

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 614**

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 38/14 (2006.01)

A61K 31/351 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2006 E 06813251 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1940437**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de tratamiento de bacterias**

30 Prioridad:

28.07.2005 US 703010 P

11.10.2005 US 725193 P

03.03.2006 US 779034 P

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

03.01.2014

73 Titular/es:

BIOSYNEXUS INCORPORATED (100.0%)

9298 GAITHER ROAD

GAITHERSBURG, MD 20877, US

72 Inventor/es:

WALSH, SCOTT MICHAEL;

PITTAWAY, MARY CATHERINE y

MOND, JAMES J.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 436 614 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

Composiciones y procedimientos de tratamiento de bacterias

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la bacteriología. La presente invención se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica tópica que comprende una cantidad eficaz de nisina y mupirocina para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de infecciones causadas por una bacteria grampositiva no resistente a mupirocina.

Antecedentes de la invención

10 Dado que el uso de antibióticos convencionales ha aumentado por fines médicos, veterinarios y agrícolas han aparecido simultáneamente cepas de bacterias patógenas resistentes a antibióticos.

15 La aparición de bacterias resistentes a uno o a más fármacos puede ser el resultado de una movilización génica que responda a las presiones selectivas asociadas con el uso de antibióticos. Durante las últimas décadas, el cada vez más frecuente uso de antibióticos ha actuado junto con las mutaciones espontáneas surgidas en el grupo de genes bacterianos para producir diferentes cepas de bacterias no susceptibles a los actuales tratamientos antibacterianos. Este repertorio de genes resistentes a antibióticos se puede usar con cepas previamente sensibles que tienen acceso a estos genes (p. ej., mediante transferencia por conjugación de plásmidos o transposones). Como resultado, en una gran variedad de plásmidos bacterianos y de transposones conjugativos habitualmente se encuentran genes de resistencias a uno o más fármacos.

20 Las bacterias grampositivas son una causa principal de infecciones nosocomiales. Los aislados patogénicos más frecuentes en hospitales incluyen *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, estafilococos negativos para la coagulasa y *Streptococcus pneumoniae* (véase, p.ej., Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th ed. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, ed. Churchill Livingstone, New York 1995), de las que muchas cepas son resistentes a uno o más antibióticos. *Enterococcus spp.* Forman parte de la flora normal del intestino de los seres humanos. De las más de diecisiete especies de enterococos, solo *E. faecalis* y *E. faecium* colonizan habitualmente e infectan a los seres humanos en un número detectable (*E. faecalis* se aísla de aproximadamente 80% de infecciones humanas y *E. faecium* de la mayoría del resto).

25 Los enterococos resistentes a vancomicina (VRE) son cada vez más frecuentes en los contextos hospitalarios. En la primera mitad de 1999, 25.9% de aislados enterococos de Unidades de Cuidados Intensivos eran resistentes a vancomicina, un incremento con respecto al 16,6,% en 1996 y con respecto al 0,4% en 1989. Los VRE también son habitualmente resistentes a muchos otros antibióticos comerciales, incluidos beta-lactámidos y aminoglucósidos. Por tanto, los pacientes inmunocomprometidos y aquéllos con una estancia prolongada en el hospital presentan un mayor riesgo de adquirir una infección por VRE.

30 El problema de la resistencia a los antibióticos no es única de *Enterococcus spp.* Se han aislado cepas de muchas otras bacterias grampositivas potencialmente patogénicas que exhiben resistencia a antibióticos, incluyendo *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA), *Staphylococcus aureus* con susceptibilidad intermedia a glicopéptidos (GISA), MRSA resistente a vancomicina (VR-MRSA) y *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina (PRSP). Como el VRE, las opciones terapéuticas para tratar infecciones producidas por estos organismos son limitadas.

35 La transferencia de resistencias es otro factor que complica la gestión de las infecciones resistentes a antibióticos. La resistencia a vancomicina se puede transferir de VRE a otras bacterias grampositivas, incluyendo a *S. aureus*, *in vitro*. Por tanto, la presencia de bacterias resistentes (p.ej., VRE) en un hospital no plantea solo el riesgo de infección sino también la evolución continua de organismos resistentes (p. ej., creando organismos más virulentos como el VR-MRSA).

40 Existe la necesidad de desarrollar estrategias alternativas de tratamiento antibacteriano. Por ejemplo, existe la necesidad de nuevas composiciones y procedimientos de tratamiento o prevención de infecciones bacterianas (p. ej., bacteriemia) causadas por cepas de bacterias no susceptibles a las formas actuales de tratamientos antibacterianos (p. ej., bacterias grampositivas tales como MRSA y VRE).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al campo de la bacteriología.

50 La presente invención se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica tópica que comprende una cantidad eficaz de nisina y mupirocina para su uso en un procedimiento para el tratamiento o prevención de infecciones causadas por una bacteria grampositiva no resistente a mupirocina.

Las realizaciones preferidas de la invención se definen en las reivindicaciones 2-14. El segundo agente antiinfeccioso es la mupirocina. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción concreto, se contempla que una composición que comprende un péptido antiinfeccioso es capaz de generar poros en bacterias de modo que se potencia la entrada de compuestos (p. ej., antibióticos de molécula pequeña o antibióticos del metabolismo) en las bacterias. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, se contempla que las composiciones de la presente invención pueden estimular (p. ej., cuando están en contacto con la piel) una respuesta de defensa del huésped (p. ej., una respuesta inmunitaria innata), de modo que disminuye la probabilidad de infección bacteriana o reduciéndola.

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica tópica para uso como se define en la reivindicación 1, que comprende un lantibiótico y mupirocina. El lantibiótico es nisina. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una crema. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una pulverización. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es un gel u otro tipo de formulación útil para administrar nisina y mupirocina. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polietilenglicol. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica se prepara para liberación controlada en el tiempo.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de alterar el crecimiento de bacterias que comprende administrar a las bacterias a una composición que comprende un lantibiótico y mupirocina. Alterar el crecimiento de las bacterias comprende matar las bacterias. Alterar el crecimiento de las bacterias comprende inhibir el crecimiento de las bacterias. Alterar el crecimiento de las bacterias comprende una reducción de 3 log o mayor de la presencia de células bacterianas. El lantibiótico puede ser nisina. Las bacterias pueden ser bacterias patógenas. Las bacterias pueden ser del género *Staphylococci*. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus aureus*. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus epidermidis*. Los *Staphylococci* pueden ser resistentes a antibióticos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* es resistente a meticilina o resistente a vancomicina. La composición es una formulación farmacéutica tópica.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratar o prevenir la infección, que comprende exponer una superficie de un sujeto a una formulación tópica que comprende un lantibiótico y mupirocina. La exposición de una superficie de un sujeto a una formulación farmacéutica tópica que comprende un lantibiótico y mupirocina puede tratar o prevenir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* sobre la superficie del sujeto. La presente invención no está limitada por el tipo de superficie tratada con la composición para uso como se ha definido en la reivindicación 1. De hecho, se pueden tratar varias superficies, incluidas, entre otras, superficies de la piel (p. ej., la epidermis o las capas subepidérmicas), heridas y cortes (p. ej., heridas superficiales heridas de espesor parcial y cortes profundos), superficies de la mucosa, etc.). La presente invención no está limitada por el tipo de sujeto tratado. De hecho, se puede tratar a varios sujetos, incluidos, entre otros, seres humanos, mamíferos grandes y pequeños, roedores, peces etc. En algunas realizaciones, la formulación tópica comprende una crema. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una reducción de 3 log o mayor de las bacterias responsables de la infección. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado una falta de bacterias responsables de la infección. En algunas realizaciones, la reducción se produce en un plazo de tres días desde el tratamiento. En algunas realizaciones, la reducción se produce en un plazo de dos días desde el tratamiento. El antibiótico es nisina.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la eficacia de nisina sola, mupirocina sola y la combinación de nisina y mupirocina sobre la infección por *S. aureus* en piel de ratón erosionada.

La Figura 2 muestra la eficacia de nisina, lisostafina y bacitracina solas y en combinación sobre la infección por *S. aureus* en piel de ratón erosionada, usando dos formulaciones diferentes de bacitracina.

La Figura 3 muestra la eficacia de nisina sola, mupirocina sola y la combinación de nisina y mupirocina sobre la infección por *S. aureus* resistente a mupirocina en piel de ratón erosionada.

La Figura 4 muestra la eficacia de nisina y mupirocina en combinación con EDTA sobre la infección por *P. aeruginosa* en piel de ratón erosionada.

La Figura 5 representa el diseño experimental del uso de composiciones y procedimientos de la presente infección para tratar heridas de espesor parcial.

La Figura 6 muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en heridas inoculadas dos días después del tratamiento con varios agentes.

La Figura 7 muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en heridas inoculadas cinco días después del tratamiento con varios agentes.

La Figura 8 muestra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en heridas inoculadas siete días después del tratamiento con varios agentes.

La Figura 9 muestra un compuesto del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en heridas inoculadas dos, cinco y siete días después del tratamiento con varios agentes.

La Figura 10 muestra el log medio (UFC/ml) de bacterias recuperadas después de un primero o un segundo tratamiento (MSSA) o después de uno y tres días (MRSA) de tratamiento con los reactivos indicados.

La Figura 11 muestra la concentración mínima inhibidora (CMI) de tratamiento de *S. aureus in vitro* con nisina sola o nisina combinada con mupirocina, neomicina o gentamicina.

La Figura 12 muestra que la mupirocina no es sinérgica ni proporciona un beneficio aditivo con bacitracina en el tratamiento de la infección de la piel.

La Figura 13 muestra que la nisina y la mupirocina funcionan de forma sinérgica en el tratamiento de *S. aureus* en un modelo de infección de sutura en ratón.

5 La Figura 14 muestra datos que representan el log de las unidades formadoras de colonias/ml determinadas en heridas cultivadas 2, 5 y 7 días después del tratamiento.

Definiciones

10 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un individuo (p. ej., ser humano, animal u otro organismo) a tratar mediante las composiciones de la presente invención. Los sujetos incluyen, entre otros, mamíferos (p. ej., murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares) y, más preferentemente, incluye seres humanos. En el contexto de la invención, el término "sujeto" generalmente se refiere a un individuo que recibirá o que ha recibido tratamiento para una afección caracterizada por la presencia de bacterias (p. ej., bacterias patógenas tales como MRSA) o en previsión de una posible exposición a bacterias. Como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de forma intercambiable, a menos que se indique lo contrario.

15 El término "diagnosticado", como se usa en el presente documento, se refiere al reconocimiento de una enfermedad (p. ej., causada por la presencia de bacterias patógenas) por sus signos y síntomas (p. ej., resistencia a terapias convencionales) o análisis genético, análisis patológico, análisis histológico y similares.

20 Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente artificial. Los ambientes *in vitro* incluyen, entre otros, tubos de ensayo y cultivos celulares. El término "*in vivo*" se refiere al ambiente natural (p. ej., un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente natural.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "atenuan" y "atenuación" usados en referencia a una característica (p. ej., crecimiento) de una células bacteriana o una población de células bacterianas hace referencia a una reducción, inhibición o eliminación de dicha característica, o una reducción del o los efectos de dicha característica.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición (p. ej., una composición que comprende mupirocina y nisina) suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados (p. ej., muerte de células bacterianas). Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que esté limitada a una formulación o vía de administración concreta.

35 Como se usa en el presente documento, el término "administración" se refieren a la acción de administrar un fármaco, profármaco u otro agente o tratamiento terapéutico (p. ej., una composición de la presente invención) a un sistema fisiológico (p. ej., un sujeto o células, tejidos y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Ejemplos de vías de administración al cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa (p. ej., oral, mucosa o bucal), rectal, ótica, mediante inyección (p. ej., por vía intravenosa, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal etc.) y similares.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "tratar una superficie" se refiere a la acción de exponer una superficie a una o más composiciones de la presente invención. Procedimientos de tratar una superficie incluyen, entre otros, pulverizar, aplicar neblina, sumergir y recubrir. Las superficies incluyen superficies orgánicas (p. ej., productos alimenticios, superficies de animales etc.) y superficies inorgánicas (p. ej., dispositivos médicos, encimeras, ropas, etc.).

