galio. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a inhibidores de la bomba de protones, tales como omeprazol, que se utilizan en la actualidad junto con claritromicina y amoxicilina en la terapia triple para úlcera péptica; e inhibidores de ureasa, tales como fluorofamida, ácido acetohidroxámico, ciertos iones metálicos divalentes, incluyendo Zn, Cu, Co, y Mn, y similares; así como otros agentes, tales como compuestos de bismuto (por ejemplo, subsalicilato de bismuto) que no sólo protegen el revestimiento estomacal mediante su recubrimiento, sino que también reprimen el crecimiento de *H. pylori* (S. Wagner *et al.*, 1992, "Bismuth subsalicylate in the treatment of H2 blocker resistant duodenal ulcers: role of *Helicobacter pylori*", *Gut*, 33:179-183).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende uno o más viales que contienen un compuesto de galio y uno o más agentes antimicrobianos adicionales.

5. Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar más a fondo la presente invención, pero no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

5.1. Estudio *in vitro*: susceptibilidad de los microorganismos al galio

Ejemplo 1

Se ensayó la susceptibilidad de diversos microorganismos al galio mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) para cada microorganismo utilizando nitrato de galio. En general, la MIC se determina (i) mezclando una serie de caldos de cultivo, conteniendo cada uno un número concreto de microorganismos, con disoluciones diluidas en serie del compuesto de galio; y (ii) la determinación de la MIC después de la incubación, es decir, la concentración más baja del compuesto de galio que inhibe el crecimiento del microorganismo. Cuanto menor sea la MIC, más susceptible es el organismo. La MBC se determina subcultivando una parte alícuota de cada muestra del ensayo de MIC sobre una placa de agar apropiada que no contiene compuesto de galio. Después de la incubación se determina que la MBC es la concentración más baja del compuesto de galio en la que no se observa crecimiento.

De modo específico, en el presente experimento, se disolvieron 2 gramos de polvo de nitrato de galio en 10 ml de agua desionizada esterilizada mediante filtración, y la disolución al 20% (en p/v) (es decir, 200 mg/ml) resultante de nuevo se esterilizó mediante filtración. Se prepararon diluciones en serie en dos veces en agua desionizada estéril hasta 0,156% (es decir, 1,56 mg/ml) para el ensayo de la mayoría de los organismos, excepto para el ensayo de *Candida albicans*, en el que se prepararon disoluciones de nitrato de galio del 10%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005% y 0,001%.

La tabla 1 muestra la lista de microorganismos ensayados para MIC y MBC. Todos los organismos se obtuvieron de the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Cada microorganismo se recogió del cultivo de siembra (véase la tabla 1) y se inoculó en el tipo de caldo de cultivo apropiado para obtener un patrón de turbidez MacFarland 0,5. La suspensión patrón del microorganismo entonces se diluyó hasta 1:100 con el caldo de cultivo y se utilizó para los ensayos.

Tabla 1

ORGANISMO DE ENSAYO	n° ATCC	CULTIVO DE SIEMBRA
<i>Candida albicans</i>	10231	Sobre agar-dextrosa Sabouraud, a 25-30 °C durante 24-48 horas
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA) ^a	33592	Sobre agar de soja triptico con sangre de oveja al 5% (BAP), a 35-37 °C durante 24-48 horas bajo condiciones aerobias
<i>Enterococcus faecalis</i> resistente a vancomicina (VRE) ^b	51575	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	35150	
<i>Salmonella typhi</i>	6539	
<i>Campylobacter jejuni</i>	29428	Sobre agar de <i>Brucella</i> con sangre de oveja al 5% a 35-37 °C durante 48 horas bajo condiciones microaerófilas (CampyPak™ de BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD)
<p>a. La resistencia a antibióticos del organismo se confirmó con el ensayo de difusión en disco de oxacilina del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). La zona de inhibición fue de 6 mm (intervalo de resistencia a oxacilina de CLSI: ≤ 10 mm).</p> <p>b. La resistencia a antibióticos del organismo se confirmó con el ensayo de difusión en disco de vancomicina del CLSI. La zona de inhibición fue de 10 mm (intervalo de resistencia a vancomicina de CLSI: ≤ 14 mm).</p>		

5 Cada microorganismo se ensayó por duplicado mediante un método de caldo de cultivo de microdilución en placas de 96 pocillos (es decir, 0,1 ml de la disolución de nitrato de galio mezclada con 0,1 ml de la suspensión del microorganismo) o un método de caldo de cultivo de macrodilución en tubos de ensayo (es decir, 1 ml de la disolución de nitrato de galio mezclada con 1 ml de la suspensión del microorganismo) como sigue:

Método del caldo de cultivo de microdilución: *Candida albicans*; *Escherichia coli* O157:H7; y *Campylobacter jejuni*.

