

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 998**

51 Int. Cl.:

A61K 31/105 (2006.01)

A61K 31/7036 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61M 16/06 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2011 E 11799621 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2649047**

54 Título: **Composiciones y usos médicos de derivados del ajoeno**

30 Prioridad:

08.12.2010 EP 10194154

08.12.2010 US 420922 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2016

73 Titular/es:

DANMARKS TEKNISKE UNIVERSITET (100.0%)

Anker Engelundsvej 1 Bygning 101 A

2800 Lyngby, DK

72 Inventor/es:

BJARNSHOLT, THOMAS;

HØIBY, NIELS;

JENSEN, PETER ØSTRUP;

PHIPPS, RICHARD;

SHANMUGHAM, MEENAKSHI SUNDARAM;

GENNIP, MARIA VAN;

CHRISTENSEN, LOUISE DAHL;

JAKOBSEN, TIM HOLM;

TANNER, DAVID;

LARSEN, THOMAS OSTENFELD y

GIVSKOV, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 571 998 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 usos médicos de derivados del ajoeno

5 Área técnica de la invención

La presente invención se refiere a una composición de derivados del ajoeno con un antibiótico y al uso de derivados del ajoeno para el tratamiento de infecciones bacterianas por bacterias que forman una biopelícula.

10 Antecedentes de la invención

Las infecciones bacterianas son un problema creciente en todo el mundo. El uso generalizado de antibióticos convencionales ha provocado el desarrollo de cepas bacterianas cada vez más resistentes junto con un arsenal de antibióticos suficientemente eficaces que se está reduciendo drásticamente.

15 Como resultado, está aumentando la investigación hacia una comprensión más profunda de los mecanismos implicados en las infecciones bacterianas. Así, se ha descubierto que una amplia diversidad de bacterias coordina su comportamiento a través de la comunicación célula a célula mediada por pequeñas señales difundibles. Este fenómeno ha sido denominado percepción de quórum (PQ) o autoinducción [W. C. Fuqua et al., J. Bacteriol., 1994, 176, p 269-275] y es frecuente entre las bacterias que forman complejas comunidades unidas a una superficie llamadas biopelículas. El Instituto National Health Institute of America estima que el 80% de las infecciones bacterianas persistentes involucra biopelículas. La percepción de quórum permite a las bacterias hacer un seguimiento de su cantidad y se considera que les otorga un mecanismo para reducir al mínimo la respuesta del huésped al retrasar la producción de factores de virulencia hasta que se han acumulado suficientes bacterias para aplastar los mecanismos de defensa del huésped. Bloquear la percepción de quórum (totalmente o en parte) reinstala la acción adecuada del sistema de defensa del huésped que posteriormente elimina los intrusos bacterianos. Por lo tanto, la inhibición de la percepción de quórum presenta un enfoque terapéutico alternativo a la tradicional eliminación de las bacterias o inhibición del crecimiento mediada por antibióticos.

30 Se ha demostrado que el extracto de ajo bloquea la percepción de quórum y promueve la rápida depuración de infecciones pulmonares causadas por la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* [T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]. La *Pseudomonas aeruginosa* forma comunidades de biopelícula y utiliza la percepción de quórum a través de la producción de moléculas de señalización como N-acil homoserina lactonas (AHL) y quinolonas (PQS). El extracto de ajo también es un producto de medicina natural muy conocido, con efectos antibacterianos y de reducción del colesterol, entre otros.

35 Se ha demostrado previamente que el ajoeno [(E,Z)-4,5,9-tritrideca-1,6,11-trieno-9-óxido] es un principio activo en los extractos de ajo antimicrobianos junto con la alicina y otros derivados organosulfurados. Sin embargo, en un estudio sobre ajoeno (el isómero usado E:Z = 1:4), aunque el ajoeno fue un inhibidor potente de la proliferación de bacterias grampositivas, demostró tener un efecto inhibitorio variable sobre las bacterias gramnegativas y no tener un efecto inhibitorio de la proliferación que se pudiera medir sobre *P. aeruginosa* [R. Naganawa et al., Applied and Environmental Microbiology, 62, 1996, p. 4238-4242].

45 Los procesos de la presente para la fabricación de derivados del ajoeno incluyen el aislamiento de derivados o precursores del ajoeno del extracto de ajo y diversos métodos de síntesis. El aislamiento del ajo es muy tedioso e ineficiente ya que la cantidad de ajoeno disponible por kg de ajo crudo es minúscula es decir, del orden de 10 mg y la separación por HPLC de los compuestos relacionados del ajo es una necesidad. Se han dado a conocer en el estado anterior de la técnica algunos métodos de síntesis y semisíntesis para ajoeno y varios derivados. Eric Block y colaboradores dieron a conocer un método de síntesis a partir de la oxidación de disulfuro de dialilo o derivados y el posterior calentamiento de la alicina cruda resultante o derivados para formar ajoeno y derivados [EP 185324 y Block et al., J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, p. 7045-7055]. Apitz-Castro y colaboradores presentaron un método de semisíntesis en el que la alicina (2-propenotiosulfonato de alilo) se aísla de bulbos de ajo y posteriormente se calienta y se trata con un alcohol de alquilo inferior para producir derivados del (E,Z)-ajoeno [US 4,665,088]. Recientemente también se informó de un método para convertir la alicina extraída en ajoeno con ácido acético en acetona, no obstante se usó material de partida crudo impuro (es decir alicina cruda extraída del ajo) [WO 2010/100486]. Sin embargo, los rendimientos en los métodos anteriores han sido a menudo pobres o ha sido necesaria la purificación por cromatografía HPLC lo que resulta en bajos rendimientos de ajoeno a elevados costos de purificación. Además estos métodos de síntesis carecen a menudo de control del (E,Z)-isómero resultante de la reacción, aun cuando mantienen de todos modos altos rendimientos.

60 En consecuencia, sería ventajoso contar con un método alternativo y mejorado para la fabricación de derivados del ajoeno.

65 Actualmente se encontró sorprendentemente que se puede lograr la síntesis de derivados del ajoeno en mayores rendimientos y mejores purezas del crudo que lo obtenido previamente, pudiéndose variar la relación de los isómeros (E,Z) en el producto final a través de variaciones específicas en las condiciones de reacción. Asimismo, se

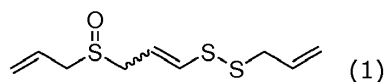
encontró sorprendentemente que ciertas mezclas de derivados y/o isómeros del ajoeno incluidos los obtenidos por el proceso de síntesis mencionado antes y aplicando un único paso de purificación cromatográfica fueron inhibidores eficaces de la percepción de quórum de bacterias formadoras de biopelícula, tanto cuando se aplicaron solas como en composición con antibióticos convencionales.

Resumen de la invención

Por lo tanto, un objetivo de la presente divulgación se refiere a proporcionar un procedimiento de síntesis para la producción eficaz de derivados del ajoeno o mezclas específicas de éstos que sean aplicables en el tratamiento de infecciones bacterianas mediante la inhibición de la percepción de quórum.

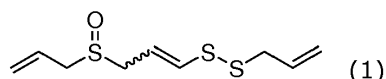
En particular, es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un proceso para la fabricación de (E,Z)-ajoeno [(E,Z)-4,5,9-tritradodeca-1,6,11-trieno-9-óxido] en relaciones E:Z controlables que solucione los problemas mencionados antes del estado de la técnica de bajos rendimientos del producto, elevado consumo de tiempo y procedimientos de purificación costosos.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1)



para usar en el tratamiento de infecciones bacterianas, donde la infección bacteriana es una infección por una bacteria formadora de biopelícula.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que contiene (E,Z)-ajoeno de fórmula (1)



y al menos un antibiótico, donde el antibiótico se elige del grupo que consiste en aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenems, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, monobactamas, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema de ejemplo que representa la ruta de síntesis hacia derivados de (E,Z)-ajoeno, que incluye el control de la relación E:Z de los isómeros. La condiciones de la reacción fueron i) dimetildioxirano (DMDO), acetona, -50 °C a -20 °C, 30 min, 96% de rendimiento; II) o bien A) 20% de AcOH, 40% de acetona acuosa, 64 °C, 4 h, 36% de rendimiento, (Z:E - 4:1) o bien B) 20% de AcOH, 40% de tolueno, 40 °C, 48 h, 32% de rendimiento, (Z:E - 1:10).

La figura 2 muestra un esquema de ejemplo que representa la ruta de síntesis hacia derivados más oxidados de ajoeno. Las condiciones de reacción fueron iii) 4 equivalentes de ácido peracético en diclorometano a una temperatura de 0 °C a temperatura ambiente durante 12 h, 38% de rendimiento o 4 equivalentes de DMDO en acetona a -10 °C durante 6 h con 82% de rendimiento. IV) Permanganato de potasio en acetona a -20 °C por 2 h con 96% de rendimiento. v) 2 equivalentes de DMDO en acetona a -10 °C por 6 h que dio 78% de rendimiento. VI) Sulfuro litiado (PhSLi) en THF de -78 °C a 0 °C durante 1 h que dio 86% de rendimiento.

