

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 564**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7036 (2006.01)

A61K 31/145 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11808253 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2651419**

54 Título: **Una composición que comprende un antibiótico y un dispersante**

30 Prioridad:

14.12.2010 GB 201021186

14.12.2010 US 423000 P

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

05.04.2016

73 Titular/es:

**NOVABIOTICS LIMITED (100.0%)
The Cruickshank Building Craibstone
Aberdeen AB21 9TR, GB**

72 Inventor/es:

**O'NEIL, DEBORAH y
CHARRIER, CEDRIC**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 564 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

Una composición que comprende un antibiótico y un dispersante

Campo de la invención

5 La invención se relaciona con productos, composiciones, métodos y usos que son útiles en relación con la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas.

Antecedentes de la invención

10 Los antibióticos son utilizados ampliamente, tanto en medicina humana/veterinaria como también en agricultura, y esto ha llevado a un problema creciente de resistencia a los fármacos frente a antibióticos disponibles actualmente. Esto es particularmente relevante para condiciones o enfermedades infecciosas que son tratadas con antibióticos individuales (conocido de otra forma como monoterapia). Como tal, hay una necesidad significativa no solo por nuevos tratamientos efectivos y seguros sino por aquellos que tengan un modo de acción que minimice o anule el riesgo de desarrollo eventual de resistencia a fármacos en poblaciones de patógenos objetivo y por terapias que puedan ser utilizadas en combinación con otros tratamientos con el fin de minimizar la oportunidad de resistencia y extender la utilidad de los antimicrobianos actualmente disponibles.

15 Las infecciones bacterianas de ambientes ricos en mucosas tales como los pulmones son comunes en enfermedades tales como fibrosis quística (CF). Sin embargo, los antibióticos convencionales no tienden a trabajar bien en tales ambientes y su efectividad antibacteriana se disminuye grandemente cuando se utilizan en tales ambientes.

20 Una biopelícula microbiana es una comunidad de células microbianas embebida en una matriz extracelular de sustancias poliméricas y adherente a una superficie biológica o no biótica. En estas biopelículas puede encontrarse un rango de microorganismos (bacterias, hongos y/o protozoos, con bacteriófagos asociados y otros virus). Las biopelículas son ubicuas en la naturaleza, se encuentran comúnmente en un rango de ambientes. Las biopelículas están siendo reconocidas crecientemente por la comunidad científica y médica por estar implicadas en muchas infecciones, y especialmente por su contribución a la resistencia al tratamiento contra las infecciones.

25 Las biopelículas son agentes etiológicos para un cierto número de estados de enfermedad en mamíferos y están involucradas en el 80% de las infecciones en humanos. Ejemplos incluyen infecciones de piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urogenital, infecciones de los tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares (incluyendo contaminación de los lentes de contacto), endocarditis, infecciones en fibrosis quística, e infecciones en dispositivos médicos permanentes tales como prótesis de articulaciones, implantes dentales, catéteres e implantes cardíacos.

30 Los microbios planctónicos (esto es, microorganismos suspendidos o que crecen en un medio líquido) se utilizan típicamente como modelos para la investigación de la susceptibilidad antimicrobiana tal como lo describe el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Los microbios en la biopelículas son significativamente más resistentes al tratamiento antimicrobiano que sus contrapartes planctónicas. Sin embargo, no hay un método estandarizado para el estudio de la susceptibilidad antibiótica de microbios en biopelículas.

35 La formación de biopelículas no está limitada únicamente a la capacidad de los microbios para unirse a una superficie. Los microbios que crecen en una biopelícula son capaces de interactuar más uno con otro que con el sustrato físico real sobre el cual la biopelícula se desarrollo inicialmente. Por ejemplo, este fenómeno favorece la transferencia de genes conjugativos, la cual ocurre a una velocidad mayor entre células en biopelículas que entre células planctónicas. Esto representa una oportunidad incrementada para la transferencia horizontal de genes entre bacterias, y es importante porque esto puede facilitar la transferencia de resistencia a antibióticos o genes determinantes de la virulencia desde microbios resistentes a los susceptibles. Las bacterias pueden comunicarse una con otra por un sistema conocido como sensibilidad en quórum, a través de la cual se liberan moléculas de señalización hacia el ambiente y su concentración puede ser detectada por los microbios circundantes. La sensibilidad en quórum permite que las bacterias coordinen su comportamiento, potenciando así su capacidad para sobrevivir. Las respuestas a la sensibilidad en quórum incluyen la adaptación a la disponibilidad de nutrientes, defensa contra otros microorganismos que pueden competir por los mismos nutrientes y el evitar compuestos tóxicos potencialmente peligrosos para las bacterias. Es muy importante para las bacterias patogénicas durante la infección de un huésped (por ejemplo humanos, otros animales o plantas) coordinar su virulencia con el fin de escapar a la respuesta inmune del huésped con el fin de ser capaces de establecer una infección exitosa.

La formación de biopelículas juega un papel clave en muchas enfermedades infecciosas, tales como fibrosis quística y periodontitis, en infecciones de la corriente sanguínea y del tracto urinario y como consecuencia de la presencia de dispositivos médicos permanentes. Los mecanismos sugeridos mediante los cuales los microorganismos asociados a

5 una biopelícula provocan enfermedades en su huésped incluyen los siguientes: (i) penetración retardada del agente microbiano a través de la matriz de la biopelícula, (ii) desprendimiento de células o agregados celulares de las películas de los dispositivos médicos permanentes, (iii) producción de endotoxinas, (iv) resistencia al sistema inmune del huésped, (v) provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes a través de transferencia genética horizontal de resistencia antimicrobiana y/o genes determinantes de la virulencia, y (vi) velocidad de crecimiento alterada (esto es, latencia metabólica) (Donland and Costerton, Clin Microbiol Rev 15: 167-193, 2002; Parsek and Singh, Annu Rev Microbiol 57: 677-701, 2003; Costerton JW, Resistance of biofilms to stress. In 'The biofilm primer'. (Springer Berlin Heidelberg). pp. 56-64.2007).

10 Evidencias experimentales recientes han indicado la existencia dentro de las biopelículas de una pequeña subpoblación de células persistentes no metabolizantes especializadas (células durmientes). Se cree que estas células pueden ser responsables de la alta resistencia a la tolerancia de la biopelícula a los agentes antimicrobianos. Las células persistentes tolerantes a fármacos múltiples están presentes en poblaciones tanto planctónicas como de biopelículas y parece que las levaduras y las bacterias han desarrollado estrategias análogas que asignan la función de supervivencia a esta subpoblación. La protección ofrecida por la matriz polimérica permite que las células persistentes evadan la eliminación y sirvan como una fuente para la repoblación. Hay evidencia de que las células persistentes pueden ser responsables principalmente por la tolerancia a fármacos múltiples de las biopelículas microbianas (LaFleur et al., Antimicrob Agents Chemother. 50: 3839-46, 2006; Lewis, Nature Reviews Microbiology 5, 48-56 2007).

20 Persiste una necesidad por mejores terapias para tratar y prevenir infecciones bacterianas, en particular las asociadas con ambientes mucolíticos tales como los pulmones CF. Además persiste una necesidad para limitar la cantidad de dosis de antibióticos utilizadas con la introducción de terapias novedosas de reemplazo o tratamientos adjuntos que puedan mejorar la efectividad de los tratamientos disponibles actualmente en el tratamiento o prevención de infecciones bacterianas, en particular en un asentamiento de biopelícula.

Afirmaciones de la invención

25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se provee un producto que comprende un agente antibiótico y un segundo agente que es un dispersante o un agente antiadhesivo, en particular un dispersante mucolítico o un agente antiadhesivo mucolítico.

De acuerdo con una realización, el segundo agente puede tener actividad antimicrobiana. Alternativamente, el segundo puede no tener actividad antimicrobiana directa inherente.

30 La emisión incluye productos farmacéuticos que comprenden al menos un agente antibiótico y al menos un dispersante o al menos un agente antiadhesivo, en particular un dispersante mucolítico o un agente antiadhesivo mucolítico.

También se provee el producto descrito más arriba para uso terapéutico.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se provee el producto para uso en el tratamiento o prevención de una infección bacteriana.

35 La infección bacteriana puede ser una infección bacteriana planctónica diseminada o en particular, una biopelícula bacteriana.

También se provee un método para prevenir o tratar una infección bacteriana que comprende las etapas de administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del producto de la invención a un paciente que así lo requiere. El agente antibiótico y el dispersante o agente antiadhesivo pueden ser administrados de manera combinada o secuencial.

40 Descripción detallada

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Producto

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se provee un producto que comprende un agente antibiótico de acuerdo con la reivindicación 1 con cisteamina.

45 De acuerdo con un caso, el antibiótico es un antibiótico no peptídico. Preferiblemente, el producto de la presente invención no contiene ningún péptido.

Los productos de la presente invención son efectivos en el tratamiento y prevención de infecciones bacterianas,

5 incluyendo infecciones bacterianas de un ambiente mucoso. Tales condiciones son comúnmente muy difíciles de tratar puesto que los antibióticos convencionales son menos efectivos en tales ambientes. Además, los agentes del producto de la presente invención se combinan en general de manera sinérgica para proveer actividad antibacteriana sorprendentemente alta. La cantidad de antibiótico requerida se minimiza de esta manera. Alternativamente, los agentes del producto de la presente invención se pueden combinar de manera aditiva.