Método del caldo de cultivo de macrodilución: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA); *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE); y *Salmonella typhi*.

El crecimiento de los microorganismos se determinó mediante la observación visual de la turbidez de las muestras.

10 Los siguientes controles se incubaron junto con las muestras de ensayo:

- control de viabilidad: una mezcla de volúmenes iguales de agua desionizada y un caldo de cultivo apropiado inoculado con un microorganismo de ensayo pero sin nitrato de galio; y

- control de esterilidad: una mezcla de volúmenes iguales de agua desionizada y un caldo de cultivo apropiado sin microorganismos ni nitrato de galio.

15 La pureza de cada microorganismo se confirmó mediante el cultivo en estrías de una suspensión del microorganismo diluida de modo apropiado sobre una placa de agar apropiada para obtener colonias aisladas y la observación de la morfología de las colonias.

20 Se determinaron las concentraciones de microorganismos en la suspensión utilizada en el ensayo de MIC mediante la inoculación de diluciones en serie de las suspensiones sobre placas de agar apropiadas y contando el número de colonias.

Para determinar la MBC, se inocularon 10 µl de cada muestra utilizada en MIC sobre una placa de agar apropiada y se incubó. Se determinó que la concentración más baja del nitrato de galio que no muestra crecimiento era la MBC.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla 2.

Tabla 2

Organismo de ensayo	Caldo de cultivo (MIC)	Placa de agar (MBC)	Condición de incubación	Conc. final del organismo (CFU/ml)	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Candida albicans</i>	dextrosa Sabouraud	agar dextrosa Sabouraud	a 27 °C durante 48 horas	9,75 x 10 ⁵	10	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Muller Hinton	agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5%	a 36 °C durante 48 horas	5,2 x 10 ⁵	ND	12,5
<i>Enterococcus faecalis</i> (VRE)	Muller Hinton	agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5%	a 36 °C durante 48 horas	3,9 x 10 ⁵	ND	25
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Muller Hinton	agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5%	a 36 °C durante 48 horas	1,38 x 10 ⁶	ND	6,25
<i>Salmonella typhi</i>	Muller Hinton	agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5%	a 36 °C durante 48 horas	8,3 x 10 ⁵	ND	6,25
<i>Campylobacter jejuni</i>	Muller Hinton	agar de soja tríptico con sangre de oveja al 5%	a 36 °C durante 48 horas	4,9 x 10 ⁵	ND	< 0,78

*ND: no se determinó debido a la turbidez no específica provocada por la precipitación del nitrato de galio en algunas diluciones.

5.2. Estudio *in vivo*: efecto del nitrato de galio en modelos animales

Ejemplo 2: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

5 Ratones BALBc adultos se inocularon con 1×10^6 CFU/ratón de la cepa MRSA de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, ATCC 33592) mediante inyección intraperitoneal. Después de las inyecciones bacterianas (aproximadamente 8 horas después de la inoculación), cada ratón recibió una única inyección intravenosa de uno de los siguientes: disolución salina al 0,9% (control), 30 mg/kg, 45 mg/kg, o 60 mg/kg de nitrato de galio, 200 mg/kg de vancomicina, o 45 mg/kg de nitrato de galio, y 200 mg/kg de vancomicina, todos en disolución salina al 0,9%. En el momento inicial hay 5 ratones en cada uno de los seis grupos. Después de la inoculación, los ratones se controlaron dos veces diarias para la morbilidad. Se obtiene la temperatura corporal dos veces diarias, y un ratón cuya temperatura corporal disminuye en 4 °C o más se considera moribundo y se eutaniza. Se toman los pesos corporales una vez diaria durante todo el estudio. En el día 5, los animales remanentes se eutanizan. Se recogen el bazo, los nódulos linfáticos y los riñones, se homogeneizan en PBS estéril y se diluyen en serie para la cuantificación bacteriana.