La figura 3 muestra una comparación del nivel de cambio (- indica disminución) en la expresión génica de *rhIA* y *lasB* medido por RT-PCR (barras gris oscuro) y micromatriz de ADN (barras gris claro). Los datos representan el promedio de tres experimentos individuales. Una estrella (*) indica $P < 0.05$, prueba t de Student. Las barras de error son la media $\pm$ DE

La figura 4 muestra la concentración total de ramnolípido en *P. aeruginosa* planctónica cultivada sin tratar con ajoeno ("no agregado") y tratada con ajoeno. Los cultivos se hicieron en medio complementado con 10 μ g/ml, 20 μ g/ml, 40 μ g/ml y 80 μ g/ml de ajoeno (a 40 μ g/ml y 80 μ g/ml el contenido de ramnolípido está por debajo del nivel de detección a DO = 1.5). Muestras recuperadas a DO600 = 1.5 (barras gris oscuro) y a DO600 = 2.0 (barras gris claro). Los datos representan el promedio de tres experimentos individuales. Las barras de error son la media $\pm$ DE

La figura 5 muestra investigaciones combinadas de fluorescencia y microscopía de luz de biopelículas de *P. aeruginosa* expuestas a PMN (un único PMN señalado por la flecha) al cuarto día durante 180 min a 37 °C y luego posteriormente teñidas con el colorante de ADN yoduro de propidio (PI). A) La biopelícula se cultivó sin ajoeno en el medio. B) La biopelícula se cultivó en presencia de 100 μ g/mL de ajoeno en el medio. La fluorescencia roja indica

PMN necróticos escurriendo su contenido de ADN (tenido por PI). La fluorescencia verde indica áreas de arriba de la biopelícula de *P. aeruginosa*.

La figura 6 muestra biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 (gris claro) (A) y una cepa clínica de *P. aeruginosa* CF438 (gris claro, teñida con syto9) (B) al cuarto día después de 24 horas de tratamiento con 10 µg/ml de tobramicina. Las células muertas se tiñen con el colorante de ADN PI (gris oscuro/negro). Las biopelículas se visualizaron con CSLM. C) Modelo de implante tratado con ajoeno y tobramicina.

La figura 7 muestra los resultados combinados de tres experimentos separados de tratamiento con ajoeno versus ningún tratamiento (placebo) utilizando el modelo de ratón de infección pulmonar. Los ratones se sacrificaron el día uno o el día tres post infección y se determinó el contenido de bacterias en los pulmones. Los cuadrados abiertos indican contenido pulmonar bacteriano por pulmón para cada ratón individual. Los valores medianos se indican con un cuadrado negro lleno. La significación estadística de la diferencia en la depuración se probó mediante una prueba U de Mann-Whitney (análisis de datos no paramétricos) y los valores de p para la diferencia en el día uno y el día tres fueron de 0.9 y 0.002, respectivamente.

La figura 8 muestra resultados de experimentos de tratamiento con ajoeno purificado por HPLC (gráfico superior, pureza del ajoeno >99.5%) y ajoeno que no había sido purificado por HPLC (gráfico inferior, pureza 95-99.5%) versus ningún tratamiento (placebo) utilizando el modelo de ratón de infección pulmonar. Los ratones se sacrificaron el día tres post infección y se determinó el contenido de bacterias en los pulmones. La presente invención se describirá ahora en más detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de tratar la presente invención más detalladamente, se definirán primero los términos y convenciones siguientes:

En el contexto de la presente invención el término derivados del (E,Z)-ajoeno o derivados de (E,Z)-isómeros del ajoeno se refiere a derivados del ajoeno que son aislados como derivados sustancialmente puros del E-ajoeno, derivados sustancialmente puros del Z-ajoeno o como mezclas de derivados de E- y Z-ajoeno. Las designaciones (E,Z) se refieren al doble enlace interno -C=C- del ajoeno como se muestra en las estructuras mediante una línea ondulada donde la configuración puede variar. El término "derivados" se refiere a los dos isómeros (E) y (Z) y sus mezclas y también a derivados oxidados y/o reducidos de (E,Z)-ajoeno y sus mezclas.

Un oxidante, según se define en este documento, es cualquier reactivo químico capaz de cambiar el estado de oxidación de una molécula de su estado de oxidación original a un estado de oxidación mayor. Análogamente, un reductor es cualquier reactivo químico capaz de cambiar el estado de oxidación de una molécula de su estado de oxidación original a un estado de oxidación menor.

En el contexto de la presente invención un ácido comprende ácidos orgánicos e inorgánicos. Esto incluye anhídridos de ácidos orgánicos o cualquier otro pro-ácido. Según se define en este documento un pro-ácido es cualquier compuesto capaz de convertirse en un ácido bajo determinadas condiciones. Dichas condiciones podrían incluir el calentamiento o el sometimiento a un entorno acuoso. También se infiere cualquier mezcla de ácidos.

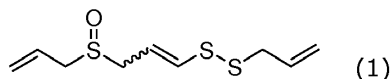
Según se describe en este documento biopelícula se refiere a cualquier agregado, a menudo, pero no necesariamente una comunidad de bacterias unida a una superficie (sésil) embebida en una matriz biopolimérica que muestra mayor resistencia p. ej. a antibióticos y partes importantes del sistema inmunitario innato, en comparación con sus contrapartes planctónicas.

En el contexto de la presente invención la expresión percepción de quórum (PQ) se refiere a un mecanismo conductual bacteriano de coordinación que opera por medio de la comunicación célula a célula transmitida por moléculas de bajo peso molecular que transportan una señal difundible. Los sistemas de PQ juegan un papel importante durante el evento inicial de una infección. Mediante el empleo de tres sistemas de PQ (indicados Las, Rhl y PQS) para controlar la expresión de su impresionante arsenal de factores de virulencia muchos de los cuales son determinantes antigénicos, ciertas bacterias como *P. aeruginosa* son capaces de operar de una manera sigilosa hasta que alcanzan cierta densidad celular donde se activa el sistema de PQ y la virulencia y la protección inmunitaria se encienden. Después de la activación del sistema de PQ, tiene lugar una liberación coordinada de factores de virulencia que dañan los tejidos y degradan la defensa inmunitaria.

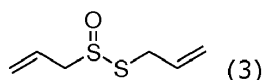
También en el presente contexto la bacteria productora de *N*-acil-homoserina lactona se define como la bacteria que utiliza *N*-acil-homoserina lactonas como moléculas mensajeras en su comunicación célula a célula durante la percepción de quórum.

Según se define en este documento un inhibidor de la percepción de quórum o inhibidor de PQ es una sustancia o mezcla de sustancias capaz de inhibir la comunicación bacteriana basada en PQ. El bloqueo de los procesos de PQ ya sea por mutación en los genes reguladores o mediante un inhibidor de PQ torna dichas bacterias más vulnerables tanto a los antibióticos convencionales, en particular los aminoglucósidos como la tobramicina, como a componentes importantes de la defensa celular del huésped como los leucocitos PMN (leucocitos polimorfonucleares).

Como se mencionó antes el primer aspecto de la presente divulgación proporciona un método para fabricar compuestos de fórmula general (1)



también conocido como (E,Z)-ajoeno. La conformación del doble enlace interno $-C=C-$ puede ser E, Z o una mezcla de los mismos. El método comprende proporcionar un compuesto intermedio de fórmula (3) también conocido como alicina



y tratar dicho compuesto de fórmula (3) con un ácido, en presencia de un solvente para proporcionar compuestos de fórmula (1) según lo definido precedentemente. En una realización preferida la concentración de la solución que contiene el compuesto (3) puede ser 0.06-6.0 M, preferentemente 0.12-3.0 M, 0.24-1.5 M, 0.48-0.8 M, por ejemplo 0.6 M. El ácido se puede agregar en un exceso o cantidad estequiométrica, pero se puede agregar habitualmente en una cantidad catalítica como 5-50 mol%, 10-40 mol%, 15-30 mol%, por ejemplo 20 mol%. En una realización preferida el ácido agregado en la conversión del producto intermedio (3) a los compuestos de fórmula (1) puede ser una serie de ácidos, como ácidos carboxílicos que incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido pentanoico, ácido hexanoico o ácido trifluoroacético (TFA) o ácido p-toluenosulfónico (TsOH), ácido metanosulfónico (MsOH), ácido canforsulfónico (CSA). El ácido preferido es ácido acético. La elección del ácido tiene impacto en la relación obtenida de isómeros E:Z, es decir, el ácido utilizado y la correspondiente relación E:Z obtenida pueden ser por ejemplo ácido trifluoroacético (E:Z = aproximadamente 1:1), ácido p-toluenosulfónico (E:Z = aproximadamente 1:4), ácido metanosulfónico (E:Z = aproximadamente 1:4) y ácido canforsulfónico (E:Z = aproximadamente 1:5), cuando se usa acetona acuosa al 40% V/V como solvente.