Los productos tienen la ventaja de que demuestran actividad antibacteriana contra colonias bacterianas establecidas, incluyendo las células persistentes presentes en colonias bacterianas, tales como biopelículas bacterianas, lo cual es una etapa esencial hacia la erradicación de las biopelículas.

Efecto sinérgico

10 Sorprendentemente, se ha encontrado que la acción antibacteriana del agente antibiótico y el agente dispersante o antiadhesivo se incrementa sinérgicamente por combinación.

15 La Concentración Inhibidora Fraccionada (FIC) corresponde a un coeficiente de interacción que indica si la combinación de agentes antimicrobianos es sinérgica, aditiva, antagonista o neutra. La FIC se determina comparando la actividad de un agente en combinación (MIC del agente A + agente B) con la actividad del agente solo (MIC del agente A o agente B) como sigue (Singh et al., 2000):

$$FIM = MIC_{A \text{ [combinación]}} / MIC_{A \text{ [solo]}} + MIC_{B \text{ [combinación]}} / MIC_{B \text{ [solo]}}$$

Las combinaciones aditivas de dos agentes antimicrobianos están indicadas por un índice FIC de 1, mientras que un índice FIC <1 indica combinaciones sinérgicas. Las combinaciones neutras darían una FIC entre 1 y 4, un índice FIC mayor de 4 indica efectos antagonistas entre dos agentes antimicrobianos.

20 En general el índice FIC de la combinación de los componentes del producto de la presente invención es menor de 1, típicamente menor de 0.9, adecuadamente menor de 0.8, ventajosamente menor o alrededor de 0.75, por ejemplo menor de o alrededor de 0.5.

Alternativamente, el índice FIC de la combinación de los componentes del producto de la presente invención puede ser más de 1; generalmente entre 1 y 2; típicamente entre 1 y 1.5, adecuadamente entre 1 y 1.2.

25 En ambientes mucolíticos los antibióticos convencionales tales como tobramicina, colistina, gentamicina o ciprofloxacina no exhiben el mismo nivel de actividad antibacteriana que cuando están en ambientes no mucolíticos. Sorprendentemente, la actividad antibacteriana de tales antibióticos convencionales se incrementa por administración de un agente dispersante o antiadhesivo tal como cisteamina. Los antibióticos y los antiadherentes o dispersantes actúan de manera sinérgica y cuando se administran juntos o secuencialmente la actividad antibacteriana de los
30 agentes activos es bastante más alta que cuando se administran separadamente.

En general, la actividad antibacteriana del producto de la presente invención es al menos dos veces mayor que la actividad antibacteriana del agente antibiótico solo, típicamente la actividad antibacteriana del producto de la presente invención es al menos cuatro veces más alta que la del agente antibiótico solo, adecuadamente al menos unas ocho veces más alta, generalmente al menos, o alrededor de diez veces más alta.

35 En general la concentración inhibidora mínima (MIC) del producto de la presente invención es al menos dos veces inferior a la MIC del agente antibiótico solo, en conexión con el mismo patógeno bacteriano, adecuadamente al menos cuatro veces más baja, típicamente al menos ocho veces más baja, ventajosamente al menos o alrededor de diez veces más baja.

40 Para obtener efectos sinérgicos los agentes del producto de la presente invención pueden ser administrados juntos o secuencialmente, preferiblemente con una separación no mayor de 10 minutos.

Agente antibiótico

El término "antibiótico" se utiliza para hacer referencia a agentes antibacterianos que pueden ser derivados de fuentes bacterianas. Los agentes antibióticos pueden ser bactericidas y/o bacteriostáticos.

45 En general el agente antibiótico es del grupo consistente de aminoglicósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenems, cefalosporinas (incluyendo cefalosporinas de primera, segunda, tercera, cuarta y quinta generación), lincosamidas, macrólidas, monobactamas, nitrofuranos, quinolonas, penicilinas, sulfonamidas, polipéptidos y tetraciclinas. Alternativa o adicionalmente el agente antibiótico puede ser efectivo contra micobacterias.

De acuerdo con un caso, el agente antibiótico puede ser un aminoglicósido tal como amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tobramicina o paromomicina.

De acuerdo con un caso, el agente antibiótico puede ser uno tal como geldanamicina y herbimicina

Alternativamente el agente antibiótico puede ser un carbacefem tal como loracarbef.

- 5 De acuerdo con un caso adicional, el agente antibiótico es un carbapenem tal como ertapenem, doripenem, imipenem/cilastatina o meropenem.

- 10 Alternativamente, el agente antibiótico puede ser una cefalosporina (primera generación) tal como cefadroxil, cefazolina, cefalexina, cefalotina o cefalothina, o alternativamente una cefalosporina (segunda generación) tal como cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil o cefuroxima. Alternativamente el agente antibiótico puede ser una cefalosporina (tercera generación) tal como cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftibuten, ceftizoxima y ceftriaxona o una cefalosporina (cuarta generación) tal como cefepime o ceftobiprol.

El agente antibiótico puede ser una lincosamida tal como clindamicina o azitromicina, o una macrólida tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina y espectinomicina.

- 15 Alternativamente el agente antibiótico puede ser una monobactama tal como aztreonam, o un nitrofurano tal como furazolidona o nitrofurantoína.

El agente antibiótico puede ser una penicilina tal como amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G o V, piperacilina, temocilina y ticarcilina.

- 20 El agente antibiótico puede ser una sulfonamida tal como mafenida, sulfonamidocrisoidina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilimida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim, y trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) (TMP-SMX).

El agente antibiótico puede ser una quinolona tal como ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina y temafloxacina.

De acuerdo con un caso, el agente antibiótico puede ser un polipéptido tal como bacitracina, colistina y polimixina B.

- 25 Alternativamente el agente antibiótico puede ser una tetraciclina tal como demeclociclina, doxiciclina, minociclina y oxitetraciclina.

Alternativa o adicionalmente el agente antibiótico puede ser efectivo contra micobacterias. En particular el agente antibiótico puede ser clofazimina, lampreno, dapsona, capreomicina, cicloserina, etambutol, etionamida, isoniazida, pirazinamida, rifampicina, rifabutina, rifapentina o estreptomycinina.

- 30 En general el agente antibiótico es activo en el tratamiento o profilaxis de infecciones causadas por bacterias gram-negativas o gram-positivas, tales como *Escherichia coli* y *Klebsiella* particularmente *Pseudomonas aeruginosa*.

El segundo agente

- 35 El segundo agente es un dispersante. En particular, el segundo agente se selecciona de un dispersante mucolítico. El segundo agente puede ser cualquier agente que inhibe la formación de una colonia bacteriana, en particular cualquier agente que inhibe la formación de biopelícula. A manera de ejemplo, el segundo agente puede inhibir la adhesión bacteriana, la hidrofobicidad o producción de limo.

De acuerdo con un caso de la presente invención, el segundo agente no es un péptido.

- 40 El término "dispersante" pretende incluir cualquier agente capaz de dispersar partículas bacterianas, inhibiendo así la formación de una colonia bacteriana. En particular, el dispersante puede dispersar las partículas de una biopelícula bacteriana. El dispersante puede promover la dispersión del limo producido por microbios bacterianos, mucosa que forma parte de la biopelícula por ejemplo mucosa producida por las células a las cuales los microbios de la biopelícula se adhieren, y bacterias de biopelícula.

- 45 El dispersante puede ser un agente mucolítico. El agente mucolítico puede ser una enzima, por ejemplo una ADNasa, alginasa, proteasa o carbohidrasa. Alternativamente el agente mucolítico puede ser una molécula pequeña por ejemplo una amina tal como un aminotiol o un ácido tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La amina puede ser

seleccionada de acetilcisteína y cisteína, preferiblemente cisteína.

El segundo agente antibiopelícula puede ser un agente antibacteriano. El agente antibacteriano puede ser un agente mucolítico por ejemplo un agente mucolítico que tiene actividad tanto mucolítica como antibacteriana. Preferiblemente el agente antibacteriano es cisteína.

5 Producto farmacéutico

Los agentes activos antes mencionados pueden ser administrados como combinaciones libres o fijas. Las combinaciones libres pueden proveerse como paquetes de combinación que contienen todos los agentes activos en combinaciones libres. Las combinaciones fijas son frecuentemente tabletas o cápsulas.

10 Los agentes de la invención pueden ser administrados en la forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser sintetizadas a partir del compuesto original el cual contiene una unidad estructural básica o ácida por métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden ser preparadas haciendo reaccionar las formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales adecuadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., US, 1985, p. 1418, cuya divulgación se incorpora aquí como referencia; véase también Stahl et al, Eds, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta and Wiley-VCH, 2002. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea aquí para hacer referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico serio, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, como puede ser el caso, un animal sin una respuesta de toxicidad, irritación, alérgica excesiva, u otros problemas o complicaciones, concordante con una relación beneficio/riesgo razonable.

25 La invención incluye así sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos divulgados en donde el compuesto original es modificado haciendo sales ácidas o básicas del mismo por ejemplo las sales convencionales no tóxicas o las sales de amonio cuaternarias que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases inorgánicos u orgánicos. Ejemplos de tales sales de adición ácidas incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, canforato, camforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfonato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato y undecanoato. Sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como arginina, lisina y así sucesivamente. También, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden ser cuaternizados con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruro, bromuro y yoduro de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como dimetilo, dietilo, dibutilo; y sulfatos de diamilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros.