45 Como se usa en el presente documento, el término "coadministración" se refiere a la administración de al menos dos agentes o tratamientos a un sujeto. En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usadas pueden variar. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la dosificación adecuada para la coadministración. En algunas realizaciones, cuando los agentes o terapias se coadministran, los respectivos agentes o terapias se administran a dosis menores que las adecuadas para su administración en monoterapia. Por tanto, la coadministración es especialmente deseable en realizaciones en las que la coadministración de los agentes o terapias reduce la dosis necesaria de uno o más agentes potencialmente dañinos (p. ej., tóxicos)

50 Como se usa en el presente documento, el término "tóxico" se refiere a cualquier efecto perjudicial o dañino en un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración del tóxico.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo (p. ej., composición que comprende mupirocina y nisina) con un vehículo, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Las expresiones “farmacéuticamente aceptable” o “o farmacológicamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas (por ejemplo reacciones tóxicas, alérgicas o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto).

5 Como se usa en el presente documento, “tópicamente” se refiere a la aplicación de las composiciones de la presente invención a la superficie de la piel o células y tejidos mucosos (p. ej., mucosa alveolar, bucal, lingual, masticatoria o nasal, y otros tejidos y células que recubren los órganos huecos o cavidades corporales).

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquier vehículo farmacéutico estándar, incluidos, entre otros, solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones (p. ej., tal como emulsiones de aceite/agua o de agua/aceite) y varios tipos de agentes humectantes, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, laurilsulfato sódico, agentes de retraso de la absorción e isotónicos, disgregantes (p. ej., almidón de patata o glicolato de almidón sódico) y similares. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. En la técnica se describen ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes (véase, por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975)).

15 Como se usa en el presente documento, la expresión “dispositivos médicos” incluye cualquier material o dispositivo que se usa sobre, en o a través del cuerpo de un sujeto o paciente, por ejemplo, durante el tratamiento médico (p. ej., para una enfermedad o lesión). Dispositivos médicos incluyen, entre otros, elementos tales como implantes médicos, dispositivos para cuidados de heridas, dispositivos para liberación de fármacos y dispositivos de protección personal y de cavidades corporales. Implantes médicos incluyen, entre otros, catéteres urinarios, catéteres
20 intravasculares, derivaciones de diálisis, tubos de drenaje para heridas, suturas cutáneas, injertos vasculares, mallas implantables, dispositivos intraoculares, válvulas cardíacas y similares. Dispositivos para cuidados de heridas incluyen, entre otros, vendajes para heridas generales, materiales para injertos biológicos, cierres y vendajes y gasas quirúrgicas estériles. Dispositivos de liberación de fármacos incluyen, entre otros, agujas, parches cutáneos para liberación de fármacos, parches mucosos de liberación de fármacos y esponjas médicas. Dispositivos de
25 protección personal y cavidades orales incluyen, entre otros, tampones, esponjas, guantes quirúrgicos y de exploración y cepillas de dientes. Dispositivos de control de la natalidad incluyen, entre otros, dispositivos intrauterinos (DIU), diafragmas y preservativos.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “agente terapéutico” se refiere a una composición que disminuye la infectividad, la morbilidad o el inicio de la mortalidad en un sujeto que ha estado en contacto con un microorganismo patógeno o que previene la infectividad, la morbilidad o el inicio de la mortalidad en un huésped que ha estado en contacto con un microorganismo patógeno. Los agentes terapéuticos abarcan agentes usados profilácticamente (p. ej., en ausencia de un patógeno) en vista de posibles futuras exposiciones a un patógeno. Dichos agentes pueden comprender adicionalmente compuestos farmacéuticamente aceptables (p. ej., adyuvantes, excipientes, estabilizantes, diluyentes y similares). En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos de la presente
35 invención se administran en forma de composiciones tópicas, composiciones inyectables, composiciones ingeribles y similares. Cuando la vía es tópica, la forma puede ser, por ejemplo, una solución, crema, pomada, bálsamo o pulverizador.

40 Como se usa en el presente documento, el término “patógeno” se refiere a un agente biológico que produce un estado de enfermedad (p. ej., infección, sepsis etc.) en un huésped. “Patógenos” incluyen, entre otros, virus, bacterias, arqueobacterias, hongos, protozoos, micoplasma, priones y organismos parásitos.

45 Los términos “bacterias” y “bacteria” se refieren a todos los organismos procariotas, incluyendo aquéllos de los filos del reino *Prokaryotae*. Se pretende que el término abarque todos los microorganismos considerados bacterias, incluyendo *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Actinomyces*, *Streptomyces* y *Rickettsia*. Dentro de esta definición están incluidas todas las formas de bacterias, incluyendo cocos, bacilos, espiroquetas, esferoplastos, protoplastos etc.
50 También se incluyen dentro de este término los organismos procariotas que son gramnegativos o grampositivos. “Gramnegativo” y “grampositivo” se refiere a patrones de tinción con el procedimiento de tinción de Gram, que es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Finegold y Martin, Diagnostic Microbiology, 6th Ed., CV Mosby St. Louis, pp. 13-15 (1982)). Las “bacterias grampositivas” son bacterias que conservan el pigmento primario usado en la tinción de Gram, haciendo que las células teñidas aparezcan generalmente de color azul oscuro o púrpura al microscopio. Las “bacterias gramnegativas” no conservan el pigmento primario usado en la tinción de Gram, sino que se tiñen con la contratinción. Por tanto, las bacterias gramnegativas generalmente aparecen en rojo. En algunas realizaciones, las bacterias están en cultivo continuo. En algunas realizaciones, las bacterias no están cultivadas y existen en su ambiente natural (p. ej., en el lugar de una herida o infección) o se obtienen en tejidos de pacientes (p. ej., mediante una biopsia). Las bacterias pueden exhibir un crecimiento patológico o proliferación. Ejemplos de
55 bacterias incluyen, entre otras, células bacterias de un género de bacterias seleccionadas del grupo constituido por *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Ewiragella*, *Kluyvera*, *Morganella*, *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Rickettsia*, *Coxiella*, *Rochalimaea*, *Ehrlichia*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium*, *Actinomyces*, *Rhodococcus*, *Listeria*, *Erysipelothrix*,
60 *Gardnerella*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Wolinella*, *Helicobacter*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*,

Agrobacterium, Alcaligenes, Chryseomonas, Comamonas, Eikenella, Flavimonas, Flavobacterium, Moraxella, Oligella, Pseudomonas, Shewanella, Weeksella, Xanthomonas, Bordetella, Franciesella, Brucella, Legionella, Afipia, Bartonella, Calymmatobacterium, Cardiobacterium, Streptobacillus, Spirillum, Peptostreptococcus, Peptococcus, Sarcinia, Coprococcus, Ruminococcus, Propionibacterium, Mobiluncus, Bifidobacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Rothia, Clostridium, Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Bilophila, Leptotrichia, Wolinella, Acidaminococcus, Megasphaera, Veillonella, Norcardia, Actinomadura, Norcardiopsis, Streptomyces, Micropolysporas, Thermoactinomyces, Mycobacterium, Treponema, Borrelia, Leptospira y Chlamydiae.

Como se usa en el presente documento, el término “microorganismo” se refiere a cualquier especie o tipo de microorganismo, incluyendo, entre otros, bacterias, arqueobacterias, hongos, protozoos, micoplasma y organismos parásitos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “animales no humanos” se refiere a todos animales no humanos, incluyendo, entre otros, vertebrados tales como roedores, primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves etc.

Como se usa en el presente documento, el término “kit” se refiere a cualquier sistema de liberación para liberar materiales. En el contexto de los materiales de reacción (p. ej., composiciones que comprende mupirocina y nisina), dichos sistemas de liberación incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o liberación de reactivos de reacción y/o materiales de soporte (p. ej., instrucciones escritas para su uso los materiales etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kit incluyen uno o más envases (p. ej., cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Como se usa en el presente documento, la expresión “kit fragmentado” se refiere a sistemas de liberación que comprenden dos o más contenedores separados, cada uno de los cuales contiene una subporción de todos los componentes del kit. Los contenedores se pueden liberar en el recipiente previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer contenedor puede contener una composición que comprende mupirocina y nisina para un uso concreto, mientras que un segundo contenedor contiene un segundo agente (p. ej., un antibiótico o aplicador pulverizador). De hecho, cualquier sistema de liberación que comprende dos o más contenedores separados, cada uno de los cuales contiene una subporción de todos los componentes del kit, está incluido en la expresión “kit fragmentado”. En contraste con esto, un “kit combinado” se refiere a un sistema de liberación que contiene todos los componentes de materiales de reacción para un uso concreto en un único contenedor (p. ej., en una sola caja cada uno de los componentes deseados). El término “kit” incluye los kits tanto fragmentados como combinados.

Descripción detallada de la invención

Los esfafilococos son patógenos bacterianos grampositivos que producen una amplia variedad de enfermedades que varían desde abscesos superficiales (p. ej., diviesos, orzuelos, forúnculos y otros abscesos localizados) a infecciones más profundas (p. ej., osteomielitis, neumonía, endocarditis, infecciones de tracto urinario, artritis séptica, meningitis, infecciones en heridas quirúrgicas, septicemia e intoxicación alimentaria). *S. aureus* es una causa principal de infección de heridas quirúrgicas adquirida en el hospital (nosocomial) y *S. epidermidis* produce infecciones asociadas con dispositivos médicos permanentes. (Véase, p. ej., Silverstein y col., 1990; Patti y col., 1994; Dann et al., 1994.)

La resistencia a múltiples antibióticos es cada vez más frecuente en *S. aureus* y *S. epidermidis*. Las cepas hospitalarias de *Staphylococcus* suelen ser resistentes a muchos antibióticos diferentes. Los aislados nosocomiales de *S. epidermidis* también suelen ser resistentes a varios antibióticos, incluida la meticilina. Además, *S. aureus* expresa resistencia a antisépticos y desinfectantes, tales como compuestos de amonio cuaternarios, que pueden ayudar a su supervivencia en el ambiente hospitalario.

Para las infecciones hospitalarias graves con *S. aureus* resistentes a múltiples fármacos, la vancomicina ha sido el único antibiótico eficaz. La resistencia a la vancomicina la portan los plásmidos conjugativos que se pueden transferir a *S. aureus* en un contexto de laboratorio (Noble et al., 1992) y ha aparecido de forma natural en enterococos (véase, p. ej., Arthur y col., 1993). No obstante, se ha notificado aparición de *S. aureus* resistente a vancomicina (véase, por ejemplo, Lowry, 1998; Mathews y col., J Acquir Immune Defic Syndr. 2005 Oct 1;40(2):155-160) en EE.UU. y fuera de EE.UU.. Se han desarrollado vacunas dirigidas al organismo o a las exotoxinas que produce, pero estos abordajes han tenido poco éxito (véase, por ejemplo, Mamo et al., 1994), lo que subraya la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos para controlar las infecciones por estafilococos.

De un modo similar a otras bacterias grampositivas, *S. aureus* produce la enfermedad principalmente a través de la producción de factores de virulencia, tales como hemolisinas, enterotoxinas y toxina del shock tóxico, que facilitan la supervivencia, multiplicación y propagación del organismo en tejidos infectados (véase, por ejemplo, Mekalanos, 1992). La síntesis de la mayoría de los factores de virulencia en *S. aureus* está controlada por el locus del regulón global accesorio (agr.), que se activa mediante péptidos autoinductores secretados (AIP) (véase, por ejemplo, Novick et al., 1993; Novick et al., 1995).

La presencia de agr y la regulación de la virulencia mediante RNAII se ha demostrado en todas las cepas de *S. aureus* analizadas hasta la fecha, así como en otras especies de estafilococos, incluyendo *S. epidermidis*, *S.*

lugdunesis, *S. hemolyticus* (véase, por ejemplo, Vandenesch y col., 1993), y *S. warneri* (véase, por ejemplo, Tegmark y col., 1998).

5 La infección por *S. aureus* sigue siendo una de las infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad más frecuentes. Con la continua aparición de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a glicopéptidos y el aislamiento de la cepa clínica de *S. aureus* completamente resistentes a vancomicina, *S. aureus* se está convirtiendo en un problema para la salud todavía más difícil de abordar, en particular en contextos tales como hospitales y residencias.