En una realización preferida del tratamiento con ácido que proporciona el compuesto de fórmula (1), el solvente utilizado es acetona acuosa al 10-70% V/V, preferentemente 20-60% V/V, 30-50% V/V, por ejemplo acetona acuosa al 40% V/V (es decir, 60% de acetona en 40% de agua). Después de la adición del ácido, la temperatura de reacción se puede ajustar para que esté en el intervalo de 0-100 °C, preferentemente de 20-80 °C, tal como de 40-70 °C, preferentemente de 50-65 °C, por ejemplo de 64 °C. El tiempo de reacción puede ser de 1-24 h, preferentemente de 2-10 h, por ejemplo de 3-5 h, preferentemente de 4 h. El uso de acetona acuosa como solvente proporciona los compuestos de fórmula (1) en una relación E:Z de 1:2-1:6, preferentemente de 1:3-1:5, por ejemplo de 1:4, cuando se utiliza ácido acético en el tratamiento con ácido.

Aún en otra realización preferida de los métodos descritos precedentemente que proporcionan el compuesto de fórmula (1), el solvente utilizado durante el tratamiento con ácido del producto intermedio (3) es tolueno o benceno acuoso. El benceno acuoso puede ser benceno acuoso al 1-50% V/V, preferentemente al 5-30% V/V, por ejemplo al 7-20% V/V, preferentemente benceno acuoso al 10% V/V (es decir 90% de benceno en 10% de agua). Después de la adición del ácido, la temperatura de reacción se puede ajustar para que esté en el intervalo de 0-100 °C, preferentemente de 10-80 °C, tal como de 20-60 °C, preferentemente de 30-50 °C, por ejemplo de 40 °C. El tiempo de reacción para el tratamiento con ácido en tolueno o benceno acuoso puede ser de 2-96 h, preferentemente de 24-72 h, por ejemplo de 36-60 h, preferentemente de 48 h. El uso de tolueno o benceno acuoso como solvente proporciona los compuestos de fórmula (1) en una relación E:Z de 6:1-20:1, por ejemplo de 10:1, cuando se utiliza ácido acético en el tratamiento con ácido.

La purificación de los productos obtenidos se puede realizar generalmente mediante técnicas estándar de extracción con solvente seguidas de purificación por cromatografía en columna, pero también se pueden utilizar otros métodos como destilación, cromatografía preparativa en capa delgada o cristalización para los compuestos sólidos.

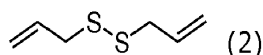
En una realización preferida de la purificación del compuesto (1) la mezcla de reacción se enfría hasta temperatura ambiente y se diluye con 3 volúmenes de una mezcla 1:1 de agua y metanol seguido de una extracción con un solvente apolar como pentano. La fracción acuosa se puede saturar con sulfato de amonio y extraer posteriormente con un solvente más polar que el pentano como diclorometano. Se puede aislar (E,Z)-ajoeno (1) concentrando los extractos orgánicos combinados y sometiendo el producto crudo a cromatografía en columna de sílice empleando una fase móvil eluyente que contenga acetato de etilo al 40-99% V/V en pentano, preferentemente al 50-90% V/V, al 60-80% V/V, por ejemplo al 70% V/V.

La pureza del (E,Z)-ajoeno después del procedimiento anterior puede ser de 95-99.5%, tal como de 97-99.5%, 98-99.5%, 99-99.5%, por ejemplo de aproximadamente 99.5%. Los inventores encontraron sorprendentemente, que al purificar posteriormente el producto obtenido luego de la cromatografía en columna, por ejemplo empleando cromatografía HPLC de fase reversa, u otros pasos de purificación, dicho producto (E,Z)-ajoeno pierde toda o parte de su actividad biológica, por ejemplo en los ensayos como los descritos en los ejemplos. Esto también se encontró cuando se aisló (E)-ajoeno puro y/o (Z)-ajoeno puro, por ej., usando HPLC. Se especula que pequeñas cantidades de química derivada del ajoeno, es decir, compuestos relacionados con el ajoeno, como menos del 5%, 3%, 2%, 1%, tal como menos de 0.5% pueden ser muy importantes en la estabilización del (E,Z)-ajoeno y derivados, frente a la degradación, por ejemplo, la oxidación, reducción y/o escisión, tanto *in vitro* pero de manera importante también *in vivo*.

Una realización de la divulgación es un método como el descrito antes en el cual se somete (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) a no más de un paso de purificación cromatográfica, donde dicho paso de purificación cromatográfica no consiste en HPLC de fase reversa.

Después de la purificación, los derivados del (E,Z)-ajoeno se pueden aislar como mezclas de isómeros en rendimientos basados en el compuesto (3) de al menos 10 mol%, preferentemente 15 mol%, 20 mol%, 25 mol%, por ejemplo de al menos 30 mol%.

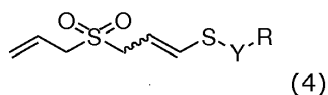
En una realización la alicina de fórmula (3) se puede fabricar tratando un compuesto de fórmula (2), también conocido como dialil disulfuro (DADS)



con un oxidante. En una realización útil del método, el oxidante utilizado para oxidar los compuestos de fórmula (2) a compuestos de fórmula (3) se puede elegir del grupo que consiste en DMDO, MCPBA, ácido peracético, permanganato de potasio, óxido de magnesio y oxidantes de Swern (e.g. cloruro de oxalilo, dimetilsulfóxido (DMSO) y una base orgánica, como trietilamina). DMDO es un oxidante preferido ya que proporciona los mayores rendimientos. El oxidante se puede agregar en cantidad catalítica o estequiométrica en relación con el compuesto (2), pero preferentemente en una cantidad en exceso como de 1.01-10.0 equivalentes molares, preferentemente 1.05-5.0 equivalentes molares, tal como de 1.07-2.0 equivalentes molares, preferentemente de 1.10 equivalentes molares. El compuesto de fórmula (2) se puede agregar ventajosamente a una solución del oxidante a baja temperatura durante un período de varios minutos. La concentración de oxidante en la solución puede ser de 0.001-1.0 M, preferentemente de 0.005-0.5 M, de 0.01-0.1 M, por ejemplo de 0.07 M. La solución puede estar en un solvente capaz de mantenerse líquido a bajas temperaturas, como acetona, diclorometano, cloroformo, tetraclorometano, éter dietílico, acetato de etilo o tetrahidrofurano. La temperatura de la solución mientras se agrega el compuesto (2) puede ser de -100 °C a 10 °C, preferentemente de -80 °C a -10 °C, de -60 °C a -40 °C, por ejemplo de -50 °C. El compuesto (2) se puede agregar en un período de 1-120 min, preferentemente de 5-90 min, 7-60 min, 10-30 min, 12-20 min, por ejemplo de 15 min. Después de la adición del compuesto (2) a la solución, se puede permitir ventajosamente que ésta se caliente lentamente hasta 10-60 °C, preferentemente a 20-40 °C, tal como a 30 °C, en un período de 10-120 min, preferentemente de 15-90 min, 20-60 min, 25-40 min, por ejemplo de 30 min. La concentración a través de la evaporación de solventes proporciona el compuesto intermedio (3) en forma cruda con una pureza de al menos 80 mol%, preferentemente de al menos 85 mol%, al menos de 90 mol%, por ejemplo de al menos 95 mol%.

La alicina cruda (3) se puede utilizar sin purificación adicional y aún así proporcionar buenos rendimientos en el paso siguiente. Esto podría deberse a la falta de ácido presente en el procedimiento de oxidación, que parece contribuir a la degradación de la alicina durante la oxidación y el almacenamiento posterior. Sin embargo, en una realización preferida la alicina (3) puede ser purificada ventajosamente para aislar una alicina (3) sustancialmente pura antes del tratamiento posterior con ácido. Se encontró que esto proporcionaba una reacción aún más limpia y mayores rendimientos en el paso posterior de tratamiento con ácido para dar compuestos de fórmula (1). La purificación se puede realizar usando cualquier método de purificación convencional, preferentemente cromatografía en columna de sílice. La cromatografía se puede realizar usando una fase móvil eluyente compuesta por una mezcla de éter dietílico en pentano, preferentemente éter dietílico al 0.5-20% V/V en pentano, tal como al 1-10% V/V, 2-8% V/V, 3-7% V/V, 4-6% V/V, preferentemente al 5% V/V. Por lo tanto, un compuesto de fórmula (3) se obtiene en un rendimiento basado en el compuesto (2) de al menos 80 mol%, preferentemente de al menos 85 mol%, de al menos 90 mol%, por ejemplo de al menos 95 mol%.