Los productos de la divulgación que comprenden la invención

40 De acuerdo con un caso, el agente antibiótico del producto de la presente invención no comprende péptidos. De forma adecuada, el producto de la presente invención no comprende péptidos.

Un producto preferido comprende un antibiótico no peptídico y un dispersante, en particular un dispersante mucolítico tal como cisteína.

45 La relación del agente antibiótico al segundo agente en los productos de la invención puede ser de 1:10 a 10:1; en general al menos 2:1 por ejemplo al menos 3:1 o 4:1. Alternativamente, la relación del agente antibiótico al segundo agente en los productos de la invención puede ser de 1:100 a 1:2000, por ejemplo de 1:500 a 1:1000. De acuerdo con una realización, la relación del agente antibiótico al segundo agente es aproximadamente 1:1. Preferiblemente el primer agente antibiótico es un antibiótico no peptídico y el segundo agente es cisteína y el producto contiene estos componentes en una relación de 2:1 hasta 4:1. De acuerdo con una realización adicional la relación puede ser aproximadamente 1:1.

50 Los agentes activos pueden ser administrados simultáneamente, secuencialmente o separadamente. Los agentes activos pueden ser provistos como un paquete de combinación. El paquete de combinación puede contener el producto de la invención junto con instrucciones para administración simultánea, separada o secuencial de cada uno de los agentes activos. Para administración secuencial, los agentes activos pueden ser administrados en cualquier orden.

Los agentes activos del producto de la invención pueden proveerse como composiciones farmacéuticas que contienen adicionalmente uno o más diluyentes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Esto se aplica a combinaciones tanto fijas como libres.

5 Los agentes activos de la presente invención pueden ser administrados por cualquier ruta adecuada conocida por los experimentados en el arte, preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica adaptada a tal ruta, y en una dosis efectiva para el tratamiento previsto. Los compuestos activos y la composición pueden ser administrados, por ejemplo, por vía parenteral, oral, intranasal, intrabronquial, entérica, transdérmica, sublingual, rectal, vaginal, ocular o tópica. Se contemplan administración tanto local como sistémica.

10 Para los propósitos de administración parenteral ("parenteral" tal como se utiliza aquí, se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, entérica, intraperitoneal, intraesternón, subcutánea e intraarticular de las cuales las soluciones intravenosas (incluyendo la administración intravenosa continua) es la más preferida), pueden emplearse soluciones en propilen glicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las correspondientes sales solubles en agua. Tales soluciones acuosas pueden ser reguladas adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido puede hacerse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para propósitos de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los medios acuosos estériles empleados son obtenibles fácilmente por técnicas estándar bien conocida para los experimentados en el arte.

20 Los productos de la invención también pueden ser administrados por vía intranasal o por inhalación y son suministrados convenientemente en la forma de un inhalador de polvo seco o en una forma de presentación de aspersión en aerosol desde un contenedor presurizado, bomba, aspersor, atomizador, nebulizador, con o sin el uso de un propulente adecuado.

25 Alternativamente los productos de la invención pueden ser administrados en la forma de un supositorio o un pesario, o pueden ser aplicados tópicamente en la forma de un gel, hidrogel, loción, solución, crema, ungüento o polvo. Los productos de la invención pueden ser administrados por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel, apósito o una inyección subcutánea. También pueden ser administrados por rutas pulmonares o rectales.

30 Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en la forma de: por ejemplo, una tableta, una cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se hace preferiblemente en la forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del ingrediente activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son cápsulas, tabletas, polvos, gránulos o una suspensión, con aditivos convencionales tales como lactosa; manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglomerantes tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas; con agentes de desintegración tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; y con lubricantes tales como talco o estearato de magnesio. El ingrediente activo puede ser administrado también por inyección en forma de una composición en la cual, por ejemplo, puede utilizarse solución salina, dextrosa o agua como vehículo adecuado.

35 Los productos de la invención también pueden encontrar aplicación como/en una formulación a la vez en donde el producto es formulado en un vehículo, por ejemplo, seleccionado de películas, cintas, geles, microesferas, tabletas bucales, goma de mascar, dentífricos y enjuagues bucales.

40 La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar una condición de enfermedad con los compuestos y/o composiciones de esta invención depende de una variedad de factores, incluyendo la edad, peso, sexo y condición médica del sujeto, la severidad de la enfermedad, la ruta y frecuencia de administración, y el compuesto particular empleado, así como las propiedades farmacocinéticas del individuo tratado, y así puede variar ampliamente. La dosificación será generalmente inferior si los compuestos se administran localmente en vez de por vía sistémica, y para prevención más que para tratamiento. Tales tratamientos pueden ser administrados tan frecuentemente como sea necesario y durante el período de tiempo juzgado como necesario por el médico tratante. Una persona de experiencia en el arte entenderá que el régimen de dosificación o la cantidad terapéuticamente efectiva del inhibidor que se va a administrar puede necesitar optimización para cada individuo. Las composiciones farmacéuticas pueden contener ingrediente activo en el rango de aproximadamente 0.1 a 2000 mg, preferiblemente en el rango de aproximadamente 0.5 a 500 mg y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 200 mg. Una dosis diaria de aproximadamente 0.01 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal y lo más preferible desde aproximadamente 1 a 20 mg/kg de peso corporal puede ser apropiada. La dosis diaria puede ser administrada en una a cuatro dosis por día.

55 Los productos de la invención se administran preferiblemente al tracto respiratorio. Así, la presente invención también provee formulaciones farmacéuticas en aerosol que comprenden un producto de la invención. También se provee un nebulizador o inhalador que contienen un producto de la invención.

Adicionalmente, los productos de la invención pueden ser adecuados para formulación como formas de dosificación de liberación sostenida y similares. Las formulaciones también pueden estar constituidas de tal forma que liberen los agentes activos, por ejemplo, en una parte particular del tracto intestinal o respiratorio, posiblemente durante un período de tiempo. Pueden hacerse recubrimientos, envolturas y matrices protectoras, por ejemplo, a partir de sustancias poliméricas, tales como poliláctido-glicolatos, liposomas, microemulsiones, micropartículas, nanopartículas o ceras. Estos recubrimientos, envolturas y matrices protectoras son útiles para recubrir dispositivos permanentes, por ejemplo, cánulas intraluminales, catéteres, tuberías para diálisis peritoneal, dispositivos de drenajes y similares.

Los productos de la invención pueden incluir cantidades sinérgicamente efectivas de cada agente activo definido aquí. La invención incluye por lo tanto productos que comprenden una cantidad sinérgicamente efectiva de (i) un agente antibiótico (el cual puede ser un agente antibiótico no peptídico) (ii) un segundo agente el cual es típicamente cisteamina. El producto puede ser para uso en la manufactura de un medicamento para administración simultánea, separada o secuencial de dichos agentes en el tratamiento de una infección microbiana por ejemplo una infección bacteriana. “De forma sinérgica”, tal como se utiliza aquí, puede describir la acción de los dos o más agentes del producto de la invención trabajando juntos para producir un efecto superior al efecto combinado esperado de los agentes usados separadamente.

En un aspecto adicional de la invención se provee un sustrato al cual se aplica o une un producto de la invención. Preferiblemente el sustrato es adecuado para aplicación a heridas o administración a sitios de heridas. Preferiblemente, el sustrato permite la transferencia de los agentes activos del producto de la invención desde el sustrato hasta un lecho de una herida para alcanzar su efecto antibacteriano. El sustrato puede ser un vendaje, por ejemplo, un vendaje de una herida. El vendaje puede comprender un material textil o puede ser un material similar a colágeno. El sustrato puede estar en cualquier forma adecuada para aplicación a una herida, típicamente el sustrato puede estar en la forma de un hidrogel, coloide, ungüento, crema, gel, espuma o aspersión.

Los productos de la invención también pueden encontrar aplicación como/en un desinfectante o biocida. En este contexto, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser aplicadas, bien sea solas o en combinación con otros agentes desinfectantes, a una superficie que va a ser tratada. Tal como se utiliza aquí, una “superficie que va a ser tratada” puede ser un sustrato tal como se define aquí y puede incluir dispositivos médicos y dispositivos permanentes, por ejemplo, cánulas intraluminales, catéteres, tubos para diálisis peritoneal, dispositivos de drenaje, prótesis para articulaciones, implantes dentales y similares.

Métodos y uso

La invención provee el tratamiento o prevención de una infección bacteriana. La infección bacteriana puede ser típicamente una infección diseminada o en un ambiente en particular rico en mucosa, tal como los pulmones, por ejemplo, el pulmón de un paciente que sufre de CF o enfermedad pulmonar obstructiva crónica asociada bacterianamente (COPD). El tratamiento de la presente invención comprende la etapa de administrar al ambiente un producto de acuerdo con la invención. El tratamiento puede ser *in vivo*.

En ambientes ricos en mucosas los antibióticos convencionales tales como tobramicina, colistina, gentamicina o ciprofloxacina no exhiben el mismo nivel de actividad antibacteriana como sucede cuando están en ambientes bajos en mucosas. Sorprendentemente, la actividad antibacteriana de los antibióticos se incrementa por administración de un agente dispersante o antiadhesivo tal como cisteamina.