10 En la actualidad, BACTROBAN (pomada de 2% de mupirocina, SmithKline Beecham, Bristol, TN) es el agente antibacteriano más prescrito y eficaz para el tratamiento de infecciones cutáneas producidas por *S. aureus*. La mupirocina es un agente antibacteriano producida mediante fermentación usando el organismo *Pseudomonas fluorescens*. Es un agente activo contra un amplio abanico de bacterias grampositivas, incluyendo la mayoría de las cepas de *S. aureus*, incluidos *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), la mayoría de las cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *Streptococcus*. La mupirocina inhibe la síntesis proteica bacteriana uniéndose de forma reversible y específicamente a la ARN sintetasa de transferencia de isoleucilo bacteriana. Debido a este único modo de acción, la mupirocina no muestra resistencia cruzada *in vitro* con otras clases de agentes antimicrobianos. Aunque BACTROBAN (2% de mupirocina) es un tratamiento habitual, se están usando o desarrollando diversos compuestos similares a la mupirocina (p. ej., derivados y funcionales equivalentes) y se conocen en la técnica.

15 Desafortunadamente, como con muchos antimicrobianos, está apareciendo resistencia a mupirocina en *S. aureus* y en estafilococos negativos a la coagulasa. Además, este antibiótico no elimina de forma rutinaria todos los organismos infecciosos en todos los pacientes.

20 La nisina es una sustancia antimicrobiana producida por *Lactococcus lactis* perteneciente al grupo serológico de Lancefield. Es un miembro de un grupo de sustancias similares denominadas lantibióticos, que incluyen, entre otros, subtilina, epidermina, galidermina, pep 5, cinamicina, duramicina y ancovenina. La nisina es un péptido compuesto por 34 residuos de aminoácidos y contiene cinco estructuras anulares reticuladas mediante puentes de tioéter que forman lantionina o β -metilantionina. Las formulaciones de nisina se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.135.910, y 5.753.614. Variantes de la nisina se describen en la patente de EE.UU. N° 6.448.034. Lantibióticos adicionales similares a nisina se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.594.103 y 5.928.146.

25 La nisina tiene actividad de amplio espectro contra bacterias grampositivas y algo de actividad contra bacterias gramnegativas. La nisina se ha usado como conservante alimentario antimicrobiano y generalmente se acepta como seguro. Blackburn y col., (véase la patente de EE.UU. N° 5.866.539) generalmente describen el uso de la nisina junto con agentes antibacterianos para tratar infecciones cutáneas.

30 A pesar de los impresionantes éxitos en el control o eliminación de infecciones bacterianas con antibióticos, el uso extendido de antibióticos en medicina humana y como suplemento alimentario en la producción de aves y ganado ha conducido a resistencias farmacológicas en muchas bacterias patogénicas. La aparición de cepas de *Staphylococci* panresistentes (p. ej., cepas que no son susceptibles a las formas actuales de tratamiento antibacteriano) hace de la necesidad de controlar la infección por estafilococos un importante problema médico. Por tanto, es deseable proporcionar nuevas composiciones y procedimientos de tratamiento que muestran eficacia en la reducción de la incidencia y gravedad de la infección por estafilococos. Específicamente, existe la necesidad de nuevos tratamientos para cepas de bacterias resistentes, en particular cepas de *S. aureus* que son resistentes a mupirocina y a otros antibióticos. También existe la necesidad de antiinfecciosos que tienen un mayor rango de actividad contra bacterias gramnegativas y de antiinfecciosos más eficaces. Adicionalmente, sería beneficioso que los pacientes toleraran estos tratamientos con pocos o ningún efecto secundario.

35 De acuerdo con lo mencionado, la presente invención proporciona composiciones para su uso como se define en las reivindicaciones. El segundo agente antiinfeccioso es mupirocina. Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a ningún mecanismo de acción concreto, se contempla que una composición que comprende un péptido antiinfeccioso es capaz de generar poros en bacterias de modo que se potencia la entrada de compuestos (p. ej., antibióticos de molécula pequeña o antibióticos del metabolismo) en las bacterias.

40 Aunque no es necesario comprender el mecanismo para practicar la presente invención y la presente invención no está limitada a un mecanismo de acción concreto, se contempla que las composiciones de la presente invención pueden estimular (p. ej., cuando están en contacto con la piel) una respuesta de defensa del huésped (p. ej., una respuesta inmunitaria innata), de modo que disminuye la probabilidad de infección bacteriana o reduciéndola.

45 La presente invención proporciona una composición que comprende nisina y mupirocina para su uso como se define en las reivindicaciones. Dicha composición que comprende nisina y mupirocina se puede administrar a un sujeto en condiciones tales que matan las bacterias (p. ej., bacterias patogénicas). La composición que comprende nisina y mupirocina se puede administrar a un sujeto en condiciones tales que se prohíbe y/o atenúa el crecimiento de las bacterias (p. ej., bacterias patogénicas). Puede matar a más del 90% (p. ej., más del 95%, 98%, 99%, todos detectables) de las bacterias. Puede haber una reducción superior a 2 log (p. ej., superior a 3 log, 4 log, 5 log o más) en bacterias. En algunas realizaciones, la reducción se observa en dos días o menos tras el tratamiento inicial (p. ej.,

menos de 24 horas, menos de 20 horas, 18 horas o menos). En algunas realizaciones, la reducción se observa en tres días o menos, cuatro días o menos o cinco días o menos.

5 La presente invención demuestra que una composición que comprende el lantibiótico nisina y mupirocina es más eficaz (p. ej., en algunas realizaciones proporciona un efecto aditivo y, en otras realizaciones, proporciona un efecto sinérgico) en el tratamiento de infecciones cutáneas (p. ej., matar bacterias o prohibir crecimientos bacterianos (p. ej., de infecciones de piel subcutáneas o infecciones de heridas profundas)) cuando se compara con cualquier agente por separado (véase el Ejemplo 1). La eficacia específica de una composición que comprende el lantibiótico nisina y mupirocina comparada con la del lantibiótico nisina más otro tipo de agente antibacteriano se observó durante el desarrollo de la presente invención. Por ejemplo, cuando se combinó nisina con otros dos
10 agentes antibacterianos por separado (lisostafina y bacitracina) no se observó ningún efecto aditivo o sinérgico. Por tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende mupirocina y el lantibiótico nisina.

15 Una composición que comprende mupirocina y el lantibiótico nisina de la presente invención se puede administrar (p. ej., a un sujeto (p. ej., a la piel u otra superficie de un sujeto) o a bacterias (p. ej., bacterias patógenas (p. ej., que residen sobre o dentro de la piel de un sujeto))) como agente terapéutico o como profiláctico para prevenir la infección bacteriana. Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento de alterar el crecimiento de bacterias (p. ej., de bacterias patógenas) que comprende administrar a las bacterias una composición que comprende un lantibiótico (p. ej., nisina) y mupirocina. La administración a las bacterias de una composición que comprende un lantibiótico (p. ej., nisina) y mupirocina puede matar a las bacterias. La administración a las bacterias de una composición que comprende un lantibiótico (p. ej., nisina) y mupirocina puede inhibir el crecimiento de las
20 bacterias. Se contempla que una composición que comprende mupirocina y un lantibiótico (p. ej., nisina) se puede administrar (p. ej., a un sujeto o bacteria) mediante una serie de vías y/o mecanismos de liberación.

25 Por ejemplo, las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones se pueden administrar (p. ej., a un sujeto (p. ej., a una quemadura en la piel o superficie de herida)) mediante varios procedimientos, incluyendo, entre otros, suspender en una solución (p. ej., solución coloidal) y aplicar a una superficie (p. ej., una superficie que comprende bacterias (p. ej., bacterias patógenas) o susceptible a invasión bacteriana), suspender en una solución y pulverizar sobre una superficie usando un aplicador pulverizados; mezclar con adhesivo de fibrina y aplicar (p. ej., pulverizar) sobre una superficie (p. ej., quemadura o herida en la piel); impregnar sobre un vendaje o venda de heridas y aplicar la venda a una superficie (p. ej., una infección o herida); aplicar mediante un mecanismo de liberación controlada; impregnar en uno o ambos lados de una matriz biológica
30 acelular que se puede colocar después sobre una superficie (p. ej., heridas o quemaduras en la piel), protegiendo de este modo las interfaces de la herida y del injerto; aplicar como liposoma o aplicar en un polímero.

Aunque no es necesario comprender el mecanismo para poner en práctica la presente invención y aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción concreto, se contempla que una vez administradas (p. ej., a un sujeto o en un sitio que comprende bacterias (p. ej., bacterias patógenas (p. ej., MRSA))), las composiciones (p. ej., una composición farmacéutica tópica) que comprende mupirocina y nisina entran en contacto con bacterias (p. ej., bacterias patógenas), de modo que matan y/o previenen el crecimiento de las bacterias.
35

40 En algunas realizaciones, las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones encuentran aplicación en el tratamiento de superficies para la atenuación o inhibición del crecimiento de bacterias indeseadas (p. ej., patógenos). Por ejemplo, superficies que se pueden usar en tratamientos invasivos tales como cirugía, cateterización y similares, se pueden tratar para prevenir la infección de un sujeto con contaminantes bacterianos sobre la superficie. Se contempla que las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones se pueden usar para tratar numerosas superficies, objetos, materiales y similares (p. ej., equipamiento médico o de primeros auxilios, equipamiento y superficies de guarderías y de cocina) con el fin de controlar y/o prevenir la contaminación bacteriana sobre ellos.

45 Una composición de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones se puede impregnar en materiales de absorción tales como suturas, vendas y gasas, o recubrir sobre la superficie de materiales en fase sólida, tales como grapas quirúrgicas, cremalleras y catéteres para liberar las composiciones, en un sitio para la prevención de la infección microbiana. Otros sistemas de liberación de este tipo serán evidentes para los expertos en la técnica.

50 También se contemplan otros usos para una composición que comprende mupirocina y nisina de la invención para su uso como se define en las reivindicaciones. Estos incluyen diversas aplicaciones agrícolas, hortícolas, ambientales y de procesamiento de alimentos. Por ejemplo, en agricultura y horticultura, se puede apuntar a varias bacterias patógenas vegetales con el fin de minimizar la enfermedad en la planta. Un ejemplo de un patógeno vegetal adecuado para ser objetivo es *Erwinia amylovora*, el agente causal del fuego bacteriano.

55 Las composiciones de la invención se pueden formular para administrar por cualquier vía, tal como oral, tópica o parenteral. Las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas, cremas o preparaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones orales o parenterales estériles.

Las formulaciones tópicas de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones se pueden presentar como, por ejemplo, pomadas, cremas o lociones, espumas, pomadas oculares y gotas oculares u óticas, vendajes impregnados y aerosoles, y pueden contener aditivos convencionales incluidos, por ejemplo, conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, y emolientes en pomadas y cremas.

5 Las formulaciones tópicas también pueden incluir agentes que potencian la penetración de los ingredientes activos a través de la piel. Agentes de ejemplo incluyen una combinación binaria de N-(hidroxiethyl)pirrolidona y un compuesto de alteración de la cubierta celular, un éster de azúcar en combinación con un sulfóxido u óxido de fosfina, y monooleato de sacarosa, sulfóxido de decilmethyl y alcohol.

10 Otros materiales de ejemplo que aumentan la penetración en la piel incluyen tensioactivos o agentes humectantes, incluyendo, entre otros, monooleato de polioxietilensorbitano (polisorbato 80), monooleato de sorbitano (Spam 80), polímero de p-isooctilpolioxietileno-fenol (Triton WR-1330); trioleato de polioxietilensorbitano (Tween 85); sulfosuccinato de dioctilsodio y sarcosinato sódico (-1330); (Sarcosyl NL-97); y otros tensioactivos farmacéuticamente aceptables.