En un segundo aspecto de la divulgación se proporciona un proceso para la fabricación de compuestos de fórmula (4)



en la que Y se elige entre -S-, -S(O) o -S(O₂)-, R se elige entre alilo, fenilo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, bencilo, *p*-toluilo, *m*-toluilo, *o*-toluilo, y la conformación del doble enlace interno -C=C- puede ser E, Z o una mezcla de los mismos. Este proceso comprende el método definido precedentemente para hacer compuestos de fórmula (1) seguido de un paso de reacción adicional que implica hacer reaccionar (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) con al menos un reactivo oxidante adicional para proporcionar un compuesto de fórmula (4) en el que R es alilo, y opcionalmente hacer reaccionar el compuesto de fórmula (4) con un sulfuro litiado sustituido con R (R-SLi) para proporcionar compuestos de fórmula (4) en la que R es fenilo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, bencilo, *p*-toluilo, *m*-toluilo u *o*-toluilo.

En una realización del método definido antes, el segundo oxidante utilizado para oxidar los compuestos de fórmula (1) a compuestos de fórmula (4) se puede elegir del grupo que consiste en DMDO, MCPBA, ácido peracético, permanganato de potasio, peróxido de hidrógeno, peróxido de bis TMS o cualquier peróxido suave. La reacción con el sulfuro litiado sustituido con R se puede realizar en el solvente tetrahidrofurano a una temperatura de -78 °C hasta 0 °C. El tiempo de reacción puede ser de 30 min a 24 horas, preferentemente de 30 min a 2 horas.

La purificación de los compuestos de fórmula (4) se puede realizar de manera similar a la de los compuestos de fórmula (1) como se describió antes.

Los compuestos obtenidos de fórmula general (4) se pueden aislar como mezclas de los (E,Z)-isómeros, o estos isómeros se pueden separar para proporcionar los (E)-isómeros sustancialmente puros o los (Z)-isómeros sustancialmente puros. Asimismo, los compuestos de fórmula (4) que tienen diferentes estados de oxidación de Y, es decir, Y igual a -S-, S(O), o -S(O₂)- se pueden separar o aislar como mezclas.

Otra realización de la presente divulgación es los compuestos de fórmula (1) obtenidos por los métodos descritos antes o alternativamente los compuestos de fórmula (1) que se pueden obtener por los métodos descritos antes. Como se describió, el método anterior conduce a buenas purezas del crudo, lo que conduce al uso de sólo un paso de purificación cromatográfica, lo que ha demostrado ser vital para obtener un derivado de (E,Z)-ajoeno más activo desde el punto de vista biológico (1). Dichos derivados activos del ajoeno se puede decir que tienen una pureza en el intervalo de 95-99.5%, tal como aproximadamente 97-99.5%, 98-99.5%, 99-99.5% por ejemplo de aproximadamente 99.5%. La relación E:Z del (E,Z)-ajoeno obtenido puede ser preferentemente de 20:1 a 1:10, tal como de 15:1 a 1:6, de 12:1 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:4. Alternativamente la relación E:Z puede ser preferentemente de 1:1 a 1:10, tal como de 1:2 a 1:8, de 1:3 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 1:4.

Aún otro aspecto de la invención es una composición que contiene un (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) y al menos un antibiótico. El compuesto (es decir, el (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z obtenible que incluye E puro o Z puro) se puede obtener por el método descrito antes, o cualquier otro método que proporcione un producto de (E,Z)-ajoeno inhibidor de PQ biológicamente activo. Dichas composiciones se pueden usar en la formulación de medicamentos y por lo tanto se pueden formular como un medicamento o una forma farmacéutica que contenga (E,Z)-ajoeno de fórmula (1), al menos un antibiótico y portadores y/o aglutinantes farmacéuticamente aceptables. El medicamento se puede formular como una forma farmacéutica líquida o sólida, donde las composiciones líquidas pueden incluir composiciones líquidas para administración tópica, composiciones líquidas para inyección intravenosa, inyección intramuscular o subcutánea o una composición líquida para inhalación como un aerosol. Las formas farmacéuticas sólidas pueden incluir comprimidos, cápsulas, polvos, incluidos los polvos para inhalación. También se infieren las realizaciones en las que el (E,Z)-ajoeno se administra de alguna de las maneras anteriores, mientras que el antibiótico se administra de cualquier otra de las maneras anteriores. Por ejemplo el ajoeno se puede administrar por inhalación, a través de polvo o aerosol, mientras que el antibiótico se administra por vía intravenosa.

La relación E:Z del (E,Z)-ajoeno en la composición puede ser preferentemente de 20:1 a 1:10, tal como de 15:1 a 1:6, de 12:1 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:4. Alternativamente la relación E:Z puede ser preferentemente de 1:1 a 1:10, tal como de 1:2 a 1:8, de 1:3 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 1:4.

Una realización es por lo tanto una composición como las descritas antes que contiene (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) y al menos un antibiótico para usar en el tratamiento de infecciones bacterianas por bacterias que forman biopelículas.

Una ventaja de dichas composiciones es que se logra un efecto sinérgico al utilizar un inhibidor de PQ en una composición con un antibiótico, como se demuestra en este documento. En el contexto de la presente invención un antibiótico se define como cualquier sustancia antibacteriana donde el efecto antibacteriano no se basa en la inhibición de PQ. Generalmente, el antibiótico utilizado en combinación con un inhibidor de PQ se puede clasificar como bactericida o bacteriostático. Los bactericidas matan las bacterias directamente en tanto los bacteriostáticos impiden que las bacterias se dividan. Las clases de antibióticos incluyen aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenems, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, monobactamas, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. El antibiótico se puede elegir de cualquiera de estas clases.

El antibiótico se puede elegir del grupo que consiste en ampicilina, bacampicilina, indanil carbenicilina, mezlocilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, bencilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, metilicina, oxacilina, penicilina g, penicilina v, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulánico, nafcilina, cefadroxilo, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefotetan, cefoxitina, cefprozil, ceftmetazol, cefuroxima, loracarbef, cefdinir, ceftibuteno, cefoperazona, cefixima, cefotaxima, cefpodoxima proxetil, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, azitromicina, claritromicina, clindamicina, diritromicina, eritromicina, lincomicina, troleandomicina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, ácido oxolínico, gemifloxacina, perfloxacina, imipenem-cilastatina, meropenem, aztreonam, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina, teicoplanina, vancomicina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, mafenida, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, sulfametizol, rifabutina, rifampicina, rifapentina, linezolid, quinupristina-dalfopristina, bacitracina, cloranfenicol, fosfomicina, isoniazida, metenamina, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, nitrofurazona, novobiocina, polimixina, espectinomina, trimetoprim, colistina, cicloserina, capreomicina, etionamida, pirazinamida, ácido para-aminosalicílico y etilsuccinato de eritromicina. Por ejemplo, el antibiótico puede ser tobramicina.

Un aspecto de la presente invención es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) destinado al tratamiento de infecciones bacterianas por bacterias formadoras de biopelícula.

Otro aspecto de la divulgación es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) según se obtiene por el método descrito aquí destinado al tratamiento de infecciones bacterianas, preferentemente infecciones bacterianas por bacterias formadoras de biopelícula.

Las realizaciones descritas a continuación se refieren por lo tanto a ambos (E,Z)-ajoenos en general y también a (E,Z)-ajoeno según se proporciona en el método descrito en este documento y finalmente también a composiciones que contienen (E,Z)-ajoeno y un antibiótico como se describió antes.

La relación E:Z del (E,Z)-ajoeno obtenido puede ser preferentemente de 20:1 a 1:10, tal como de 15:1 a 1:6, de 12:1 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:4. Alternativamente la relación E:Z puede ser preferentemente de 1:1 a 1:10, tal como de 1:2 a 1:8, de 1:3 a 1:5, preferentemente de aproximadamente 1:4.

El tratamiento de infecciones bacterianas, que incluyen las de bacterias formadoras de biopelícula, puede ser profiláctico. Los compuestos utilizados pueden estar en una composición con un antibiótico y/o un portador farmacéuticamente aceptable. Los compuestos o las composiciones se pueden administrar mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular o subcutánea, por vía oral, tópica o pueden ser inhalados, preferentemente utilizando un dispositivo de inhalación adecuado. Se pueden inhalar como composiciones sólidas, como polvos, o como composiciones líquidas en forma de aerosoles.