Ventajosamente el tratamiento comprende la etapa de administrar de acuerdo con la reivindicación 1

- Un agente antibiótico; y
- Un segundo agente que es un dispersante, esto es, cisteamina.

Cuando el compuesto de la presente invención se utiliza para tratar infecciones bacterianas asociadas con CF, el agente antibiótico es tobramicina, colistina, gentamicina o ciprofloxacina.

El ambiente puede comprender cualquier infección bacteriana, incluyendo una infección causada por más de un microorganismo, por ejemplo bacterias y cualquier tipo de hongos, levadura, virus y protozoos.

La bacteria puede ser una bacteria gram-positiva o gram-negativa. Un patógeno bacteriano puede ser derivado de una especie bacteriana seleccionada del grupo consistente de *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus spp.*, por ejemplo, *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes*; *Listeria spp.*; *Pseu domonas spp.*; *Mycobacterium spp.*, e.g. *Mycobacterium tuberculosis*; *Enterobacter spp.*; *Campylobacter spp.*; *Salmonella spp.*; *Streptococcus spp.*, e.g. *Streptococcus Group A or B*, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter spp.*, e.g. *Helicobacter pylori*; *Neisseria spp.*, e.g. *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*; *Shigella spp.*, e.g. *Shigella flexneri*; *Escherichia coli*; *Haemophilus spp.*, e.g. *Haemophilus influenzae*; *Chlamydia spp.*, e.g. *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Francisella tularensis*; *Bacillus spp.*, e.g.

Bacillus anthracis; *Clostridia* spp., e.g. *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp., e.g. *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; e.g. *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei*.

5 En particular la bacteria puede incluir *Pseudomonas* spp., por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., por ejemplo *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; *Haemophilus* spp., por ejemplo *Haemophilus influenzae*; *Burkholderia* spp., por ejemplo *Burkholderia cepacia*; *Streptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., por ejemplo *Propionibacterium acnes*. Preferiblemente la bacteria se selecciona de *Pseudomonas* spp., por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus* spp., por ejemplo *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

10 El compuesto de la invención puede ser utilizado para minimizar y, preferiblemente, prevenir la formación de colonias bacterianas, en particular biopelículas bacterianas en una variedad de ambientes que incluyen, pero no se limitan a, doméstico, sitios de trabajo, laboratorio, ambientes industriales, ambientes acuáticos (por ejemplo sistemas de tubería), dispositivos médicos incluyendo dispositivos permanentes tal como se definen aquí, dispositivos dentales o implantes dentales, cuerpos de animales por ejemplo cuerpos humanos.

El compuesto de la invención puede ser utilizado así en la boca para evitar la formación de placas o caries sobre un diente humano o implante dental por ejemplo una dentadura.

15 El compuesto de la invención puede ser utilizado para evitar o restringir la formación de una colonia bacteriana. El método de la presente invención puede ser utilizado para evitar o tratar infecciones bacterianas incluyendo infecciones tóxicas, infecciones orales e infecciones sistémicas. Las infecciones tóxicas pueden incluir heridas, úlceras y lesiones por ejemplo, heridas cutáneas tales como cortes o quemaduras, y condiciones asociadas con las mismas.

Las infecciones orales pueden incluir gingivitis, periodontitis y mucositis.

20 Las infecciones sistémicas pueden incluir fibrosis quística, COPD y otras condiciones asociadas con infecciones de las mucosas, por ejemplo, infecciones gastrointestinales, urogenitales u otras respiratorias.

Otro aspecto de la invención reside en la creación, prevención o retardo de la progresión de una infección bacteriana en un mamífero, especialmente un humano, administrando una cantidad terapéuticamente efectiva de un producto de la invención al mamífero.

25 Por una cantidad "efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de una o más sustancias activas, dentro del alcance de un juicio médico serio, suficiente para proveer un efecto deseado sin respuesta de toxicidad, irritación o alérgica excesiva, u otros problemas o complicaciones, conmensurada con una relación beneficio/riesgo razonable.

30 Así el producto de la invención puede ser útil en la prevención de, retardo de la progresión de, o tratamiento de una enfermedad o condición seleccionada del grupo consistente de infecciones de piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares (incluyendo contaminación de lentes de contacto), endocarditis, infecciones en fibrosis quística e infecciones de dispositivos médicos permanentes tales como los descritos aquí.

35 La invención también incluye tratamientos en los cuales un producto de la invención se administra a un mamífero junto con uno o más otros agentes antibacterianos por ejemplo un antibiótico. En general el producto de la invención, y cualquier composición de la presente invención no comprende ningún péptido.

40 Los agentes activos mencionados en esta especificación pueden existir en formas diferentes, tales como ácidos libres, bases libres, ésteres y otros profármacos, sales y tautómeros, por ejemplo, y la invención incluye todas las formas variables de los agentes.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera otra cosa. En particular, cuando se utiliza el artículo indefinido, se entiende que la especificación contempla pluralidad así como singularidad, a menos que el contexto requiera otra cosa.

45 Cifras, enteros, características, compuestos, unidades estructurales o grupos químicos descritos en conjunción con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención se entienden como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito aquí al menos que sean incompatibles con los mismos.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprende" y "contiene" y variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende" significan "incluyendo pero no limitándose a", y no pretenden (y no lo hacen) excluir otras unidades estructurales, aditivos, componentes, enteros o etapas.

En general el término “aproximadamente” se entiende por abarcar un rango de 10% o menos de cualquier valor numérico al cual se aplica.

La invención será descrita ahora a manera de Ejemplos solamente con referencia a las siguientes figuras en las cuales:

5 Las figuras 1a y 1b: proveen una comparación de la actividad antibacteriana de la tobramicina y cisteamina (NM001) contra células planctónicas de *Pseudomonas* cuando se administran separadamente, y en forma combinada. NM001 reduce la MIC de la tobramicina contra células planctónicas en al menos 4 veces (figura 1b).

La figura 2: provee una comparación de la actividad antibacteriana de la tobramicina y ciprofloxacina contra células de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en un ambiente mucoso replicando lo encontrado dentro del pulmón CF cuando se administran solas y en combinación con cisteamina.

10 La figura 3: provee una comparación de la actividad de la tobramicina sola y cuando está en combinación con cisteamina (NM001) contra células de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en un ambiente no mucoso y cuando se cultivan en un ambiente mucoso que replican el encontrado en pulmones CF (en la presencia de NaCl y/o mucina). La NM001 restaura la actividad antibiótica de los antibióticos convencionales en un ambiente mucoso.

15 La figura 4: muestra un histograma que compara la actividad antibiopelícula de la cisteamina sola y en combinación con tobramicina contra una biopelícula establecida de *P. aeruginosa* PAO1: un estudio de respuesta a la dosis permitió la identificación de la concentración de erradicación mínima de la biopelícula (MBEC) de cisteamina contra biopelículas establecidas de *P. aeruginosa* PAO1 y la cuantificación de la actividad aditiva con tobramicina. El MBEC de la cisteamina sola fue de 1000 µg/ml y la tobramicina mostró un MBEC de 4 µg/ml. Cuando se combinaron, sin embargo, se obtuvo una erradicación total de la biopelícula con 500 µg/ml de cisteamina y 1 µg/ml de tobramicina. Por lo tanto, la concentración inhibitoria fraccionada (FIC) de tal combinación es de 0.75, lo que indica aditividad entre los dos agentes antimicrobianos. Por lo tanto, el mucolítico/agente antimicrobiano cisteamina tiene el potencial de mejorar la actividad antibiopelícula de los antibióticos convencionales, lo que puede tener implicaciones en la disminución de la propagación de la resistencia antimicrobiana y costes de tratamiento.

25 La figura 5: muestra una gráfica del efecto post-antimicrobiano de cisteamina (NM001) en combinación con tobramicina (TOB) versus biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1.

La figura 6: muestra una gráfica que demuestra que la cisteamina (NM001) mejora la actividad antimicrobiana de la tobramicina contra la *Burkholderia cepacia* resistente a multifármacos NCTC10743. La actividad antimicrobiana aditiva de la cisteamina y la tobramicina también fue identificada contra la cepa resistente a fármacos múltiples *Burkholderia cepacia* NCTC10743. La MIC₁₀₀ de la tobramicina fue superior a 16 µg/ml mientras que la cisteamina mostró una MIC₁₀₀ a 500 µg/ml. Cuando se combinaron entre sí, la cisteamina fue capaz de potenciar la actividad de la tobramicina y su MIC₁₀₀ fue de 0.25 µg/ml en combinación con 250 µg/ml de cisteamina. Esto lleva a un FIC de menos de 0.51, lo cual indica al menos una actividad antimicrobiana aditiva y posible sinergia entre estos dos compuestos.

35 La figura 7: muestra un histograma que demuestra la actividad antimicrobiana de la tobramicina y la cisteamina contra células de *P. aeruginosa* PAO1 planctónicas solas y en combinación en concentraciones fisiológicamente relevantes tal como se encuentra en los pulmones de pacientes con fibrosis quística (CF). La actividad antimicrobiana (MIC₁₀₀) de la cisteamina fue comparada en condiciones normales (tal como se describe en el método CLSI M7-A7 – véase Apéndice 1) y en presencia de cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, cloruro de calcio (CaCl₂) 1.7 mM, ADN 1 mg/ml o mucina gástrica porcina al 1% (p/v) en triplicado, en placas de 96 pozos. El crecimiento bacteriano fue seguido durante un período de 24 horas y se leyó la absorbancia utilizando un lector de placas de microtitulación BioTek a 625 nm. La inhibición del crecimiento bacteriano total fue retenida en la presencia de NaCl, CaCl₂ o ADN y dos veces el MIC₁₀₀ normal en la presencia de mucina. La actividad de la tobramicina fue inhibida en la presencia del catión divalente Ca²⁺ y en la presencia del polímero aniónico ADN. Cuando se combinó con la cisteamina, la actividad de la tobramicina se retuvo en todas las condiciones probadas a concentraciones hasta 4 veces superiores a su MIC normal.