15 En ciertas realizaciones de la invención, las formulaciones para su uso como se define en las reivindicaciones pueden comprender además uno o más alcoholes, compuestos que contienen cinc, emolientes, humectantes, agentes espesantes y/o gelificantes, agentes neutralizantes y tensioactivos. El agua usada en las formulaciones es, preferentemente, agua desionizada que tiene un pH neutro. Aditivos adicionales en las formulaciones tópicas incluyen, entre otras, fluidos de silicona, pigmentos, fragancias, ajustadores del pH y vitaminas.

20 Las formulaciones tópicas pueden también contener transportadores convencionales compatibles, tales como bases de cremas o pomadas, y etanol o alcohol oleico para lociones. Dichos vehículos pueden estar presentes de aproximadamente 1% a aproximadamente 98% de la formulación. La base de la pomada puede comprender uno o más de vaselina, aceite mineral, ceresina, alcohol de lanolina, pantenol, glicerina, bisabolol, manteca de cacao y similares.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas para su uso como se define en las reivindicaciones se pueden formular y usar como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, entre otras, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final.

30 Las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones pueden contener adicionalmente, otros componentes adyuvantes encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas. Por tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles farmacéuticamente activos, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. No obstante, dichos materiales, cuando se añaden, preferentemente no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes adyuvantes, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales de influencia sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no interactúan de forma perjudicial con mupirocina y nisina de la formulación.

40 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso como se define en las reivindicaciones que contienen (a) una composición que comprende mupirocina y el lantibiótico nisina; y (b) uno o más agentes adicionales (p. ej., un antibiótico). Ejemplos de otros tipos de antibióticos incluyen, entre otros, almeclina, amdinocilina, amicacina, amoxicilina, amfomicina, amfotericin B, ampicilina, azacitidine, azaserine, azithromicina, azlocilina, aztreonam, bacampicilina, bacitracina, benzil penicilloil-polilisina, bleomicina, candidina, capreomicina, carbenicilina, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefazolina, cefdinir, cefepima, cefixima, cefinenoxima, cefinetazol, cefodizima, cefonicid, cefoperazona, ceforanida, cefotaxima, cefotetan, cefotiam, cefoxitina, cefpiramida, cefpodoxima, cefprozil, cefsulodina, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima, ceftriaxona, cefuroxima, cefacetril, cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cloranfenicol, clortetraciclina, cilastatina, cinnamicina, ciprofloxacina, claritbromicina, ácido clavulánico, clindamicina, clioquinol, cloxacilina, colistimetato, colistina, ciclacilina, cicloserina, ciclosporina, ciclo-(Leu-Pro), dactinomycin, dalbavancina, dalfopristina, daptomicina, daunorubicina, demeclociclina, detorubicina, dicloxacilina, dihidrostreptomycin, diritromicina, doxorubicina, doxiciclina, epirubicina, eritromicina, eveminomicina, floxacilina, fosfomicina, ácido fusídico, gemifloxacina, gentamicina, gramicidina, griseofulvina, hetacilina, idarubicina, imipenem, iseganan, ivermectina, kanamicina, laspartomicina, linezolid, lincomicina, loracarbef, magainina, meclociclina, meropenem, metaciclina, metilicina, mezlocilina, minociclina, mitomicina, moenomicina, moxalactam, moxifloxacina, ácido micofenólico, nafcilina, natamicina, neomicina, netilmicina, nifimicina, nitrofurantoina, novobiocina, oleandomicina, oritavancina, oxacilina, oxitetraciclina, paromomicina, penicilamina, penicilina G, penicilina V, feneticilina, piperacilina, plicamicina, polimixina B, pristinamicina, quinupristina, rifabutina, rifampina, rifamicina, rolitetraciclina, sisomicina, espectrinomicina, estreptomycin, estreptozocina, sulbafam, sultamicilina, tacrolimus, tazobactam, teicoplanina, telitromicina, tetraciclina, ticarcilina, tigeciclina, tobramicina, troleandomicina, tunicamicina, tirtricina, vancomicina, vidarabina,

viomicina, virginiamicina, BMS-284,756, L-749,345, ER-35,786, S-4661, L-786,392, MC-02479, Pep5, RP 59500 y TD-6424. En algunas realizaciones se pueden usar dos o más agentes combinados (p. ej., una composición que comprende mupirocina y nisina y otro antibiótico) juntos o de forma secuencial. En algunas realizaciones, otro antibiótico puede comprender bacteriocinas, lantibióticos de tipo A, lantibióticos de tipo B, liposidomicinas, mureidomicinas, alanoilcolinas, quinolinas, everminomicinas, glicilciclinas, carbapenems, cefalosporinas, estreptograminas, oxazolidodonas, tetraciclonas, ciclotialidinas, bioxalomicinas, péptidos catiónicos y/o protegrinas. En algunas realizaciones, la composición comprende lisostafina.

La presente invención también se refiere a procedimientos que implican la coadministración de compuestos que comprenden mupirocina y un lantibiótico (p. ej., nisina) con uno o más agentes activos adicionales (p. ej., antibiótico, antioxidante, etc.). De hecho, la presente invención se refiere a procedimientos para potenciar los tratamientos y/o composiciones de la técnica anterior coadministrando una composición que comprende mupirocina y nisina de la presente invención. En los procedimientos de coadministración, los agentes se pueden administrar de forma concurrente o secuencial. Los compuestos descritos en el presente documento se administran antes que el o los otros agentes activos. Las formulaciones farmacéuticas y modos de administración pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Además, los dos o más agentes coadministrados pueden administrarse, cada uno, usando diferentes modos o diferentes formulaciones.

Los agentes adicionales que se van a coadministrar, tales como otros antibióticos, pueden ser cualquiera de los agentes bien conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, los que actualmente están en uso clínico.

El tratamiento de las diversas enfermedades y trastornos descritas en el presente documento a menudo están limitados por los siguientes dos factores principales. (1) el desarrollo de resistencia al fármaco y (2) la toxicidad de agentes terapéuticos conocidos. Algunos agentes terapéuticos tienen efectos secundarios perjudiciales, incluyendo toxicidad inespecífica.

Los procedimientos descritos en el presente documento abordan ambos problemas. La resistencia a fármacos, cuando se requieren dosis crecientes para alcanzar el beneficio terapéutico, se supera coadministrando los compuestos que comprenden mupirocina y un lantibiótico (p. ej., nisina) descritos en el presente documento con o sin un agente conocido. Los compuestos descritos en el presente documento pueden sensibilizar las células diana frente a agentes conocidos (y al contrario), y, en consecuencia, se necesitan menos de estos agentes para alcanzar un beneficio terapéutico.

La función de sensibilización de las composiciones reivindicadas para su uso como se define en las reivindicaciones también aborda los problemas asociados con los efectos tóxicos de terapéuticas conocidas. En los casos en los que el agente conocido es tóxico, es deseable limitar las dosis administradas en todos los casos y, en particular, en los casos en los que la resistencia al fármaco ha aumentado la dosis necesaria. Por tanto, cuando los compuestos reivindicados se coadministran con el agente conocido, reducen la dosis requerida, lo que, a su vez, reduce los efectos perjudiciales. Además, dado que los propios compuestos reivindicados son tanto eficaces como no tóxicos a dosis moderadas, la coadministración de proporcionalmente más de estos compuestos que las terapéuticas tóxicas conocidas alcanzarán los efectos deseados al tiempo que se minimizan los efectos tóxicos.

En algunas realizaciones, las preparaciones farmacéuticas para su uso como se define en las reivindicaciones que comprenden mupirocina y nisina se formulan en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en el presente documento, hace referencia a una unidad físicamente pequeña de la preparación farmacéutica adecuada para el paciente sometido a tratamiento. Cada dosis deberá contener una cantidad de las composiciones que comprenden mupirocina y un lantibiótico (p. ej., nisina) calculada para producir el efecto antibacteriano (p. ej., matar a las bacterias o atenuar su crecimiento) antibacteriano en asociación con el vehículo farmacéutico seleccionado. Los expertos en la técnica conocen bien los procedimientos para determinar la unidad de dosificación adecuada.

Las unidades de dosificación pueden aumentarse o disminuirse de forma proporcionada en función del peso del paciente. Concentraciones adecuadas para alcanzar la erradicación de bacterias patógenas en una población celular o tejido diana se pueden determinar mediante cálculos de la curva concentración dosis, como se conoce en la técnica.

En algunas realizaciones, la composición para su uso como se define en las reivindicaciones comprende de 0,1 a 2000 µg/ml del lantibiótico nisina y de 0,1 a 2000 µg/ml de mupirocina (p. ej., 1 - 1000 µg/ml, 1 - 500 µg/ml, 5 - 200 µg/ml etc.). En algunas realizaciones, la composición es de 0,01 a 15% (p. ej., 0,1 - 10%, 0,5 - 5%, 1 - 3%, 2%) en peso del lantibiótico nisina y/o mupirocina. En algunas realizaciones, la cantidad de lantibiótico nisina y/o mupirocina liberado en un sujeto es de 0:1 a 1000 mg/kg/día (p. ej., 1 a 500 mg/kg/día, de 5 a 250 mg/kg/día, 10-100 mg/kg/día, etc.). En algunas realizaciones, la proporción entre la concentración del lantibiótico nisina y la concentración de mupirocina es 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1,5:1, 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, etc.

Se contempla que las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones encontrarán uso en varias situaciones, incluidos los contextos de investigación. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones también se usan en estudios del metabolismo

de la APP (p. ej., mediante análisis de proteínas y sustancias farmacéuticas capaces de alterar la resistencia a los antibióticos) y en estudios *in vivo* para observar la susceptibilidad de las células bacterianas a los tratamientos antibacterianos. Los usos de las composiciones proporcionadas por la presente invención abarcan sujetos humanos y no humanos, y muestras de dichos sujetos y también abarcan aplicaciones en investigación usando estos sujetos. Por tanto, no se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sujeto y/o situación de aplicación.

Las composiciones de la presente invención para su uso como se define en las reivindicaciones encuentran uso cuando se conoce la naturaleza de la infección presente o a evitar, así como cuando se desconoce la naturaleza de la infección. Por ejemplo, la presente invención contempla el uso de las composiciones de la presente invención en el tratamiento o prevención de infecciones asociadas con cualquier aplicación tópica que implica alimentos de la piel, incluyendo, entre otros, lesiones cutáneas, heridas, úlceras, escaras de decúbito, dermatitis del pañal, ampollas, acné, psoriasis y verrugas.

Parte experimental

Los ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. Ejemplos que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

Ejemplo 1

Las composiciones que comprenden mupirocina y nisina eliminan la infección en la piel de ratón

Materiales: La lisostafina se fabrica en Biosynexus, Inc. y la nisina (AMBICIN N) se obtuvo de AMBI, Inc. La mupirocina (pomada BACTROBAN), bacitracina (Sigma), y pomada de bacitracina (G&W Laboratories Inc) se obtuvieron todas comercialmente. Polietilenglicol (PEG) 400 y PEG 3350 se adquirieron en Spectrum Chemicals.

Modelo infecciones cutáneas en ratón: Un cultivo durante la noche de *S. aureus* cultivado en caldo de soja triptica (SA8; intervalo de 1 a 6 X 10⁹ UFC/ml) se centrifugó a 4.000 g x g durante 10 minutos y se resuspendió en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las bacterias se diluyeron hasta un porcentaje de transmitancia de 40 (Spectronic 20D+) y se diluyeron un 1:1.000 adicional en PBS para una concentración final de las bacterias de aproximadamente 3x10⁵. Ratonos SKH1 (hrhr) sin pelo (Charles River) se sedaron con 0,2 ml de ketamina (80 mg/kg) y se liberó xilazina (32 mg/kg) por vía intraperitoneal. La parte superior del dorso del ratón se frotó con un paño impregnado en alcohol al 70% y se dejó secar. Se realizaron erosiones finas sobre los dorsos de los ratones entre los hombros, usando un papel de lija de grano 150. Se frotaron las bacterias sobre el área erosionada con un aplicador estéril con punta de algodón hasta que se saturó el área con la solución.