En una realización la infección bacteriana tratada es en un mamífero con una deficiencia inmunitaria. En el contexto de la presente invención, un mamífero con deficiencia inmunitaria es un mamífero que por cualquier razón está inmunodeprimido lo que significa que el desempeño de algunos o todos los aspectos de la defensa natural es menor que el normal. Por lo general, esto puede ser debido a una enfermedad inmunodepresora o a una terapia con medicamentos inmunosupresores. Estos mamíferos corren mayor riesgo de infecciones con bacterias formadoras de biopelícula como *Pseudomonas aeruginosa* y por lo tanto, se beneficiarían posiblemente tanto de un tratamiento profiláctico como agudo con un inhibidor de PQ que puede estar en una composición con un antibiótico. Los mamíferos pueden abarcar a los seres humanos, los animales domésticos y el ganado, o los mamíferos se pueden elegir del grupo que consiste en seres humanos, animales domésticos y ganado. Las enfermedades inmunodepresoras incluyen enfermedades del grupo que consiste en fibrosis quística, diabetes mellitus, EPOC, enfermedad hematológica maligna, cáncer, VIH, SIDA, heridas crónicas y quemaduras. Los pacientes pueden incluir pacientes con catéteres permanentes, pacientes tratados con equipos médicos, implantes y stents, y pacientes en UCI.

En una realización preferida de la invención las bacterias, particularmente las bacterias formadoras de biopelícula que causan las infecciones descritas antes se pueden elegir del grupo de bacterias capaces de virulencia controlada por PQ como las bacterias gramnegativas, particularmente los grupos siguientes de bacterias gramnegativas: *Vibrio fischeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia Stewartii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, en particular *Pseudomonas aeruginosa*.

Todavía otra realización preferida de la presente invención es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) destinado al tratamiento de infecciones bacterianas donde la zona infectada es una herida, como una herida crónica y/o una herida que no cicatriza. En estos casos los compuestos se pueden administrar de manera ventajosa tópicamente.

Otra realización útil es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) destinado al tratamiento de infecciones bacterianas donde la zona infectada es los pulmones. Este tratamiento es especialmente pertinente para pacientes con fibrosis quística que, debido a su menor respuesta inmunitaria, a menudo sufren de infecciones pulmonares persistentes por bacterias formadoras de biopelícula, como *Pseudomonas aeruginosa*. Por consiguiente, una realización preferida es (E,Z)-ajoeno de fórmula (1) destinado al tratamiento de infecciones bacterianas donde la zona infectada es los pulmones de un paciente con fibrosis quística. En estos casos los compuestos se pueden administrar de manera ventajosa por inhalación o por inyecciones intravenosas.

En otra realización preferida la zona infectada es un implante o la zona alrededor de un implante. Según se define en este documento un implante es un dispositivo médico hecho para reemplazar o actuar como una estructura biológica faltante en un mamífero. Dichos implantes pueden incluir implantes que contienen elementos electrónicos, como los marcapasos artificiales y los implantes cocleares, dispositivos de liberación de fármacos subcutáneos en forma de píldoras implantables o stents que eluyen fármacos, un dispositivo protésico como dispositivos de reemplazo de hueso y soporte o implantes dentales.

Aún en otra realización la zona infectada puede ser una parte del sistema digestivo como el estómago y/o los intestinos. Estas infecciones pueden incluir la intoxicación alimentaria o infecciones derivadas de stents biliares o pancreáticos.

Cabe señalar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención. La invención se describirá ahora más detalladamente en los ejemplos siguientes no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis del compuesto (3), alicina.

Una solución en acetona de DMDO (31 mL, 0.07 M, 2.2 mmol) se agregó gota a gota en el transcurso de 15 min al compuesto (2), dialildisulfuro (0.29 g, 2.0 mmol) en acetona (1 mL) a -50 °C en atmósfera de argón. La mezcla de reacción amarillo claro resultante se dejó en agitación durante 30 min mientras se calentaba lentamente hasta -20 °C. La mezcla de reacción transparente resultante se concentró al vacío. El residuo crudo (0.31 g, 98%) se purificó posteriormente por cromatografía en columna (eluyendo con 5% de Et₂O en pentano) para producir el compuesto (3), alicina (0.31 g, 1.9 mmol, 96% de rendimiento, pureza >95% y hasta 99.9%) como un líquido amarillo claro.

La reacción anterior se repitió bajo diferentes condiciones con respecto a solvente y temperatura. Los parámetros restantes se mantuvieron iguales. Como se observa en la tabla 1 siguiente, la reacción es eficaz bajo una serie de condiciones.

Tabla 1: Conversión de dialildisulfuro a alicina (3)

Entrada	Solvente	Temp.	2/Rendimiento
1	Acetona	-100°C, 78°C, -50 - -20°C	96%
2	CH ₂ Cl ₂	-100°C, 78°C, -50 - -20°C	90%
3	CHCl ₃	-78 - -60°C	92%
4	CCl ₄	-78 - -60°C	96%
5	Et ₂ O	-50 - -20°C	86%
6	EtOAc	-50 - -20°C	80%
7	THF	-50 - -20°C	85%

Ejemplo 2: Síntesis del compuesto (1), (E,Z)-ajoeno usando solvente acetona

Se trató una solución del compuesto (3), alicina (0.162 g, 1.0 mmol) en una solución de acetona acuosa al 40% (1.6 mL) con AcOH (0.011 mL, 0.2 mmol). La mezcla resultante se calentó a 64 °C durante 4 h. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con metanol acuoso al 50% (6 mL) y se extrajo con pentano (5 x 10 mL). La fracción acuosa se saturó con NH₄SO₄ sólido y la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄) y se concentraron al vacío. El residuo crudo (0.16 g) se purificó posteriormente por cromatografía en columna (eluyendo con 60-80% de EtOAc en pentano) para producir el compuesto (1) (E,Z)-ajoeno (relación E:Z = 1:4, 0.025 g, 0.1 mmol, 32% de rendimiento) como un líquido amarillo claro.

La reacción anterior se repitió usando diversos ácidos. Los parámetros restantes se mantuvieron igual que antes. El intercambio de ácidos tuvo impacto tanto en los rendimientos como en las relaciones E:Z del ajoeno como se observa en la tabla 2 siguiente:

5 Tabla 2: conversión de alicina (3) a (E,Z)-ajoeno (1) usando diferentes ácidos.

Entrada	Ácido	Condiciones	Rendimiento (E:Z)
1	TsOH	40% de acetona ac., 64 °C, 4 h	24 (1:4)
2	CSA	40% de acetona ac., 64 °C, 4 h	20 (1:5)
3	MsOH	40% de acetona ac., 64 °C, 4 h	22 (1:4)
4	TFA	40% de acetona ac., 64 °C, 4 h	12 (1:1)

Es importante destacar que se encontró que al utilizar alicina (3) menos que altamente pura, los rendimientos en las reacciones anteriores se redujeron drásticamente, cuando no fueron cero. También se encontró que al utilizar los métodos del estado anterior de la técnica para obtener alicina (3), algunas impurezas provenientes del extracto de ajo o de los reactivos o los productos utilizados en la síntesis de alicina dieron lugar a rendimientos de ajoeno no superiores a 6-12%. Esto aplica independientemente de cuál solvente y ácido se usaron para la síntesis de ajoeno.

Ejemplo 3: Síntesis del compuesto (1), (E,Z)-ajoeno [E:Z = 10:1]

15 Se trató una solución del compuesto (3), alicina (0.162 g, 1.0 mmol) en una solución de benceno acuoso al 10% (1.6 mL) con AcOH (0.011 mL, 0.2 mmol). La mezcla resultante se calentó a 37 °C durante 48 h. La mezcla de reacción enfriada se diluyó con metanol acuoso al 50% (6 mL) y se extrajo con pentano (5 x 10 mL). La fracción acuosa se saturó con NH_4SO_4 sólido y la mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (5 x 10 mL). Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na_2SO_4) y se concentraron al vacío. El residuo crudo (0.15 g) se purificó posteriormente por cromatografía en columna (eluyendo con 60-80% de EtOAc en pentano) para producir el compuesto (1) (E,Z)-ajoeno (relación E:Z 10:1, 0.023 g, 0.1 mmol, 30% de rendimiento) como un líquido amarillo claro.

Ejemplo 4: Síntesis de compuestos de fórmula (4).

25 Los derivados sulfona oxidados de (E,Z)-ajoeno demostraron tener efectos inhibitorios de PQ. Por lo tanto, dichos derivados, es decir, los compuestos de fórmula (4) se sintetizaron empleando diversas rutas como se describe a continuación (véase también Fig. 2):

Y = S, R = alilo

30 El compuesto de fórmula (1) ((E,Z) ajoeno) se trató con permanganato de potasio (KMnO_4) en acetona a -20 °C por 2 horas para obtener un compuesto de fórmula (4) con Y = S y R = alilo con 96% de rendimiento. El procesamiento y la purificación fueron análogos a los usados para (E,Z)-ajoeno.