15 Ejemplo 3: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (VRE)

20 Ratones CF1 adultos se alojan en jaulas individuales y se determinan los recuentos totales de enterococos nativos y los posibles VRE en unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de heces como una línea de base para cada ratón. En el día 1, cada ratón recibe 0,5 ml (aproximadamente 10^9 CFU/ml) de una suspensión de VRE (por ejemplo, ATCC 51575) en caldo de cultivo Muller-Hinton (MHB), o sólo MHB (control), mediante sonda oral con un tubo de alimentación de acero inoxidable. Después, en intervalos especificados (por ejemplo, 1, 7, 14 días, etc.) se recogen 2 pelotitas fecales frescas de cada ratón, se pesan y se emulsionan con MHB, y se determinan los números de CFU de VRE, enterococos, y bacilos entéricos gram-negativos por gramo de heces mediante técnicas de dilución en serie y cultivo en placa convencionales. Por ejemplo, los recuentos de enterococos totales pueden medirse con agar de bilis-esulina, los recuentos de bacilos entéricos con agar MacConkey, y los recuentos de VRE con agar Muller-Hinton II que contiene vancomicina (50 µg/ml), estreptomina (100 µg/ml), polimixina (100 µg/ml) y nistatina (2 µg/ml) (véase M.S. Whitman *et al.*, 1996, "Gastrointestinal tract colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an animal model", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(6):1526-1530). Los grupos de ratones (al menos 5 ratones/grupo) se asignan para recibir a diario agua para beber estéril (control) o agua para beber que

contiene 100 µg/ml, 200 µg/ml, o 300 µg/ml de citrato de galio, 250 µg/ml de vancomicina, 250 µg/ml de linezolid, o 200 µg/ml de citrato de galio y 250 µg/ml de linezolid, comenzando 24 horas después de la inoculación de los ratones hasta los 10 días. Se determinan los recuentos de VRE y enterococos totales para cada grupo en intervalos especificados hasta 40 días después de la inoculación y se comparan con los recuentos de la línea de base.

5 Ejemplo 4: *Helicobacter pylori*

Ratones C57BL/6 se inoculan con la cepa SS1 de *Helicobacter pylori* adaptada a ratones (Lee A., O'Rourke *et al.*, 1997, "A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing Sydney strain", *Gastroenterology*, 112:1386-1397) mediante la administración intragástrica de 0,1 ml de suspensión bacteriana (aproximadamente $1-2 \times 10^9$ bacterias/ml) en un medio apropiado (por ejemplo, caldo de cultivo de *Brucella*). Los ratones control reciben 0,1 ml del medio sin las bacterias. Los ratones se dejan 1-3 semanas para que la colonización bacteriana se establezca. Los grupos de ratones (al menos 5 ratones/grupo) se asignan para recibir a diario, mediante sonda oral intragástrica, una disolución salina estéril (control), o 60 mg/kg, 80 mg/kg o 100 mg/kg de maltolato de galio con o sin 15 mg/kg de omeprazol en disolución salina durante 14 días. Los ratones se eutanizan 24 horas después de terminar el tratamiento. Se retira una sección longitudinal del tejido gástrico, se fija en una disolución de formaldehído, se introduce en parafina, y se corta a 8 µ para producir secciones histológicas. Las secciones se preparan con tinción Giemsa y se estudian al microscopio para observar la colonización por *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica. Se retira una segunda sección longitudinal de tejido gástrico, se pesa y se homogeneiza en 1 ml de caldo de cultivo de *Brucella*. El homogeneizado se diluye en disolución salina tamponada con fosfato y una parte alícuota se cultiva en placa, por duplicado, en un medio selectivo (por ejemplo, agar sangre suplementado con sangre de oveja desfibrinada al 5%, vancomicina 100 µg/ml, polimixina B 3,3 µg/ml, bacitracina 200 g/ml, ácido nalidíxico 10,7 µg/ml, y anfotericina B 50 µg/ml (véase J.I. Keena *et al.*, 2004, "The effect of *Helicobacter pylori* infection and dietary iron deficiency on host iron homeostasis: A study in mice", *Helicobacter*, 9(6):643-650). El crecimiento de *Helicobacter pylori* se confirma basándose en la tinción Gram, la morfología y la producción de ureasa. Se determina el número de unidades formadoras de colonias (CFU) por gramo de tejido y se compara entre los grupos.