Pomada tópica: A un batidor de vidrio de 250 ml se añadieron 74 g de PEG 400 y 24 g de PEG 3350 y se calentó hasta que todo el PEG 3350 se fundió. La solución se agitó bien y se dejó enriar hasta la temperatura ambiente, que tuvo como resultado una pomada suave y opaca. A la pomada se añadieron nisina y bacitracina en polvo en peso/peso y se agitó hasta que se mezclaron homogéneamente. Para las formulaciones que contenían mupirocina, se pesó 1 g de pomada Bactroban en un contenedor y se añadió nisina en polvo hasta 2%- 6% (peso/peso) y se mezclaron bien. Primero se disolvió la lisostafina hasta una concentración de aproximadamente 150 mg/ml en agua DI antes de mezclar en la pomada para dar una concentración final de 2% (peso/peso).

Tratamiento de piel infectada con pomada tópica: Los tratamientos dirigidos a erradicar infecciones cutáneas por *S. aureus* en el modelo de ratón se iniciaron por la mañana después de la infección (Día 1). Aproximadamente 0,1 g de las pomadas tópicas que contiene nisina (0, 2, o 6% peso/peso), mupirocina (0 o 2%), bacitracina (0 o 500 U), y lisostafina (0 o 2% peso/peso) se frotaron sobre el área infectada 3 veces al día los días 1 y 2 usando un aplicador estéril con punta de algodón. Se sacrificó a los ratones mediante asfixia con CO₂ por la mañana del día 3 y se escindió un parche de piel de 0,5-cm² alrededor del área infectada. La muestra de la piel se diseccionó y se introdujo en un tubo de ensayo que contenía 1 ml de proteinasa K 5 mg/ml, esterasa 20 mg/ml y carbón activado 20 mg/ml en PBS para neutralizar la actividad de los agentes antibacterianos. Las bacterias se movieron de la muestra de la piel mediante ultrasonidos. tratamientos de 2 minutos por muestra con 5 segundos alternos a 3 W y 5 segundos a 0 W en un Virsonic 600 con micropunta (VirTis). Después de mezclar con vórtex, 50 µl de cada muestra se sembró en placas con agar sangre, se incubó a 37 °C durante la noche y se contaron las colonias y se compararon con los controles sin tratar.

Para los datos siguientes, excepto cuando se indicó en la Figura 2, todas las formulaciones antibióticas estaban en una pomada de polietilenglicol (PEG) común (PEG 400 más PEG 3350).

La figura 1 muestra que la eficacia de la nisina sola aumentaba con las dosis crecientes de nisina y disminuye las UFC infecciosas en 2 log, en comparación con un descenso de 3 log con mupirocina sola (en base molar, 2% de mupirocina es dos veces la dosis de 6% de nisina). Ningún fármaco solo fue capaz de eliminar completamente la infección. Por el contrario, 3 de 10 animales en el grupo de combinación de 2% de nisina/2% de mupirocina y 5 de 11 en el grupo de combinación de 6% de nisina/2% de mupirocina se eliminaron de la infección y las UFC infecciosas en las infecciones residuales se redujeron en 5 log, 100 veces más que cualquiera de las terapias solas.

La Figura 2 muestra la eficacia de nisina, lisostafina y bacitracina solas y en combinación sobre la infección por *S. aureus* en piel de ratón erosionada, usando dos formulaciones diferentes de bacitracina. Pomada de PEG y una formulación disponible comercialmente de G&W Laboratories Inc (base de vaselina). Ninguno de estos agentes antibacterianos administrados de forma independiente o administrados en una composición que comprende nisina, fue significativamente más eficaz que la administración independiente de nisina (reducción de aproximadamente 1,5 log).

Como se muestra en la Figura 3, la mupirocina exhibió una actividad mínima contra una cepa de *S. aureus* resistente a mupirocina. No obstante, la nisina fue capaz de reducir las UFC infecciosas en 3 log.

Se ha demostrado que la mupirocina tenía mala actividad contra *P. aeruginosa*. No obstante, el espectro de actividad de la nisina incluye bacterias gramnegativas cuando se formula en presencia de quelantes, tensioactivos o aceites esenciales.

Como se muestra en la Figura 4, la nisina más EDTA tenía más actividad que la nisina sola en esta formulación y menos UFC infecciosas en 1,5 log. La mupirocina no añade ninguna actividad adicional a la formulación de nisina.

Ejemplo 2

Las composiciones que comprenden mupirocina y nisina eliminan *Staphylococcus aureus* inoculado de heridas de espesor parcial

Animales experimentales. Una cerda hembra joven sin patógenos (SPF: Looper Farms, North Carolina) de 25-30 kg de peso se mantuvo estabulada durante dos semanas antes de iniciar el experimento. El animal recibió dieta basal a demanda y se estabuló individualmente en las instalaciones de animales (cumpliendo las normas de la American Association for Accreditation of Laboratory Animal) con temperatura (19-21 °C) y luz (12h/12h LO) controladas. Los protocolos de animales experimentales usados para este estudio siguieron las guías para cuidados y uso de los animales de laboratorio (véase, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Department of Agriculture). Se monitorizó a los animales a observación diaria para detectar signos de dolor o molestias. Con el fin de minimizar las posibles molestias, el primer día se administró a cada animal un analgésico buprenorfina 0,03 mg/kg (Buprenex inyectable; Reckitt Benckiser Hull, Inglaterra) y, después, cada tres días, durante la anestesia; se usó un sistema transdérmico de fentanilo: 25 µg/h (Duragesic; Alza Corp. Mountain View, CA) durante todo el experimento.

Preparación de los animales, formación de heridas y tratamiento: Cada animal se anestesió con Telazol HCl (1,4 mg/kg), Xilazina (2 mg/kg), Atropina (0,05 mg/kg) I.M. e inhalación de una combinación de isofluorano y oxígeno. El pelo en el dorso del cerdo se cortó con tijeras para animales estándar. La piel de ambos lados del animal se preparó lavando con un jabón sin antibiótico (NEUTROGENA) y agua estéril. El animal se secó con una gasa estéril. Se realizaron cuarenta y ocho heridas de un espesor parcial de (10mm x 7mm x 0,3 mm de profundidad) en el área paravertebral y torácica de cada animal con un electroqueratona especializado equipado con una cuchilla de 7 mm. Las heridas se separaron una de otra por al menos 7 cm de piel no herida. Después, a cada herida se inoculó una cantidad conocida de *Staphylococcus aureus* (suspensión de 10^6). La suspensión se frotó ligeramente en el lugar de ensayo durante diez segundos usando una espátula estéril de TEFLON. Después de la inoculación se cubrieron las heridas con un vendaje de película de poliuretano TEGADERM (3M, Inc.) durante 24 horas antes del inicio del tratamiento con el fin de dar tiempo a las bacterias para colonizar las heridas y desarrollar una película biológica.

Inoculación en las heridas. Se usó un cultivo fresco del aislado patogénico obtenido directamente de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) Rockville, Maryland, (*Staphylococcus aureus* ATCC #6538). El cultivo bacteriano liofilizado se recuperó según el protocolo de recuperación estándar de la ATCC. Todas las suspensiones del inóculo se realizaron frotando el cultivo durante la noche procedente de una placa de cultivo en 4,5 ml de agua estéril y preparando la suspensión hasta que la turbidez de la suspensión era equivalente a la del patrón de turbidez de McFarland nº 8. Esto tuvo como resultado una concentración de la suspensión de aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml). La suspensión de 10^8 se diluyó en serie para formar una suspensión del inóculo con una concentración de 10^6 UFC/ml en 35 ml de caldo de soja tríptico (TSB). Una pequeña cantidad de la suspensión del inóculo se sembró en medio de cultivo para cuantificar la concentración exacta de los organismos viables antes del experimento. La suspensión del inóculo se usó directamente para inocular cada punto. Un alícuota de 25 µl se depositó en un cilindro de gas estéril (diámetro de 22 mm) en el centro de cada punto de herida. La suspensión se frotó ligeramente en el lugar de ensayo durante diez segundos usando una espátula estéril de TEFLON. Después de la inoculación, las heridas se cubrieron con un vendaje de poliuretano durante 48 horas para permitir que las bacterias desarrollaran una película biológica sobre las heridas. Después, se retiraron los vendajes para cultivar las heridas basales y para tratar el resto de acuerdo con el diseño experimental descrito en la FIG. 5. Las heridas se trataron dos veces al día.

Procedimientos de recuperación. Se cultivaron tres heridas 48 horas después de la inoculación para cuantificar la película biológica basal y dos heridas de cada grupo de tratamiento los días 2, 5 y 7 después del tratamiento. En cada punto de tiempo de obtención de muestras, los sitios se cultivaron cuantitativamente. Cada sitio se cultivó solo una vez. El área herida se rodeó con un cilindro de vidrio estéril (diámetro externo 22 mm) que se mantuvo en su sitio con dos asas. Un ml de la solución de frotado se pipeteó en el cilindro de vidrio y el sitio se frotó con una

espátula estéril de TEFLON durante 30 segundos.

Se realizaron diluciones en serie y las soluciones de frotado se cuantificaron usando el sistema Spiral Plater System que deposita una pequeña cantidad definida (50 μ l) de suspensión sobre la superficie de una placa de agar en rotación. El medio selectivo para *Staphylococcus aureus* fue agar de sal manitol. Todas las muestras se incubaron aeróbicamente durante 24 horas a 37 °C. Después del periodo de incubación (24 h), se contaron las colonias en las placas y se calcularon las unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). El ensayo de identificación hipotética para el patógeno es la capacidad de *S. aureus* para coagular el plasma de conejo.

Tres heridas por grupo de tratamiento se cultivaron 2, 5, y 7 días después del tratamiento. Se diluyeron en serie, se sembraron en agar sal manitol y se incubaron durante 24 horas. Después del periodo de incubación se contaron las colonias y se determinó el log de las unidades formadoras de colonias/ml. La media geométrica del log (UFC/ml) y la desviación estándar se calcularon para cada tiempo y tratamiento. El tamaño de inóculo inicial usado para este experimento fue de 6,13 log ufc/ml. Los recuentos basales después de 24 horas de inoculación en el entorno de la herida fueron $7,48 \pm 1,0$ log ufc/ml. Los datos brutos combinados para el experimento total se muestran en la figura 14. La sustancia activa X es una composición que tiene nisina (6%). La sustancia activa Y es una composición que tiene nisina (6%) y mupirocina (2%).

Los datos de la comparación de tratamientos día a día fueron los siguientes:

Dos días después del tratamiento inicial de las heridas inoculadas se observó que una composición que comprende mupirocina y nisina elimina completamente *Staphylococcus aureus* de las heridas (véase la FIG. 6). Los siguientes tratamientos más eficaces fueron nisina y mupirocina, que dieron $2,29 \pm 2,0$ y $4,96 \pm 0,8$ Log UFC/ml, respectivamente. Las heridas tratadas con vehículo y las heridas que se dejaron expuestas al aire dieron números similares este día (6,5 log de UFC/ml y 6,9 log UFC/ml, respectivamente) (véase la FIG. 6).

El día 5 después del tratamiento se observó la misma tendencia que el punto de evaluación previo. Las bacterias cultivadas de las heridas tratadas con una composición que comprende mupirocina y nisina no dieron *Staphylococcus aureus* (véase la FIG. 7), siendo la nisina el siguiente tratamiento más eficaz que da menos de 1 log UFC/ML. La mupirocina tuvo un resultado similar. Las heridas tratadas con vehículo dieron aproximadamente 3 log UFC/ml de bacterias menos que el grupo de control negativo, que dio aproximadamente 4,5 lo UFC/ml de bacterias (véase la FIG. 7).

El día 7 después del tratamiento, el último día de evaluación, la tendencia observada en los dos puntos de tiempo previos permaneció. Las heridas tratadas con una composición que comprende mupirocina y nisina no dieron *Staphylococcus aureus* (véase la FIG. 8), mientras que la nisina dio $1,05 \pm 1,8$ Log UFC/ml. La mupirocina dio 1,63 Log UFC/ml, cercano a los resultados del vehículo ($1,77 \pm 1,6$ Log UFC/ml). El control negativo tuvo como resultado un poco menos de 4 log UFC/ml (3,7) (véase la FIG. 8). En la FIG. 9 se representa un resumen de los datos de los tres puntos de tiempo del tratamiento.