45 La figura 8: es un histograma que muestra la actividad mucolítica de la cisteamina versus otros destructores del enlace disulfuro y agentes mucolíticos. La actividad mucolítica de la cisteamina fue comparada con otros agentes mucolíticos tales como N-acetilcisteína (Mucomyst®), ADNasa I (Dornase Alfa®), alginato liasa y clorhidrato de cisteamina midiendo la viscosidad de una solución de mucina después del tratamiento. La mucina de estómago porcino (Sigma-Aldrich, Gillingham, Reino Unido) fue preparada en agua estéril purificada a 20% (p/v). Los agentes mucolíticos fueron preparados a 10 mg/ml en solución de mucina al 20% (p/v). La velocidad de la mucina fue medida después de aproximadamente 5 minutos de exposición a los agentes mucolíticos. Los datos muestran los valores promedio y de desviación estándar de experimentos duplicados independientes.

50 La figura 9: es una gráfica que muestra el efecto post-antimicrobiano de cisteamina (NM001) en combinación con tobramicina versus biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1. Esto muestra la actividad antibiopelícula de la cisteamina en combinación con tobramicina a dos concentraciones diferentes, mientras que el efecto post-antimicrobiano (PAE) de

estos compuestos también se determinó siguiendo el crecimiento bacteriano después del tratamiento de las biopelículas.

- 5 La figura 10: muestra una gráfica que demuestra la inhibición de la actividad metabólica microbiana de las biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 después del tratamiento con cisteamina (NM001) en combinación con tobramicina. Esto permite la actividad metabólica de las biopelículas después del tratamiento. Los datos demuestran la actividad antibiopelícula de la cisteamina, sola y en combinación con tobramicina, con un PAE significativo tal como fue demostrado por el crecimiento bacteriano retardado y la actividad metabólica reducida de la biopelícula.

Ejemplos

Actividad de agentes antimicrobianos contra colonias bacterianas

10 Materiales y métodos

1.1 Cepas bacterianas

Se utilizaron en este estudio *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 y *Burkholderia cepacia* NCTC10743. Se utilizaron cepas adicionales de *Pseudomonas aeruginosa* como se muestra en las Tablas 1 y 2.

1.2 Preparación de compuestos antimicrobianos

- 15 Los compuestos antimicrobianos probados en este estudio fueron cisteamina (NM001), tobramicina, ciprofloxacina, colistina y gentamicina. Los agentes fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido) y las soluciones de reserva fueron preparadas a 20 mg/ml en agua pura de 14-18 MΩ.cm (sistema de purificación de agua Purite HP40, Oxon, Reino Unido). Una vez disueltas, las preparaciones fueron esterilizadas por filtración utilizando filtros de 0.22 μm (Millipore, Watford, Inglaterra) y se almacenaron a -20°C.

20 1.3 Preparación del inóculo bacteriano

El inóculo bacteriano fue establecido por el método de dilución a partir de cultivos de crecimiento activo en caldo de Mueller-Hinton (MH), estandarizados con estándar de turbidez de 0.5 McFarland tal como se describe en el método M26-A de CLSI.

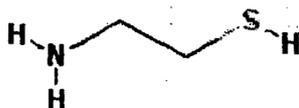
1.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC)

- 25 Tanto el inóculo bacteriano como los agentes antimicrobianos, incluyendo los compuestos estructuralmente relacionados con la cisteamina, fueron agregados simultáneamente a las placas. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y se leyó la densidad óptica a 625 nm sobre un lector de placas de microtitulación (BioTek Powerwave XS, Winooski, Estados Unidos). La MIC fue obtenida como la concentración más baja de antimicrobiano que muestra una inhibición total del crecimiento bacteriano.

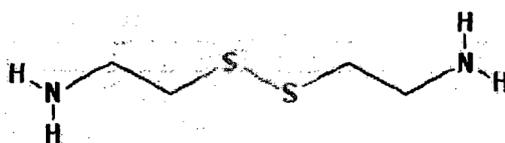
30 Eficacia antimicrobiana de derivados de cisteamina versus *P. aeruginosa*

Se examinó un cierto número de compuestos relacionados en estructura química con la cisteamina en cuanto a su actividad antimicrobiana; la cistamina (sal de diclorhidrato), taurina y ácido 2,3-dimercaptosuccínico. Se conocen otros compuestos químicamente relacionados con la cisteamina, pero son tóxicos, y por lo tanto no tienen utilidad como un fármaco de esta naturaleza.

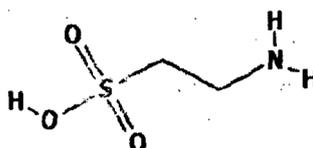
35 Cisteamina:



Cistamina:

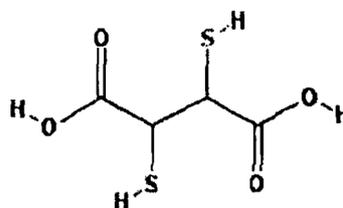


Taurina:



5

Ácido 2,3-dimercaptosuccínico:



1.5 Determinación de la MIC en concentraciones iónicas fisiológicamente relevantes

10 Se utilizó un método similar como el descrito más arriba (1.4) para la determinación de la actividad antimicrobiana de la cisteamina (Lynovex®) en la presencia de altas concentraciones iónicas. La actividad antimicrobiana (MIC₁₀₀) de la cisteamina fue comparada en condiciones normales (como se describe en el método CLSI M7-A7) y en presencia de cloruro de sodio (NaCl) 150 mM, cloruro de calcio (CaCl₂) 1.7 mM, 1 mg/ml de ADN o 1% (p/v) de mucina gástrica porcina en triplicado, en placas de 96 pozos. El crecimiento bacteriano fue seguido después de un período de 24 horas y la absorbancia fue leída utilizando un lector de placas de microtitulación BioTek a 625 nm.

15 1.6 Determinación de la actividad antibiopelícula

20 La actividad antibiopelícula fue establecida utilizando un sistema de celda de flujo de microflujo BioFlux 800 (FluXión, South San Francisco, Estados Unidos). Los canales de microflujo de una placa BioFlux de 48 pozos fueron inoculados con un inóculo equivalente a 0.5 McFarland de *P. aeruginosa* PAO1 en caldo Mueller-Hinton. Las células microbianas se dejaron unir y comenzar la formación de microcolonias durante aproximadamente 30 minutos a 37°C. Los agentes mucolíticos fueron preparados a 1 mg/ml en caldo Mueller-Hinton y se hicieron fluir a través de los microfluidos a una tasa de flujo de 0.5 Dyn/cm² (equivalente a 53 µl/hora durante 16 horas a 37°C. Se llevaron a cabo observaciones microscópicas y se registraron imágenes utilizando un microscopio invertido Axiovert 40 con una magnificación de 100 veces (Carl Zeiss, Welwyn Garden City, Reino Unido).

1.7 Determinación de la concentración inhibidora fraccionada (FIC)

25 La FIC corresponde a un coeficiente de interacción que indica si la combinación de un agente antimicrobiano es sinérgica, aditiva, antagonista o neutra. La FIC se determina comparando la actividad de un agente en combinación (MIC de agente A + agente B) con la actividad del agente solo (MIC de agente A o agente B) como sigue (Singh et al., 2000):

$$FIM = MIC_{A \text{ [combinación]}} / MIC_{A \text{ [solo]}} + MIC_{B \text{ [combinación]}} / MIC_{B \text{ [solo]}}$$

30 Las combinaciones aditivas de dos agentes antimicrobianos son indicadas por un índice FIC de 1, mientras que un índice de FIC <1 indica combinaciones sinérgicas. Las combinaciones neutras darían una FIC entre 1 y 4, un índice de FIC superior a 4 indica efectos antagonistas entre los dos agentes antimicrobianos.

La FIC también fue calculada para establecer la interacción de dos agentes antimicrobianos en combinación contra muestras bacteriana.

1.8 Determinación del efecto post-antimicrobiano (PAE) y la actividad metabólica

5 El PAE fue determinado por transferencia de 10 µl de cultivos de biopelícula en 90 µl de caldo MH estéril en triplicado en placas de microtitulación después del tratamiento. El crecimiento bacteriano fue seguido en un lector de placas BioTek durante 24 horas a 37°C. La actividad metabólica microbiana después del tratamiento de las biopelículas fue determinado utilizando el mismo método para la determinación de PAE y agregando 10% (v/v) de un indicador de viabilidad celular fluorescente, resazurina (Alamar Blue, Serotec), el cual detecta crecimiento de la actividad metabólica microbiana por incremento en la fluorescencia. La fluorescencia fue medida durante 24 horas a 37°C utilizando un lector de microplacas BioTek Synergy HT (BioTek, Winooski, Estados Unidos) a 530/590 nm.