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Un compuesto de galio seleccionado de un grupo que consiste en nitrato de galio, maltolato de galio, citrato de galio, fosfato de galio, cloruro de galio, fluoruro de galio, carbonato de galio, formiato de galio, acetato de galio, sulfato de galio, tartrato de galio, oxalato de galio y óxido de galio, para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa provocada por un microorganismo extracelular, tras la administración por vía sistémica de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de galio a un sujeto que lo necesita, en el que dicho microorganismo extracelular excluye a *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella spp.*
- 2.- El compuesto de la reivindicación 1, en el que el microorganismo extracelular es una especie de un género seleccionado del grupo que consiste en los géneros bacterianos *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Francisella*, *Pasteurella*, *Brucella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Tropheryma*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Capnocytophaga*, *Erysipelothrix*, *Listeria*, y *Yersinia*, y el género fúngico *Candida*.
- 3.- El compuesto de la reivindicación 2, en el que dicha especie se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Helicobacter pylori*, y *Campylobacter jejuni*.
- 4.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho microorganismo extracelular es una cepa que es resistente al menos a un antibiótico.
- 5.- El compuesto de la reivindicación 4, en el que dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), enterococos resistentes a vancomicina (VRE), *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhi* resistente a fluoroquinolona, *Klebsiella pneumoniae* resistente a ceftazidima, y *Neisseria gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolona.
- 6.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho compuesto de galio se administra por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, o mediante supositorios.
- 7.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la coadministración por vía sistémica de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de al menos otro agente antimicrobiano.
- 8.- Una combinación que comprende un compuesto de galio según la reivindicación 5 y al menos otro agente antimicrobiano para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa provocada por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), tras la coadministración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de cantidades profiláctica o terapéuticamente eficaces, de modo individual o colectivo, de dicho compuesto de galio y dicho al menos otro agente antimicrobiano.
- 9.- La combinación de la reivindicación 8, en la que dicho otro agente antimicrobiano es vancomicina y/o linezolid.
- 10.- Una combinación que comprende un compuesto de galio según la reivindicación 5 y al menos otro agente antimicrobiano para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa provocada por enterococos resistentes a vancomicina (VRE), tras la coadministración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de cantidades profiláctica o terapéuticamente eficaces, de modo individual o colectivo, de dicho compuesto de galio y dicho al menos otro agente antimicrobiano.
- 11.- La combinación de la reivindicación 10, en la que dicho agente antimicrobiano es linezolid.
- 12.- Un compuesto de galio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para prevenir o tratar la úlcera péptica, la gastritis, o la duodenitis provocada por *Helicobacter pylori*, tras la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de galio.
- 13.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12, o como parte de una combinación de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que dicho compuesto de galio se administra por vía oral.
- 14.- Una combinación que comprende un compuesto de galio según la reivindicación 12 y al menos otro agente antimicrobiano, para prevenir o tratar la úlcera péptica, la gastritis, o la duodenitis provocada por *Helicobacter pylori*, tras la coadministración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de galio y dicho al menos otro agente antimicrobiano.
- 15.- La combinación de la reivindicación 14, en la que dicho otro agente antimicrobiano es uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en claritromicina, amoxicilina, metronidazol, omeprazol y subsalicilato de bismuto.
- 16.- Un kit que comprende uno o más recipientes que contienen un compuesto de galio seleccionado de un grupo que consiste en nitrato de galio, maltolato de galio, citrato de galio, fosfato de galio, cloruro de galio, fluoruro de galio, carbonato de galio, formiato de galio, acetato de galio, sulfato de galio, tartrato de galio, oxalato de galio y

óxido de galio, y al menos otro agente antimicrobiano.

5 17.- El uso de un compuesto de galio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y 12 a 13, para la preparación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad infecciosa provocada por un microorganismo extracelular que comprende la administración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de galio, en el que dicho microorganismo extracelular excluye a *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella spp.*

10 18.- El uso de un compuesto de galio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 13, y opcionalmente de al menos otro agente antimicrobiano, o de una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa provocada por *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) o enterococos resistentes a vancomicina (VRE), tras la coadministración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de cantidades profiláctica o terapéuticamente eficaces, de modo individual o colectivo, de dicho compuesto de galio y dicho al menos otro agente antimicrobiano.

15 19.- El uso de un compuesto de galio según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12 a 13, y opcionalmente de dicho al menos otro agente antimicrobiano, o de una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, para la preparación de un medicamento para prevenir o tratar la úlcera péptica, la gastritis, o la duodenitis provocada por *Helicobacter pylori*, tras la coadministración por vía sistémica a un sujeto que lo necesita de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de dicho compuesto de galio y, opcionalmente, dicho al menos otro agente antimicrobiano.