Ejemplo 3

Las composiciones que comprende gentamicina y nisina eliminan *Staphylococcus aureus*

Los ratones proporcionaron una abrasión cutánea superficial y se inoculó *S. aureus* como se describe en el ejemplo 2, y se trataron con una composición que comprende una combinación de 6% de nisina y 0,1% de gentamicina. Esta combinación eliminó sustancialmente todo el *S. aureus* detectable.

Ejemplo 4

Una composición que comprende nisina y mupirocina es superior a una composición que comprende solo mupirocina en el tratamiento de *S. aureus* sensible a meticilina y resistente a meticilina

Se proporcionó a los ratones una abrasión cutánea superficial como se describe en el ejemplo 2 y se infectaron con *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) o *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y después se trató con una composición que comprende: Vehículo (crema de PEG) solo, mupirocina (2%) o mupirocina (2%) y nisina (6%) (sustancia activa Y). La Figura 10 muestra el log medio (UFC/ml) de bacterias recuperadas después de un primero o un segundo tratamiento (MSSA) o después de uno y tres días (MRSA). La combinación de nisina y mupirocina fue superior en el tratamiento (p. ej., matar y/o inhibir el crecimiento) de MSSA y MRSA en comparación con los controles y con cualquiera de los tratamientos solos.

Ejemplo 5

La nisina no es sinérgica con mupirocina, neomicina o gentamicina *in vitro*

Con el fin de determinar si la nisina podía funcionar de forma sinérgica con otros antimicrobianos para tratar (p. ej., matar y/o inhibir el crecimiento) de bacterias *in vitro*, se analizó la concentración mínima inhibidora (CMI) de la nisina sola o la nisina en combinación con mupirocina, neomicina o gentamicina. La CMI se determinó calculando la reducción log de *S. aureus* viables tras la incubación con las cantidades de nisina y otros antimicrobianos como se

indica en la FIG. 11.

Como se documenta en la FIG. 11, ninguno de los antimicrobianos analizados (es decir, mupirocina, neomicina y gentamicina) mostraron la capacidad de sinergizar *in vitro* con nisina.

Ejemplo 6

5 La nisina no es sinérgica con neomicina o galidermina en el tratamiento de infecciones cutáneas

Con el fin de determinar si la nisina podía funcionar de forma sinérgica con otros antimicrobianos para tratar (p. ej., matar y/o inhibir el crecimiento) de bacterias en un moldeo de herida superficial (véase el ejemplo 2), se usó nisina en combinación con neomicina o galidermina y se analizaron. La nisina no es sinérgica con neomicina ni con galidermina en el modelo de infección cutánea.

10 Ejemplo 7

La nisina no es sinérgica con gentamicina y galidermina no es sinérgica con mupirocina en el tratamiento de infecciones cutáneas

Con el fin de determinar si la nisina o la galidermina podía funcionar de forma sinérgica con otros antimicrobianos para tratar (p. ej., matar y/o inhibir el crecimiento) de bacterias en un moldeo de herida superficial (véase el ejemplo 2), se usó nisina o galidermina en combinación con gentamicina y mupirocina, respectivamente, y se analizaron. La nisina sí fue sinérgica con gentamicina y la galidermina no fue sinérgica con mupirocina para reducir los recuentos bacterianos en el modelo de infección cutánea.

Ejemplo 8

La mupirocina no es sinérgica con bacitracina en el tratamiento de infecciones cutáneas

Con el fin de determinar si la mupirocina podía funcionar de forma sinérgica con bacitracina para tratar (p. ej., matar y/o inhibir el crecimiento) de bacterias en un moldeo de herida superficial (véase el ejemplo 2), se usó mupirocina en combinación con bacitracina y se analizaron para tratar las bacterias. Como se muestra en la FIG. 12, la mupirocina no fue sinérgica con la bacitracina ni tampoco se produjo un beneficio aditivo cuando se usaron los dos juntos en la reducción de *S. aureus* en el modelo de herida infectada.

25 Ejemplo 9

Una composición que comprende nisina y mupirocina proporciona una capacidad sinérgica para tratar *S. aureus* en un modelo de infección de sutura

Se determinó si la nisina y la mupirocina, solas o en combinación, podrían tratar *S. aureus* en un modelo de infección de tejidos profundos. Se generó un modelo de infección cutánea de las suturas en el que se produjo un corte profundo (p. ej., uno que necesite suturas para su cierre) en un ratón y se introdujo *S. aureus* en la incisión. Como se muestra en la FIG. 13, la nisina y la mupirocina solos mostraron muy poca eficacia en el tratamiento de *S. aureus*. No obstante, la combinación de nisina más mupirocina casi erradicó la infección. Por tanto, se puede usar una combinación de nisina y mupirocina para tratar una infección de tejidos profundos así como una infección subcutánea.

35

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica tópica que comprende una cantidad eficaz de nisina y mupirocina para su uso en un procedimiento de tratamiento o prevención de infecciones causadas por una bacteria grampositiva no resistente a mupirocina.
- 5 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica es una crema.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica es una pulverización.
- 10 4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica comprende polietilenglicol.
5. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición farmacéutica comprende 6% de nisina y 2% de mupirocina.
6. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha composición farmacéutica comprende 2% de nisina y 2% de mupirocina.
- 15 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha bacteria grampositiva es *Staphylococcus aureus*.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho *Staphylococcus aureus* es resistente a antibióticos.
- 20 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicho *Staphylococcus aureus* es resistente a metilina.
10. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en la que el tratamiento o prevención de la infección evita el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
11. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha infección es una infección de una herida.
- 25 12. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha infección es una infección de una superficie cutánea.
13. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 12, en la que el tratamiento de la infección da como resultado una reducción de 3 log o mayor de *Staphylococcus aureus* en comparación con un control no tratado.
- 30 14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13, en la que dicha reducción se produce tras dos días desde la administración de la composición farmacéutica.