35 Y = S(O)_2 , R = alilo

El compuesto de fórmula (1) ((E,Z) ajoeno) se trató con ácido peracético en diclorometano a 0 °C durante 12 horas para obtener un compuesto de fórmula (4) con S(O)_2 , R = alilo en 38% de rendimiento. El procesamiento y la purificación fueron análogos a los usados para (E,Z)-ajoeno.

40 Alternativamente, el compuesto de fórmula (1) ((E,Z)-ajoeno) se trató con 4 equivalentes de DMDO en acetona a -10 °C durante 6 horas para obtener un compuesto de fórmula (4) con S(O)_2 , R = alilo con un rendimiento de 82%. El procesamiento y la purificación fueron análogos a los usados para (E,Z)-ajoeno.

45 Aún en otra ruta alternativa el compuesto de fórmula (4) con Y = S y R = alilo según se describió antes se trató con 2 equivalentes de DMDO en acetona a -10 °C durante 6 horas para obtener un compuesto de fórmula (4) con S(O)_2 , R = alilo con un rendimiento de 78%.

Y = S, R = fenilo

50 El compuesto de fórmula (4) en el que Y = S(O)_2 , R = alilo se trató con sulfuro litiado (PhSLi) en tetrahidrofurano a una temperatura de -78 °C que se permitió que ascendiera a 0 °C en 1 hora para obtener el compuesto de fórmula (4) que tiene Y = S, R = fenilo con un rendimiento molar de 86%.

55 Y = S, R = metilo, etilo, bencilo

En analogía con el método anterior en el que $Y = S$, $R =$ fenilo, los compuestos correspondientes de fórmula (4) con $R =$ metilo, etilo, bencilo se produjeron con rendimientos similares usando los sulfuros litiados correspondientes (es decir, MeSLi, EtSLi y aliSLi). Los parámetros restantes se mantuvieron iguales.

5 Ejemplo 5: Genes de *P. aeruginosa* regulados por el tratamiento con ajoeno

Se usó el análisis de micromatriz de ADN para identificar los genes regulados por el tratamiento con ajoeno. Como referencia utilizamos el regulón de PQ identificado previamente por Hentzer et al., [M. Hentzer et al., EMBO J., 2003, 22, p. 3803-3815] y estos datos se usaron para validar la especificidad deseada de los compuestos inhibidores de la percepción de quórum putativos (IPQ). Se trataron cultivos de crecimiento exponencial de *P. aeruginosa* con las cuatro concentraciones de ajoeno siguientes: 10 µg/ml (42.7 µM), 20 µg/ml (85.4 µM), 40 µg/ml (170.8 µM) y 80 µg/ml (341.6 µM). Se usó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4. Estas concentraciones no ejercieron efectos inhibitorios sobre el crecimiento. Las muestras se recuperaron a una DO_{600nm} de 2.0 (densidad óptica) debido a que investigaciones previas habían demostrado la mayor actividad entre los genes de PQ a esa densidad celular. La expresión génica de los cultivos tratados se comparó con un control sin tratar.

En general, hubo sólo un pequeño número de genes que disminuyeron en más de 5 veces por las cuatro concentraciones diferentes de ajoeno; 0 genes a 10 µg/ml de ajoeno, 0 genes a 20 µg/ml de ajoeno, 2 genes a 40 µg/ml de ajoeno y 11 genes a 80 µg/ml de ajoeno. La cantidad de genes que aumentaron más de 5 veces no varió notablemente entre los cultivos tratados. Según nuestra configuración experimental, la expresión de 10 de un total de 163 genes de *P. aeruginosa* controlados por PQ (según Hentzer et al., [M. Hentzer et al., EMBO J., 2003, p. 22, 3803-3815]) disminuyó por los tratamientos con ajoeno. Una concentración de 80 µg/ml de ajoeno afecta la expresión de 11 de un total de 5570 genes de *P. aeruginosa*. Por lo tanto, el ajoeno es altamente específico para una subclase de genes controlados por PQ (Tabla 3).

Tabla 3: Alteraciones en la expresión génica por ajoeno. Los genes incluidos disminuyen >5 veces por el tratamiento con 80 µg/ml de ajoeno. Los números son el nivel de cambio en la expresión génica en comparación con un control sin tratar. Los datos representan el promedio de tres experimentos individuales. * indica $P < 0.05$, ** indica $P < 0.01$, prueba t de Student.

Gen	[Ajoeno] µg/ml					
Nº	Gen	10	20	40	80	Descripción
PA0852	cbpD	-2.8	-2.5	-3.9	-6.9	Proteína de unión a quitina
PA1871	lasA	-2.6	-2.2	-3.0	-8.7	Precursor de la proteasa LasA
PA2069	-	-2.3	-2.4	-4.0	-5.3	Probable carbamoil transferasa
PA2146	-	-1.3	-1.8	-2.6	-7.3	Proteína hipotética conservada
PA2300	chic	-2.5	-2.1	-5.1	-24.6	Quitinasa
PA2570	pa1L	-1.8	-2.0	-3.3	-6.3	LecA
PA3478	rhIB	-2.6	-2.0	-3.3	-8.7	Cadena B de ramnosiltransferasa
PA3479	rhIA	-2.2	-1.5	-2.6	-8.8	Cadena A de ramnosiltransferasa
PA4141	-	-1.0	-1.1	-1.3	-5.4	Proteína hipotética
PA4142	-	-2.0	-2.2	-2.7	-5.1	Probable proteína de secreción
PA4175	prpL	-3.7	-3.3	-5.3	-6.8	Endoproteasa regulada por PvdS

Entre los genes disminuidos significativamente por el ajoeno estuvieron los factores de virulencia importantes regulados por PQ siguientes, proteasa LasA (lasA, PA1871), quitinasa (chiC, PA2300), lectinas galactofílica citotóxica (lecA, PA2570), el operón AB de ramnosil transferasa (rhIA, PA3478 y rhIB, PA3479), la endoproteasa regulada por PvdS (prpL, PA4175) que degrada la caseína, la elastina, la lactoferrina, la transferrina y la decorina y la proteína de unión a quitina asociada cbpD (PA0852) que media la unión a sustratos que contienen quitina y presumiblemente asiste en la formación de biopelícula. lasB no disminuyó más de 5 veces.

Ejemplo 6: Verificación de los datos de micromatriz

Para verificar los datos de micromatriz, se realizó una RT-PCR con dos de los genes claves de PQ; lasB y rhIA (véase Fig. 3). Al comparar los dos métodos, la represión de la expresión génica tanto de lasB como de rhIA sigue la misma tendencia, con un ligero aumento general en la cantidad de veces de reducción observada con el método basado en RT-PCR. Los datos de RT-PCR muestran que una concentración de 80 µg/ml de ajoeno reduce la expresión de rhIA casi 12 veces y de lasB casi 5 veces. La expresión de rhIA es controlada principalmente por el sistema de PQ Rhl y la molécula de señalización BHL en tanto que la expresión de lasB es afectada tanto por los

sistemas de PQ Las y Rhl como por la concentración de las moléculas de señalización OdDHL y BHL. Según Rasmussen et al., [Rasmussen et al., Microbiology, 2005, 151, p. 1325-1340], los genes listados en la tabla 3 están (excepto *prpL* cuya regulación se rige enteramente por el sistema de PQ Las) sujetos a la regulación por ambos sistemas de PQ Las y Rhl. Esto sugiere que el ajoeno apunta principalmente a PQ Rhl. Se utilizó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4 en estos experimentos.

Ejemplo 7: Atenuación de la producción de ramnolípido por el ajoeno

A fin de ejemplificar la eficacia real del ajoeno para inhibir la síntesis de uno de los principales factores de virulencia, la concentración de ramnolípido presente en los cultivos cultivados para matriz de ADN y RT-PCR se cuantificó directamente por LC-MS. La producción de ramnolípidos se inicia temprano en la fase estacionaria regulada coordinadamente por el sistema de PQ Rhl codificado por los genes *rhIA*, *rhIB* y *rhIC* (PA3479, PA3478 y PA1131) [V. E. Wagner et al., J Bacteriol., 2003, 185, p. 2080-2095 y R. Rahim et al., Mol Microbiol., 2001, 40, p. 708-718]. Las muestras se recuperaron por lo tanto a una DO600nm de 1.5 y 2.0 para controlar la producción de ramnolípido antes y después de que la síntesis se iniciara completamente. Se encontró que la concentración de ramnolípido en las muestras disminuía gradualmente al aumentar la concentración de ajoeno. Cuando se trató con 20 µg/ml de ajoeno a una DO600nm de 2.0, el contenido de ramnolípido se redujo aproximadamente a 1/3 en comparación con el cultivo sin tratar y casi no hubo ramnolípido detectable presente en la muestra cuando las células se trataron con 80 µg/ml de ajoeno. Esta concentración, por lo tanto, casi bloquea completamente la síntesis de ramnolípido. Se usó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4.