1.9 Determinación de la actividad mucolítica

10 La actividad mucolítica de la cisteamina fue comparada con otros agentes mucolíticos tales como N-acetilcisteína (Mucomyst®), ADNasa I (Dornase Alfa®), alginato liasa y clorhidrato de cisteamina midiendo la viscosidad de una solución de mucina después del tratamiento. La mucina del estómago porcino (Sigma-Aldrich, Gillingham, Reino Unido) fue preparada en agua purificada estéril a 20% (p/v). Los agentes mucolíticos fueron preparados a 10 mg/ml en solución de mucina al 20% (p/v). La velocidad de la mucina fue medida después de aproximadamente 5 minutos de exposición a los agentes mucolíticos.

2. Resultados

2.1 Prevención y tratamiento de la colonización bacteriana

El rango de concentraciones de agentes antimicrobianos fue de 0-10 µg/ml.

2.1.1 Actividad contra *P. aeruginosa* ATCC 27853

20 La MIC de tobramicina y ciprofloxacina fue reducida grandemente por administración con cisteamina en comparación con la administración en solitario. Este efecto fue exhibido en ambientes que imitan los encontrados en un pulmón CF.

25 La determinación de la FIC para esta combinación indica que los agentes antimicrobianos tienen efectos sinérgicos (FIC = 0.75). Los agentes antimicrobianos de la presente invención actúan sinérgicamente para proveer un efecto antibacteriano potenciado. El efecto antimicrobiano de antibióticos convencionales tales como tobramicina y ciprofloxacina se mantuvo cuando fueron administrados en combinación con cisteamina a un ambiente mucolítico.

2.2 Tabla 1: Índice de concentración inhibidora fraccionada de combinaciones de cisteamina, clorhidrato de cisteamina y N-acetilcisteína y los antibióticos convencionales colistina, ciprofloxacina, tobramicina y gentamicina versus aislados seleccionados de *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 1:

30 Cisteamina (NM001)

Cepa	Resistencia a antibiótico	NM001 FICI (Sinergia)				NM001 FICI (Aditivo)			
		Col	Cip	Tob	Gent	Col	Cip	Tob	Gent
		0.38		0.31		0.53			0.5
Pa01	Col ^R	0.31	N	0.28	0.38		N	0.63	0.53
		0.25		0.25		0.56			0.63
						0.53	0.75	0.56	0.63
Pa14	Col ^R	0.38	N	N	N	0.5		0.75	0.5
						0.56	0.63	0.5	0.75
								0.52	

ES 2 565 564 T3

						0.75		0.56	
Pa058	Col ^R , Cip ^R Tob ^R	N	N	N	N	0.53	0.53	0.5	0.56
						0.56	0.56	0.53	0.5
						0.5		0.63	0.75
								0.75	
						0.52		0.63	0.5
Pa57388A	Col ^R	0.38	N	0.31	0.38	0.51	0.63	0.75	0.56
		0.31		0.38		0.63		0.5	
						0.56		0.56	0.75
				0.38		0.62	0.53	0.56	0.5
						0.53	0.56	0.51	0.63
Pa57388D	Col ^R , Gent ^R	0.31	N	0.31	0.38	0.56	0.52		
		0.38		0.25		0.5	0.75	0.52	0.51

Clorhidrato de cisteamina (Cist HCL)

Cepa	Resistencia a antibióticos	Cist HCl FICI (Sinergia)				Cist HCl FICI (Aditivo)			
		Col	Cip	Tob	Gent	Col	Cip	Tob	Gent
		0.125		0.25					
		0.14		0.31		0.5	0.75	0.51	0.75
Pa01	Col ^R	0.28	N	0.38	N	0.5	0.52	0.53	0.5
		0.26		0.28			0.56	0.5	
				0.19					
		0.125	0.31			0.51	0.56		
		0.28	0.37		N	0.5	0.63	0.63	0.5
Pa14	Col ^R	0.19		N		0.53		0.75	0.63
		0.09	0.38			0.52	0.5	0.5	0.56
						0.52	0.53		
Pa058	Col ^R , Cip ^R Tob ^R	0.38	N	N/A	N	0.75	0.63	N/A	0.75

ES 2 565 564 T3

						0.56	0.75		
						0.5	0.56		
		0.25				0.53	0.53		
		0.31	0.19			0.52	0.5	0.63	
Pa57388A	Col ^R	0.19	0.25	N	N	0.5	0.63	0.75	0.63
		0.26					0.56		
							0.75		
		0.19	0.31	0.25					
		0.28	0.38	0.31	N	0.52	0.56	0.51	0.53
Pa57388D	Col ^R , Gent ^R	0.25		0.19		0.53	0.53	0.5	0.52
		0.31							

N-acetil cisteína (NAC)		NAC FICI (Sinergia)				NAC FICI (Aditivo)			
Cepa	Resistencia a antibiótico	Col	Cip	Tob	Gent	Col	Cip	Tob	Gent
								0.53	
							0.56	0.52	
Pa01	Col ^R	N/A	N	N	N	N/A	0.75	0.5	N
								0.56	
						0.5	0.56	0.63	
Pa14	Col ^R	N	N	N	N	0.75	0.75	0.5	0.51
								0.75	0.52
							0.56	0.75	
Pa058	Col ^R Cip ^R Tob ^R	N	N	N	N	0.53	0.75	0.53	0.53
								0.51	
						0.56	0.63		
Pa57388A	Col ^R	N	N	N	N	0.75	0.5	0.53	0.63
						0.52	0.56		

						0.56			
				0.25		0.75			
Pa57388D	Col ^R Gent ^R	N	N	0.31	N	0.53	0.53	0.56	N
						0.5	0.75	0.63	
						0.51			

2.3 Tabla 2: Eficacia antimicrobiana de cisteamina y compuestos estructuralmente relacionados versus aislados seleccionados clínicamente relevantes de *Pseudomonas aeruginosa*

Cisteamina

Cepa	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	250-500	500	666.67
Pa14	125-250	500	1333.33
Pa058	500	1000	1000
NH57388A	250	250-500	666.67

5

Cistamina

cepa	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	250-1000	1000-2000	2000
Pa14	125-250	1000-2000	2000
Pa058	250-500	1000-2000	2000
NH57388A	500-1000	1000-2000	2000

Taurina

Cepa	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	>2000	>2000	>2000
Pa14	>2000	>2000	>2000
Pa058	>2000	>2000	>2000
NH57388A	>2000	>2000	>2000

Ácido 2.3-dimercaptosuccínico

Cepa	MIC (µg/ml)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC ₁₀₀
Pa01	1000-2000	>2000	>2000
Pa14	1000-2000	1000-2000	>2000
Pa058	500-2000	1000-2000	2000
NH57388A	500-2000	1000-2000	2000

5 En todos los casos, la cisteamina demostró eficacia antimicrobiana mayor que los compuestos relacionados, indicando la naturaleza esencial de los grupos sulfhidrilo y amina para actividad antimicrobiana significativa.

REIVINDICACIONES

1. Un producto que comprende una cantidad sinérgicamente efectiva de un agente antibiótico y un segundo agente que es un dispersante; en donde el antibiótico es tobramicina, colistina, gentamicina o ciprofloxacina y en donde el segundo agentes es cisteamina.
- 5 2. Un producto como se reivindica en la reivindicación 1 para uso como un medicamento.
3. Un sustrato al cual se aplica o une un producto tal como se reivindica en la reivindicación 1.
4. Un sustrato como se reivindica en la reivindicación 3 en donde el sustrato es seleccionado del grupo consistente de vendajes, dispositivos médicos y dispositivos permanentes.
- 10 5. Un sustrato como se reivindica en la reivindicación 4 en donde el dispositivo permanentes es seleccionado del grupo consistente de cánulas intraluminales, catéteres, tubería para diálisis peritoneal, dispositivos de drenaje, prótesis para articulaciones e implantes dentales.
6. Una composición farmacéutica que comprende un producto como se reivindica en la reivindicación 1 y uno o más diluyentes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 15 7. Un producto como se reivindica en la reivindicación 1 para uso en el tratamiento o prevención de infección microbiana o enfermedad o condición asociada con la misma.
- 20 8. Un producto para uso como se reivindica en la reivindicación 7 en donde la infección, o enfermedad o condición asociadas con la misma, se selecciona del grupo consistente de infecciones de la piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infección del tracto urogenital, infecciones de tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares, endocarditis, infecciones en fibrosis quística e infecciones en dispositivos médicos permanentes.
9. Un producto para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 en donde la infección es de un ambiente mucolítico.
10. Un producto para uso como se reivindica en la reivindicación 9 en donde la infección es una infección bacteriana asociada con fibrosis quística.
- 25 11. Un producto para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 en donde la infección es causada por una bacteria seleccionada del grupo consistente de *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Haemophilus* spp., *Burkholderia* spp., *Streptococcus* spp. y *Propionibacterium* spp.
12. Un producto para uso como se reivindica en la reivindicación 11 en donde la bacteria es *Pseudomonas* spp.
13. Un producto para uso como se reivindica en la reivindicación 11 en donde la bacteria es *Burkholderia* spp.
- 30 14. Un producto para uso como se reivindica en la reivindicación 11 en donde la bacteria es *Staphylococcus* spp.