FIGURA 1

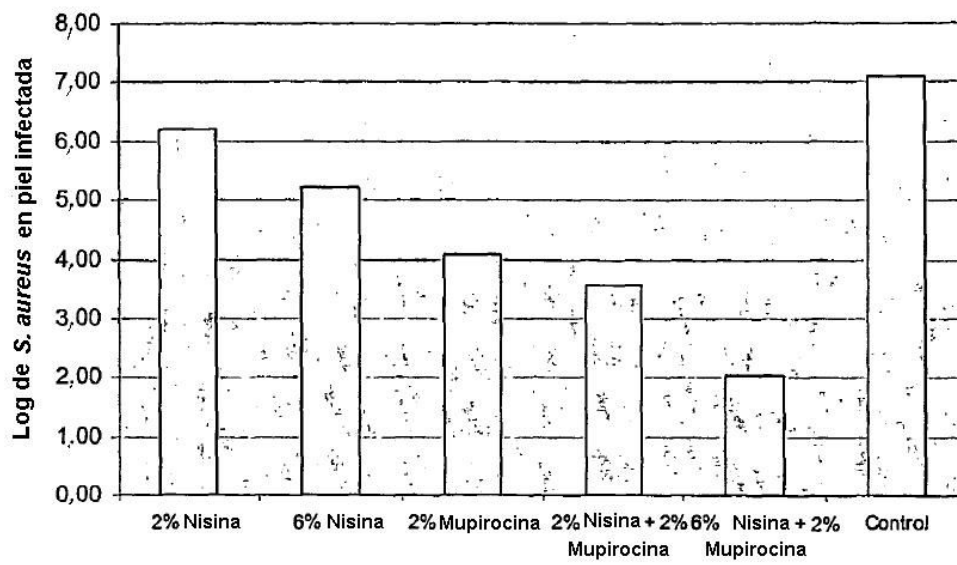


FIGURA 2

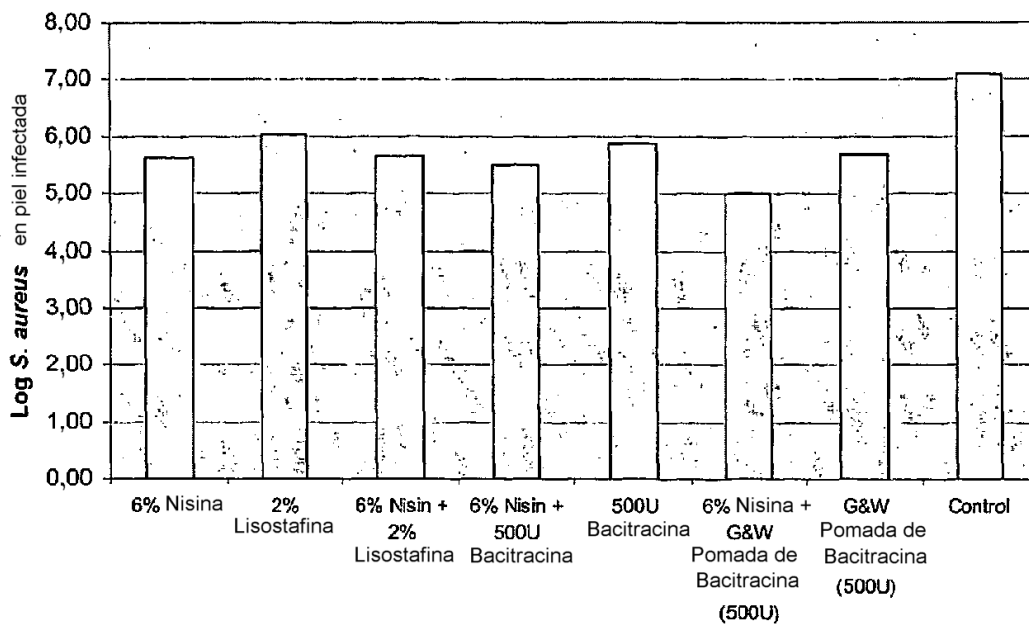


FIGURA 3

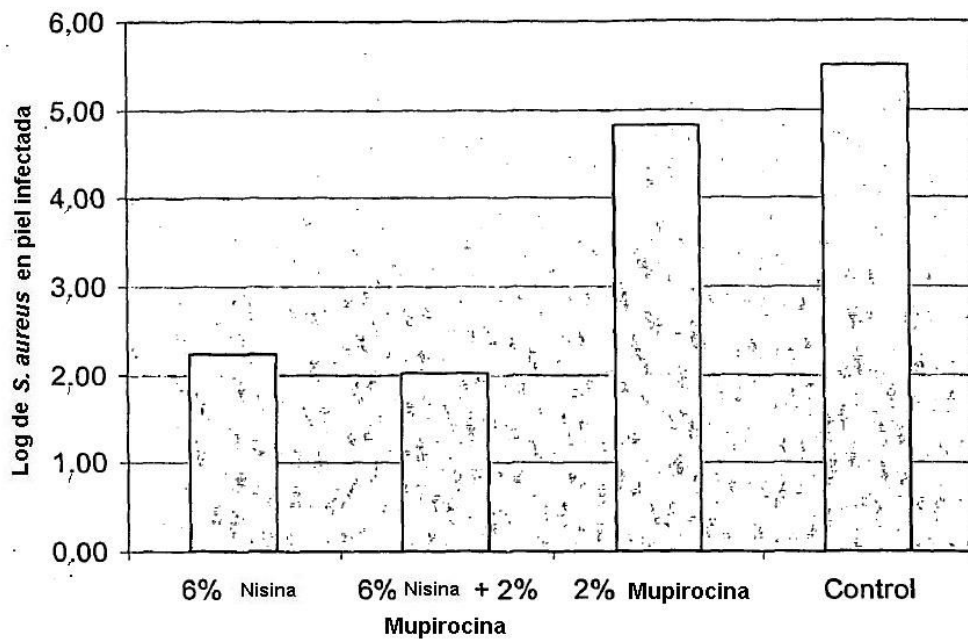


FIGURA 4

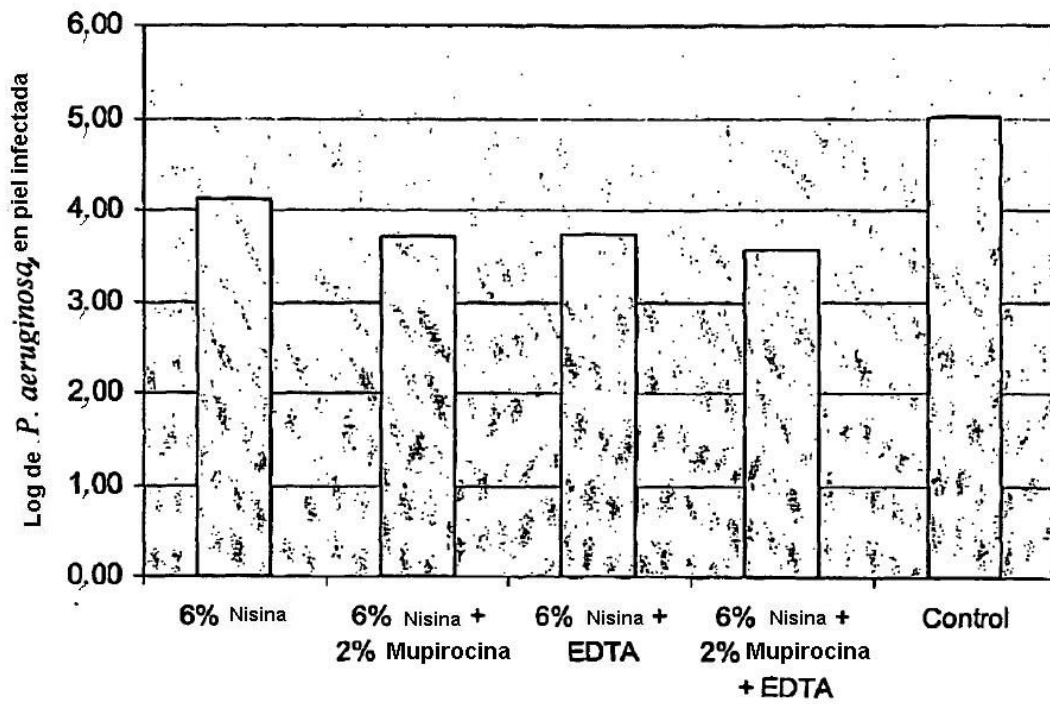
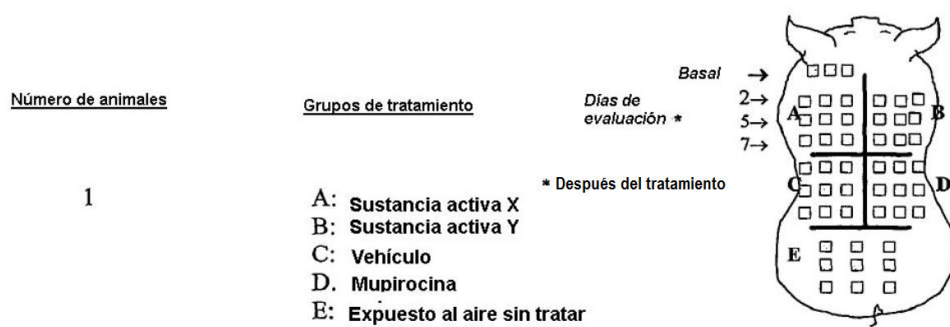


FIGURA 5



- Día 0= Herida e inoculación
- Día 1= 24 horas después de la inoculación
- Día 2= 48 horas de biopelícula (Día inicial de tratamiento)
- Día 3= 2º día de tratamiento
- Día 4= Primer tiempo de evaluación (48 h o día 2 tras el tratamiento inicial) 3er día de tratamiento
- Día 5= 4º día de tratamiento
- Día 6= 5º día de tratamiento
- Día 7= Segundo tiempo de evaluación (168 horas o día 5 tras el tratamiento inicial) 6º día de tratamiento
- Día 8= 7º día de tratamiento
- Día 9= Tiempo de la última evaluación (216 horas o día 7 tras el tratamiento inicial)