Ejemplo 8: El tratamiento con ajoeno produce biopelículas deficientes en ramnolípidos *in vitro* y evita la muerte de los PMN

Las biopelículas expuestas a leucocitos PMN producen ramnolípidos que actúan como un escudo y protegen a las bacterias de la biopelícula de la fagocitosis. La influencia del ajoeno sobre la lisis de los PMN se demostró utilizando un sistema *in vitro* de cultivo continuo de biopelícula en cámara de flujo de paso único [B. B. Christensen et al., Methods Enzymol., 1999, 310, p. 20-42]. Se cultivaron biopelículas de *P. aeruginosa* durante cuatro días en presencia y ausencia de 100 µg/ml de ajoeno. Cuando se introdujeron posteriormente los PMN en las cámaras de flujo sobre las biopelículas cultivadas en ausencia de ajoeno, la tinción con yoduro de propidio (PI) indicó necrosis de los PMN (Fig. 5A). Por el contrario, cuando la biopelícula se cultivó en presencia de ajoeno no se observó necrosis de los PMN (Fig. 5B). Por consiguiente, el tratamiento con ajoeno rescata a los leucocitos PMN bloqueando la síntesis de ajoeno de la biopelícula. Se demostró previamente que los PMN rescatados pueden fagocitar las bacterias de la biopelícula [T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]. Se usó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4.

Ejemplo 9: Conformación *in vitro* e *in vivo* del efecto de sinergia del tratamiento con ajoeno y antibióticos

Un punto importante en el tratamiento de infecciones por biopelícula bacteriana es la menor eficacia de los antibióticos administrados. Una infección en las vías respiratorias de los pacientes con FQ se traducirá en altas concentraciones de polielectrolitos aniónicos como ADN [T. Brandt et al., Thorax, 1995, 50, p. 880-882] liberado de células inflamatorias lisadas como PMN y bacterias. Se ha demostrado que los polielectrolitos aniónicos y en particular el ADN se unen a los antibióticos catiónicos como tobramicina y reducen su actividad, lo que puede conducir a una disminución de la tobramicina biológicamente disponible a tan poco como 5% de la cantidad existente [P. M. Mendelman, 1985, Am Rev Respir Dis., 132, p. 761-765]. Esto sugiere que bloqueando la producción y la liberación de ramnolípidos y ADN, es posible reducir la inactivación siguiente de la tobramicina.

De conformidad con eso, hemos publicado previamente que el tratamiento de combinación de extracto de ajo con el antibiótico tobramicina de una biopelícula de tres días de antigüedad (cultivada *in vitro* en el cultivo continuo en celdas de flujo de paso único) mostró un efecto sinérgico de eliminación [T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]. Sin embargo se desconocía cuál era el principio activo en el extracto de ajo. Por lo tanto, las biopelículas de la cepa de *P. aeruginosa* se cultivaron en presencia o ausencia de 100 µg/ml de ajoeno. Al tercer día las biopelículas se trataron con 10 µg/ml de tobramicina durante 24 horas. Un estudio previo del tratamiento indicó que el tratamiento con 10 µg/ml, 100 µg/ml o 340 µg/ml no mostraría ninguna diferencia en la magnitud de la eliminación. Por lo tanto, se eligieron 10 µg/ml de tobramicina para el presente estudio. La eficacia de la eliminación se evaluó usando tinciones de células vivas y muertas, y microscopia confocal láser de barrido (CSLM) y mostró casi 100% de eliminación de la biopelícula cultivada en presencia de ajoeno [el ajoeno no había sido sometido a p. ej. purificación por HPLC] y tratada a continuación con tobramicina (Fig. 6A). Este efecto sinérgico también se evaluó utilizando la cepa clínica de FQ CF438 (un primer aislamiento de un niño diagnosticado con FQ) que posee sistemas de PQ funcionales y nuevamente se detectó casi el 100% de eliminación de la biopelícula (Fig. 6B).

Para examinar el efecto de un tratamiento de combinación de ajoeno y tobramicina *in vivo* utilizamos un modelo de infección por cuerpo extraño [L.D. Christensen et al., Microbiology, 2007, 153, p. 2312-2320]. Se introdujeron implantes de tubo de silicona con un tamaño de 4 mm (diámetro interno 4 mm/diámetro externo 6 mm) previamente colonizados con *P. aeruginosa* de tipo silvestre, en la cavidad peritoneal de ratones. Los tratamientos se inyectaron por vía subcutánea cada 24 horas, donde los tratamientos con ajoeno y tobramicina se iniciaron 2 días antes de la

inserción y 24 horas post inserción, respectivamente. 72 horas después de la inserción se retiraron los implantes de los ratones y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por implante. Encontramos que el tratamiento de *P. aeruginosa* silvestre con una combinación de ajoeno y tobramicina resultó en una depuración significativamente más rápida de los implantes en comparación tanto con el grupo placebo como con los de un sólo tratamiento con ajoeno o con tobramicina ($p < 0.0001$, $p = 0.009$ y $p = 0.01$, respectivamente). También se observó una diferencia significativa en la depuración entre el grupo del placebo y los grupos de un sólo tratamiento ($p = 0.008$ y $p < 0.0001$). No encontramos una diferencia significativa en la depuración entre los dos grupos de un sólo tratamiento ($p = 30$) (Fig. 6C). Se usó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4.

Demostramos *in vitro* que la adición de 100 µg/ml de ajoeno a una biopelícula seguida de la adición de 10 µg/ml de tobramicina elimina casi el 100% de la biopelícula en tanto la presencia sólo de tobramicina o de ajoeno resulta en una eliminación menor o ninguna eliminación de las bacterias de la biopelícula. Está documentado que la liberación de ADN es controlada por PQ que tomándola en consideración y combinada con nuestros resultados apunta a una posible atenuación de la liberación de ADN por el ajoeno.

Ejemplo 10: Tratamiento con ajoeno de una infección pulmonar por *P. aeruginosa*

En este estudio se administró ajoeno profilácticamente y posteriormente se continuó después de la infección. Las inyecciones se administraron por vía subcutánea en el peritoneo. Llevamos a cabo tres experimentos individuales de tratamiento *in vivo* con ajoeno en el modelo murino de infección pulmonar con *P. aeruginosa* PAO1, los ratones BALB/c fueron provocados por vía intratraqueal (el día 0) con perlas de alginato que contenían 1.5×10^8 UFC/ml de *P. aeruginosa*. Los dos grupos de ratones o no se trataron (placebo) o se trataron con ajoeno 25 µg/g de ratón una vez al día. Los ratones recibieron dos días de tratamiento profiláctico o placebo antes de la provocación bacteriana. El tratamiento se continuó durante tres días. La enumeración por recuento en placa mostró una diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo de control el día tres. Al combinar los experimentos se observó una diferencia significativa en el día tres ($p < 0.002$) con una diferencia de 500 veces en la depuración entre los grupos (Fig. 7). Esto es concordante con los resultados obtenidos por Bjarnsholt et al (2005) en un modelo similar de infección pulmonar en el cual se utilizó como tratamiento extracto de ajo crudo [T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880]. Los ratones toleraron bien la dosis administrada de 25 µg/g de peso corporal.

Experimentos similares que comparaban la capacidad del ajoeno para inducir la depuración de infecciones por *P. aeruginosa* como se describió precedentemente, cuando se utilizó a muy alta pureza (>99.5%, purificado por HPLC) o a purezas del 95% al 99.5%, (es decir, ajoeno crudo o ajoeno sometido a un solo paso de cromatografía en columna) demostraron que el ajoeno de muy alta pureza no era eficaz para depurar la infección pulmonar, mientras que el ajoeno con 95-99.5% de pureza sí lo era (Figura 8, gráfico superior e inferior, respectivamente). Esto pone de relieve que una síntesis que proporcione un producto de ajoeno "crudo" suficientemente puro es esencial para evitar el uso de la purificación por HPLC, ya que este paso tiene un efecto perjudicial sobre la actividad biológica. Por consiguiente, el proceso de la presente que proporciona ajoeno en una pureza superior al 95% e inferior al 99.5% después del procesamiento y opcionalmente la cromatografía en columna, tiene una ventaja sorprendente sobre el estado anterior de la técnica. Se usó (E,Z)-ajoeno con una relación E:Z de 1:4.

Al comparar los presentes estudios con ajoeno con estudios anteriores con extractos de ajo, el presente estudio ofrece una indicación convincente de que el ajoeno y los derivados cercanos son los principales principios activos del ajo que pueden reducir una infección por *P. aeruginosa*.