Fig 1a

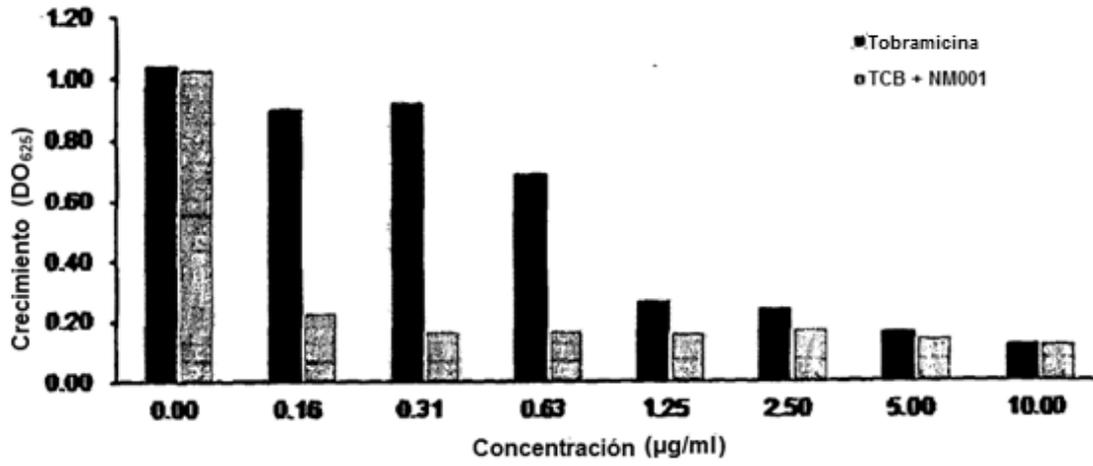


Fig 1b

	CIM en Solitario		CIM en Combinación		Índice FIC
	NM001 (µg/ml)	Tobramicina (µg/ml)	NM001 (µg/ml)	Tobramicina (µg/ml)	
PA01	500	1	250	0.25	Aditivo (0.75)

Fig 2.

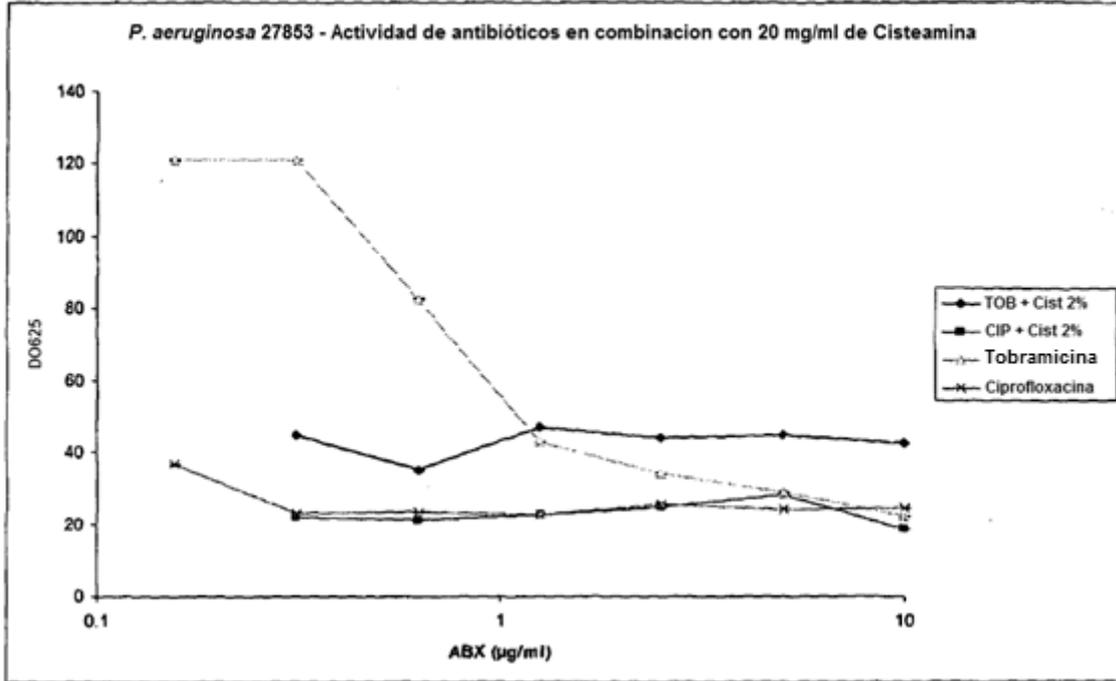


Fig 3:

PA01 - CIM (µg/ml)	Normal		Mucina		NaCl	
	En Solitario	+ NM001 (250 µg/ml)	En Solitario	+ NM001 (250 µg/ml)	En Solitario	+ NM001 (250 µg/ml)
Tobramicina	1	0.25	8	1	4	0.5

Figura 4: Actividad de Antibiopelícula de Cisteamina en Solitario y en Combinación con Tobramicina en contra de la Biopelícula Establecida de *P. aeruginosa* PAO1

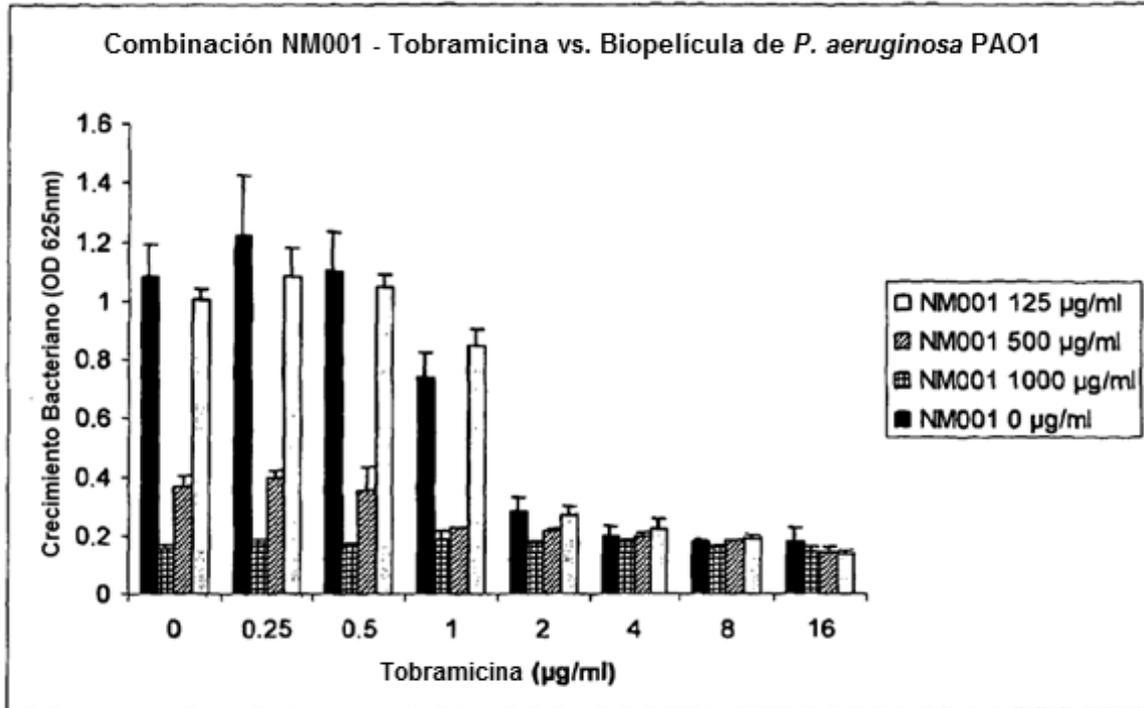


Figura 5: Efecto Post-Antimicrobiano de Cisteamina (NM001) en Combinación con Tobramicina (TOB) vs. Biopelículas de *P. aeruginosa* (PAO1)

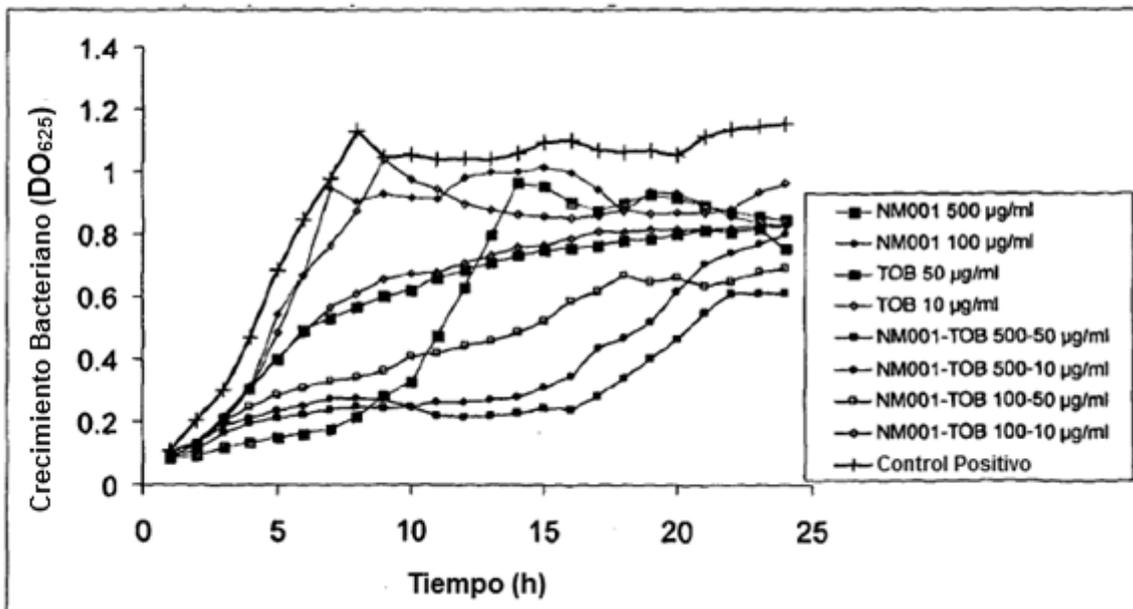


Figura 6: La Cisteamina (NM001) Mejora la Actividad Antimicrobiana de la Tobramicina en Contra de la *Burkholderia cepacia* NCT10743 Resistente al Multimedicamento