FIGURA 6

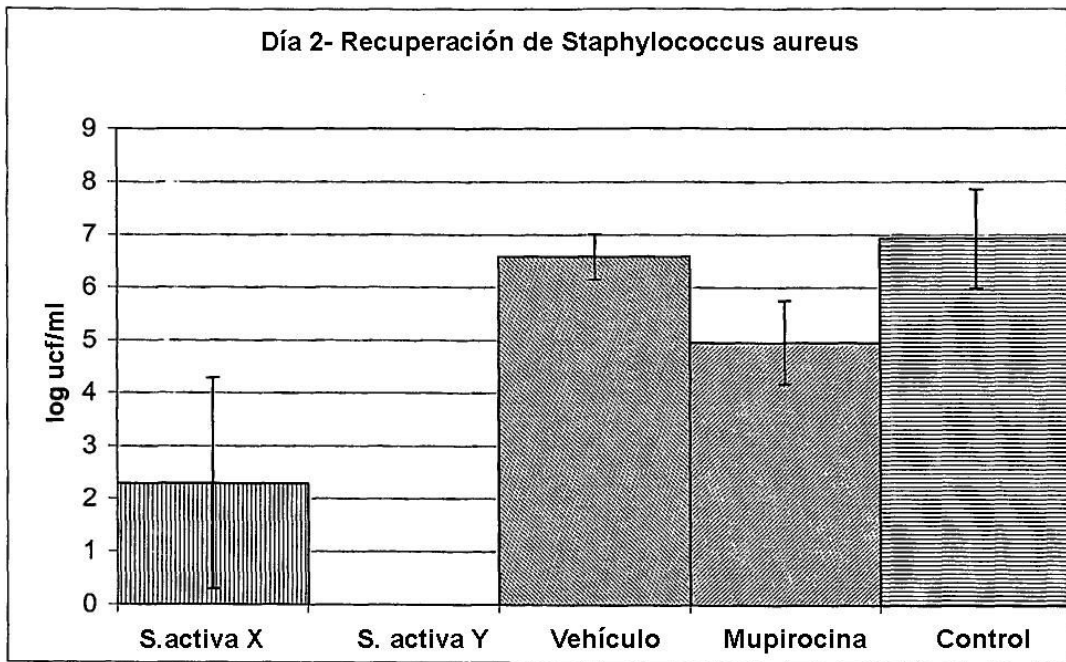


FIGURA 7

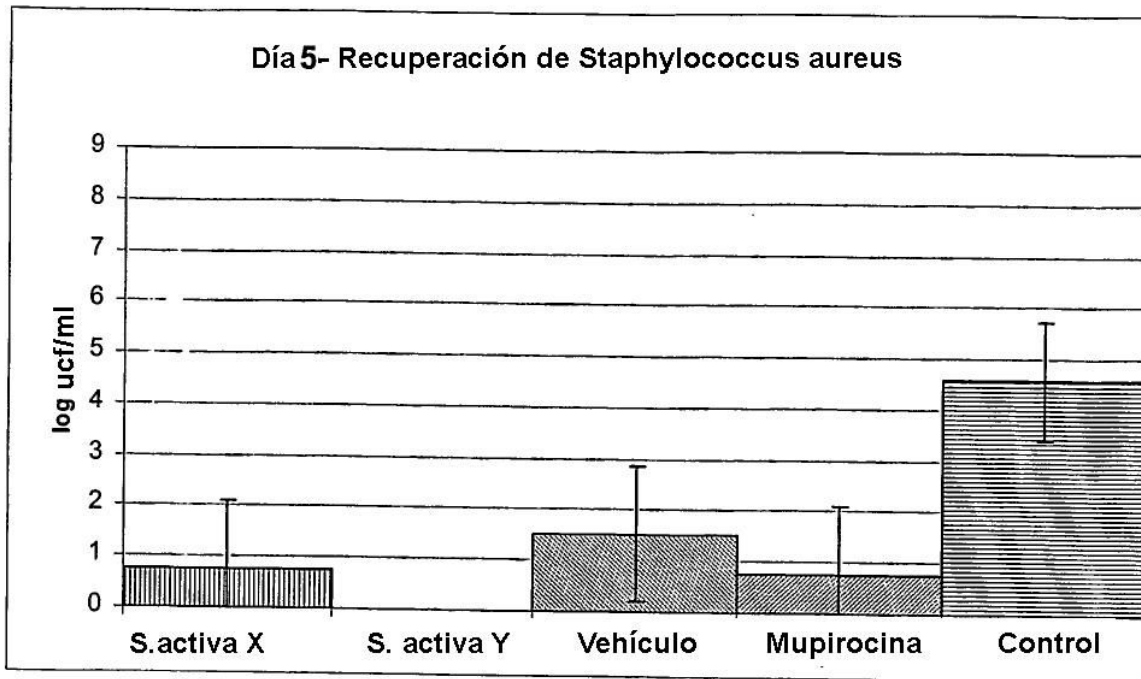


FIGURA 8

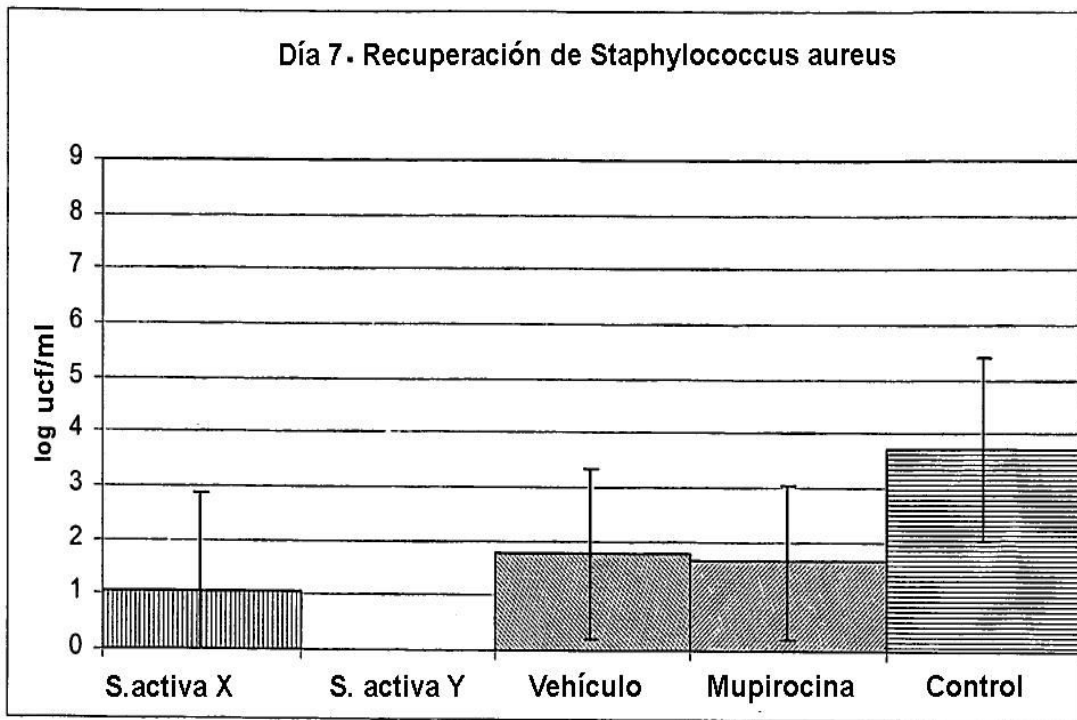


FIGURA 9

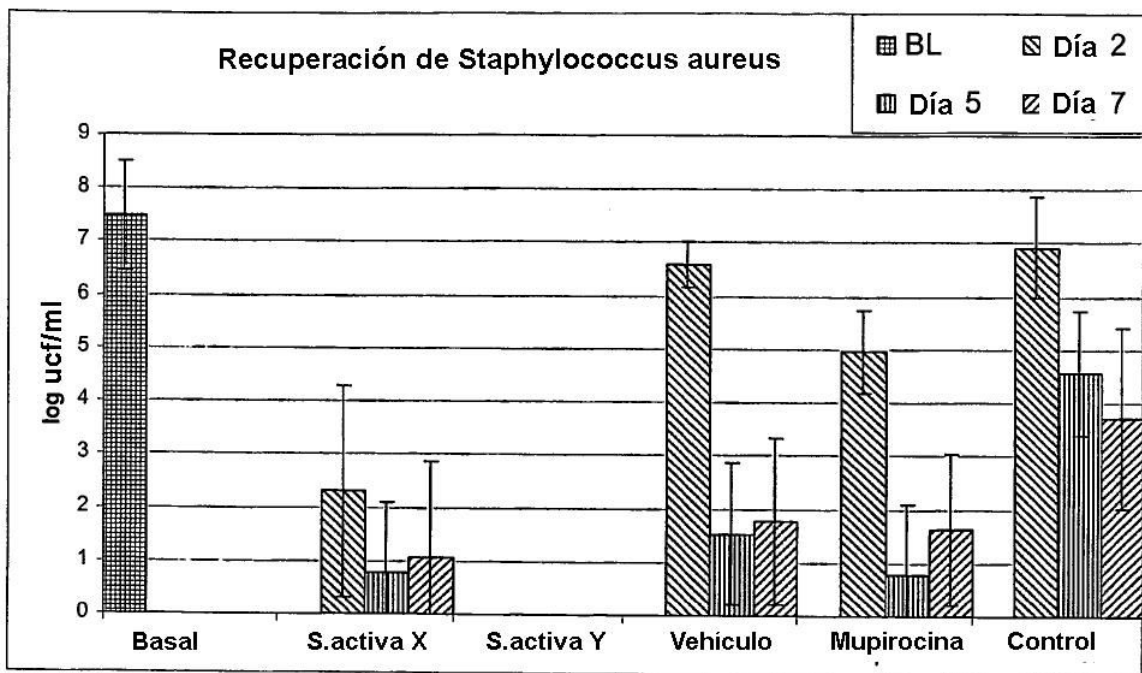
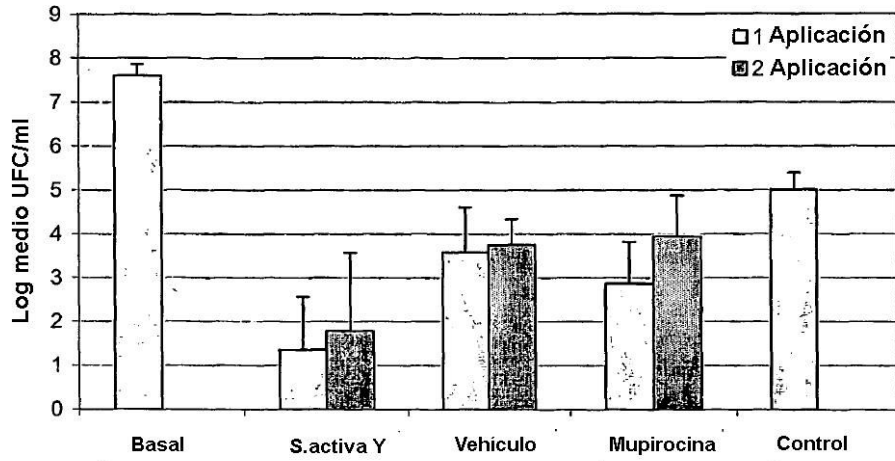


FIGURA 10

MSSA recuperada- TP 24 h



MRSA recuperado- Dosis dos veces al día

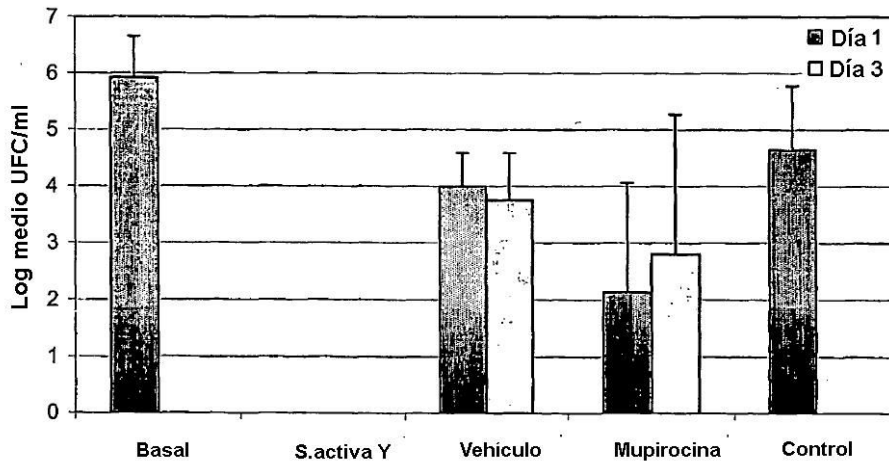


FIGURA 11

Gentamicina y nisina													
	0	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	Gentamicina (ug/ml)
0	0,659	0,684	0,676	0,69	0,69	0,645	0,518	0,041	0,032	0,032	0,031	0,032	
0,03125	0,684	0,7	0,682	0,681	0,685	0,658	0,531	0,034	0,032	0,033	0,034	0,032	
0,0625	0,682	0,683	0,685	0,676	0,677	0,645	0,546	0,034	0,034	0,033	0,033	0,032	
0,125	0,634	0,658	0,648	0,652	0,648	0,62	0,522	0,032	0,031	0,033	0,034	0,033	
0,25	0,236	0,232	0,257	0,295	0,245	0,234	0,331	0,034	0,032	0,032	0,034	0,032	
0,5	0,098	0,034	0,033	0,033	0,034	0,065	0,034	0,034	0,033	0,035	0,033	0,034	
1	0,033	0,033	0,033	0,036	0,033	0,033	0,032	0,034	0,034	0,034	0,035	0,034	
2	0,03	0,035	0,033	0,034	0,034	0,034	0,033	0,035	0,031	0,033	0,035	0,03	
Nisina (ug/ml)													
Neomicina y Nisina													
	0	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	Neomicina (ug/ml)
0	0,768	0,685	0,65	0,645	0,716	0,692	0,65	0,467	0,032	0,032	0,03	0,032	
0,03125	0,703	0,709	0,691	0,685	0,71	0,701	0,657	0,457	0,032	0,034	0,033	0,035	
0,0625	0,708	0,702	0,703	0,696	0,696	0,681	0,655	0,446	0,034	0,032	0,033	0,032	
0,125	0,667	0,672	0,659	0,654	0,659	0,655	0,619	0,389	0,035	0,034	0,034	0,032	
0,25	0,332	0,304	0,285	0,256	0,304	0,322	0,386	0,178	0,033	0,032	0,034	0,032	
0,5	0,035	0,034	0,034	0,034	0,033	0,034	0,033	0,036	0,034	0,034	0,033	0,035	
1	0,034	0,034	0,034	0,033	0,033	0,035	0,035	0,034	0,034	0,034	0,034	0,033	
2	0,032	0,036	0,033	0,036	0,032	0,033	0,035	0,037	0,031	0,033	0,035	0,033	
Nisina (ug/ml)													
Mupirocina y nisina													
	0	0,001	0,001953	0,003906	0,007813	0,015625	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	Mupirocina (ug/ml)
0	0,632	0,677	0,703	0,696	0,553	0,156	0,037	0,034	0,033	0,033	0,03	0,031	
0,03125	0,66	0,71	0,701	0,687	0,56	0,153	0,034	0,031	0,03	0,03	0,031	0,028	
0,0625	0,667	0,692	0,686	0,685	0,565	0,156	0,039	0,03	0,03	0,029	0,03	0,029	
0,125	0,63	0,643	0,647	0,634	0,527	0,142	0,035	0,029	0,028	0,028	0,029	0,028	
0,25	0,255	0,481	0,538	0,384	0,412	0,119	0,033	0,028	0,03	0,028	0,029	0,03	
0,5	0,03	0,139	0,245	0,074	0,084	0,096	0,034	0,028	0,029	0,03	0,029	0,031	
1	0,03	0,029	0,36	0,028	0,029	0,041	0,03	0,031	0,029	0,028	0,029	0,029	
2	0,028	0,03	0,03	0,03	0,028	0,028	0,028	0,028	0,026	0,029	0,03	0,028	
Nisina													

FIGURA 12

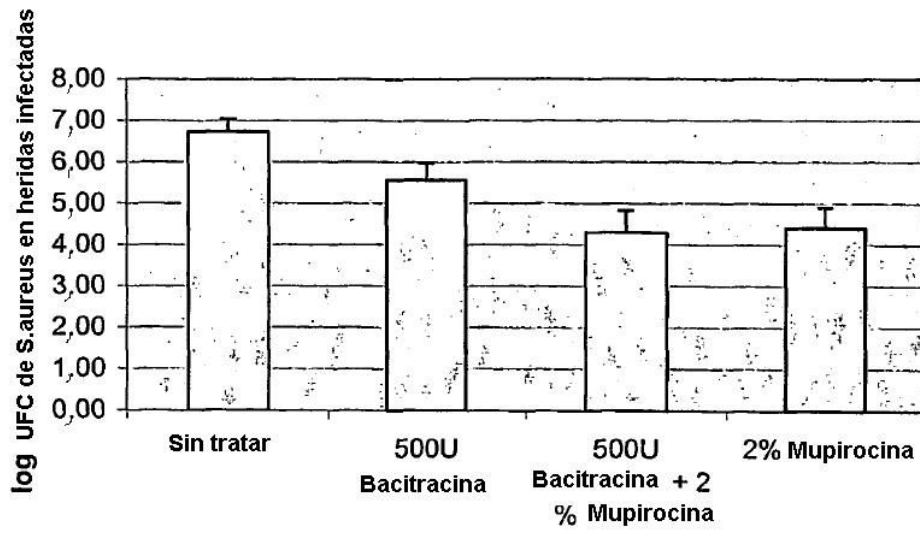


FIGURA 13

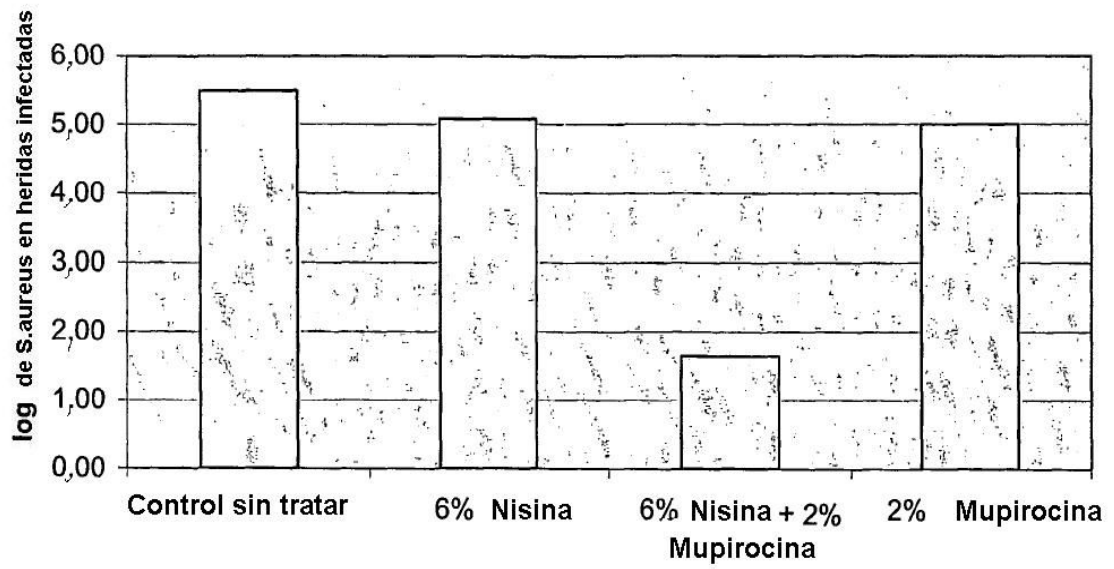


FIGURA 14

Tratamiento	Rec. medio	Tratamiento	Rec. medio	Tratamiento	Rec. medio
S. activa X	2,29 ± 2,0	S. activa X	0,77 ± 1,3	S. activa X	1,05 ± 1,8
S. activa Y	0	S. activa Y	0	S. activa Y	0
Vehículo	6,58 ± 0,4	Vehículo	1,5 ± 1,3	Vehículo	1,77 ± 1,57
Mupirocina	4,96 ± 0,8	Mupirocina	0,77 ± 1,3	Mupirocina	1,63 ± 1,42
Control	6,9 ± 0,9	Control	4,57 ± 1,2	Control	3,73 ± 1,70