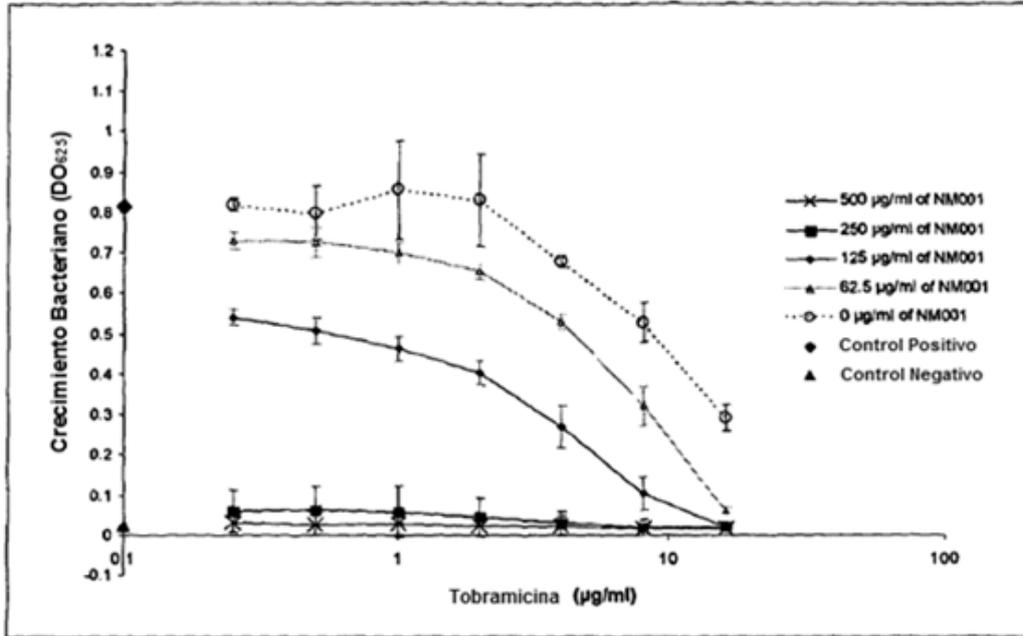


Figura 7: Actividad Antimicrobiana de Tobramicina y Lynovex® (cisteamina) en Contra de Células Planctónicas de *P. aeruginosa* PA01 en Solitario y en Combinación en Concentraciones Fisiológicamente Relevantes como se Encuentra en los Pulmones de los Pacientes CF

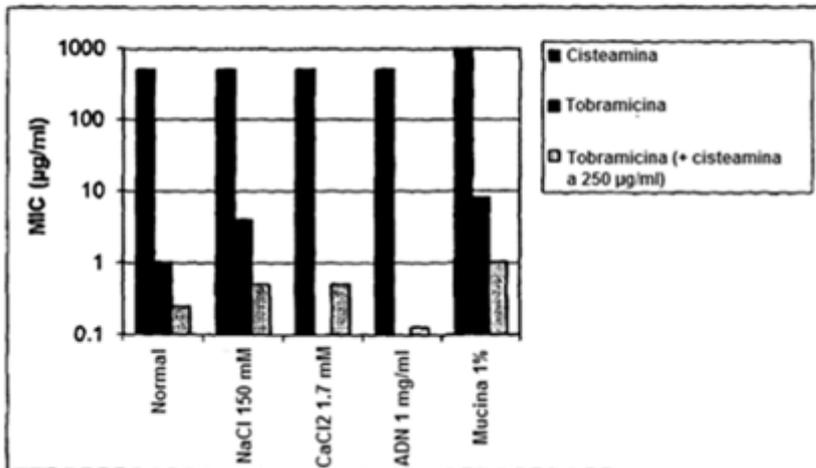


Figura 8: Actividad Mucolítica de Cisteamina vs. Otros Interruptores de Enlace de Disulfuro y Agentes Mucolíticos

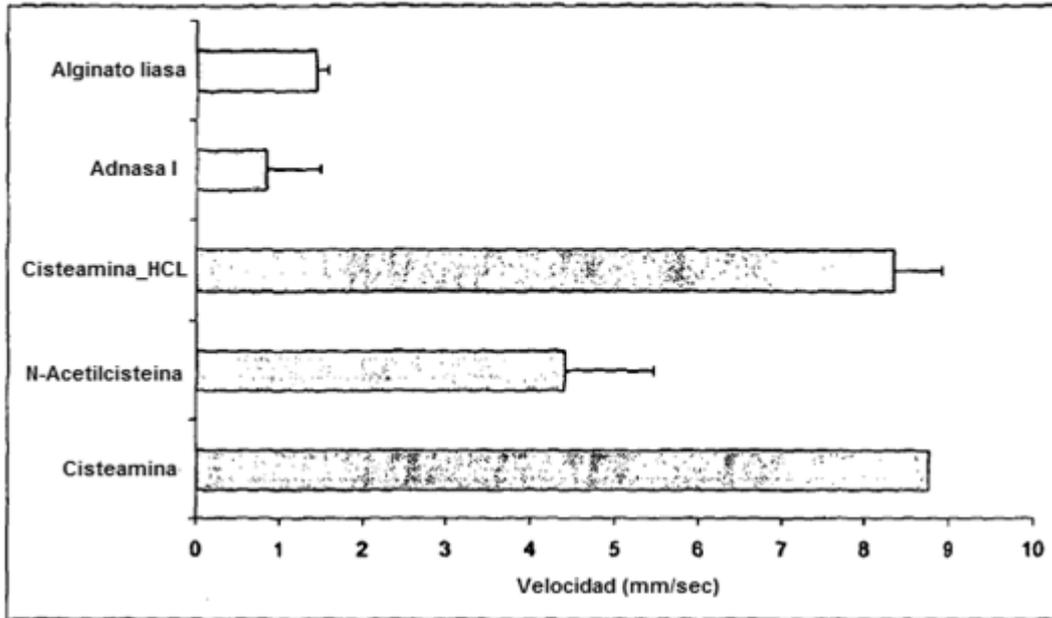


Figura 9: Efecto Post-Antimicrobiano de Cisteamina (NM001) en Combinación con Tobramicina vs. Biopelículas PA01 de *P. aeruginosa*

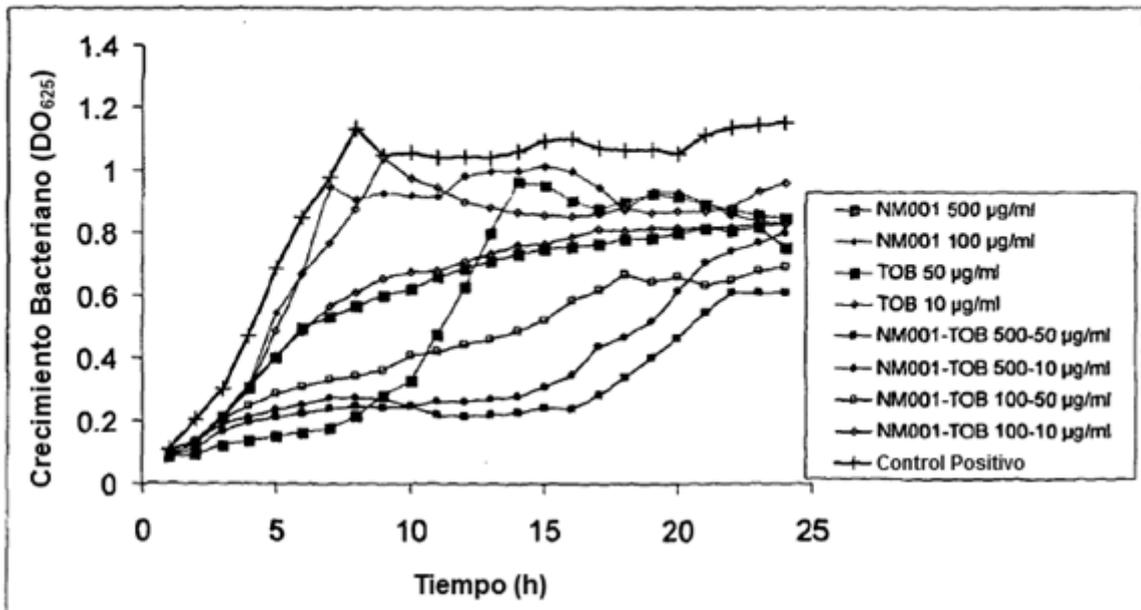


Figura 10: Inhibición de la Actividad Microbiana Metabólica de las Biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 después del Tratamiento con Cisteamina (NM001) en Combinación con Tobramicina