Conclusión

En conclusión hemos demostrado el uso de ajoeno para atenuar la virulencia de *P. aeruginosa in vivo* por inhibición de la transcripción de un puñado de genes de virulencia importantes controlados por PQ en *P. aeruginosa*. A partir de nuestro análisis transcriptómico hemos sugerido que un posible objetivo del ajoeno es el sistema de PQ Rhl. Vale la pena reconocer que la inhibición de PQ no elimina la capacidad de la *P. aeruginosa* de formar una biopelícula. Sin embargo, todos los datos disponibles indican que una biopelícula deficiente en PQ es sin embargo más frágil en comparación con la biopelícula competente en PQ. Puesto que por ejemplo falta el ADN del componente de la matriz (la producción de la matriz es controlada por PQ Rhl) la biopelícula es sensible a las fuerzas y puede desprenderse dependiendo de las fuerzas hidrodinámicas. Además, puesto que no se forma ramnolípido, la biopelícula se convierte en sensible a la acción de los PMN (porque los PMN no son eliminados cuando entran en contacto con la biopelícula). Hemos demostrado previamente que las biopelículas *in vitro* de bacterias deficientes en PQ pueden ser fagocitadas por PMN recién aislados en contraste con biopelículas competentes en PQ. Es fundamental para la tolerancia de la biopelícula a los PMN que la producción de ramnolípido forme un escudo protector contra los PMN entrantes y tenemos varios datos que respaldan que este también es el caso. Utilizar inhibidores de PQ debe por lo tanto aumentar en gran medida las propiedades antimicrobianas de los PMN y permitirles erradicar eficazmente a las bacterias formadoras de biopelícula. Además, el ramnolípido lisa los PMN que posteriormente derraman su contenido de ADN, enzimas hidrolíticas y radicales de oxígeno. Esto crea un "círculo malvado" particularmente con respecto al daño tisular, aumentando la inflamación y la inducción de mutaciones en *P. aeruginosa* cuyo aspecto del fenotipo mucoso contribuye significativamente a las exacerbaciones.

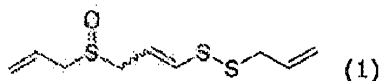
La disminución en la infección en los experimentos de ratón, la eliminación de biopelícula *in vitro* en un experimento de combinación con tobramicina sugieren el potencial del uso del ajoeno como un futuro fármaco antimicrobiano para el tratamiento de infecciones crónicas por *P. aeruginosa*.

5 References

- W. C. Fuqua et al., J. Bacteriol., 1994, 176, p 269-275
- T. Bjarnsholt et al., Microbiology, 2005, 151, p. 3873-3880
- 10 • R. Naganawa et al., Applied and Environmental Microbiology, 62, 1996, p. 4238-4242
- EP 185324
- Block et al., J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, p. 7045-7055
- US 4,665,088
- WO 2010/100486
- 15 • M. Hentzer et al., EMBO J., 2003, 22, p. 3803-3815
- Rasmussen et al., Microbiology, 2005, 151, p. 1325-1340
- [V. E. Wagner et al., J Bacteriol., 2003, 185, p. 2080-2095
- R. Rahim et al., Mol Microbiol., 2001, 40, p. 708-718]
- B. B. Christensen et al., Methods Enzymol., 1999, 310, p. 20-42
- 20 • T. Brandt et al., Thorax, 1995, 50, p. 880-882
- P. M. Mendelman, 1985, Am Rev Respir Dis., 132, p. 761-765
- L.D. Christensen et al., Microbiology, 2007, 153, p. 2312-2320

REIVINDICACIONES

1. (E,Z)-ajoeno de fórmula (1)



para usar en el tratamiento de infecciones bacterianas, donde la infección bacteriana es una infección por una bacteria formadora de biopelícula.

2. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con la reivindicación 1, donde la bacteria formadora de biopelícula es una bacteria gramnegativa.

3. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la bacteria se elige del grupo que consiste en *Vibrio fischeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia Stewartii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*.

4. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa*.

5. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la infección bacteriana es en los pulmones.

6. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la infección bacteriana es en una herida crónica.

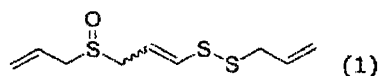
7. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la infección bacteriana es en un mamífero con inmunodeficiencia.

8. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con la reivindicación 7, donde la inmunodeficiencia se debe a una enfermedad inmunodepresora o a una terapia con medicamentos inmunosupresores.

9. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el mamífero se elige del grupo que consiste en seres humanos, mascotas y ganado.

10. (E,Z)-ajoeno destinado al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la infección bacteriana es en un mamífero que sufre de fibrosis quística.

11. Una composición que contiene (E,Z)-ajoeno de fórmula (1)



y al menos un antibiótico, donde el antibiótico se elige del grupo que consiste en aminoglucósidos, ansamicinas, carbacefem, carbapenems, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, monobactamas, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el antibiótico es un aminoglucósido.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 11, donde el antibiótico se elige del grupo que consiste en ampicilina, bacampicilina, indanil carbenicilina, mezlocilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, bencilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, metilicina, oxacilina, penicilina g, penicilina v, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-ácido clavulánico, nafcilina, cefadroxilo, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefaclor, cefamandol, cefonida, cefotetan, cefoxitina, cefprozil, ceftmetazol, cefuroxima, loracarbef, cefdinir, ceftibuteno, cefoperazona, cefixima, cefotaxima, cefpodoxima proxetil, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, azitromicina, claritromicina, clindamicina, diritromicina, eritromicina, lincomicina, troleandomicina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, ácido oxolínico, gemifloxacina, perfloxacina, imipenem-cilastatina, meropenem, aztreonam, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina, teicoplanina, vancomicina, demeclociclina,

- doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, mafenida, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, sulfametizol, rifabutina, rifampicina, rifapentina, linezolid, quinupristina-dalfopristina, bacitracina, cloranfenicol, fosfomicina, isoniazida, metenamina, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoina, nitrofurazona, novobiocina, polimixina, espectinomycin, trimetoprim, colistina, cicloserina, capreomicina, etionamida, pirazinamida, ácido para-aminosalicílico y etilsuccinato de eritromicina.
- 5 14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el antibiótico es tobramicina.
- 10 15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14 destinada al tratamiento de infecciones bacterianas, donde la infección bacteriana es una infección bacteriana por una bacteria formadora de biopelícula.
- 15 16. La composición destinada al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con la reivindicación 15, donde la bacteria es una bacteria gramnegativa.
- 20 17. La composición destinada al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-16, donde la bacteria se elige del grupo que consiste en *Vibrio fischeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter agglomerans*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia stewartii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*.
- 25 18. La composición destinada al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con la reivindicación 17, donde la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa*.
19. La composición destinada al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde la infección bacteriana es en los pulmones.
- 30 20. La composición destinada al tratamiento de infecciones bacterianas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde la infección bacteriana es en una herida crónica.

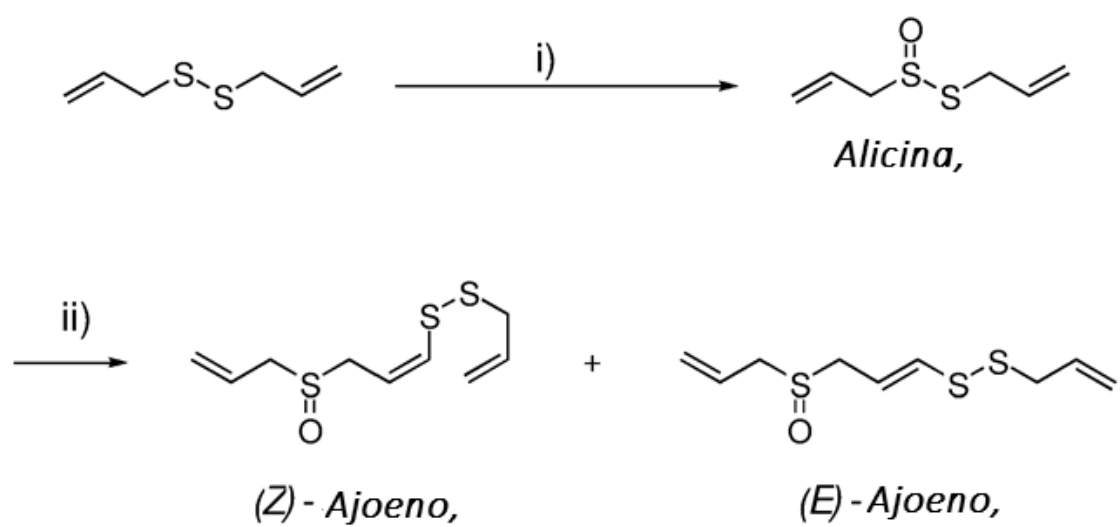


Fig. 1

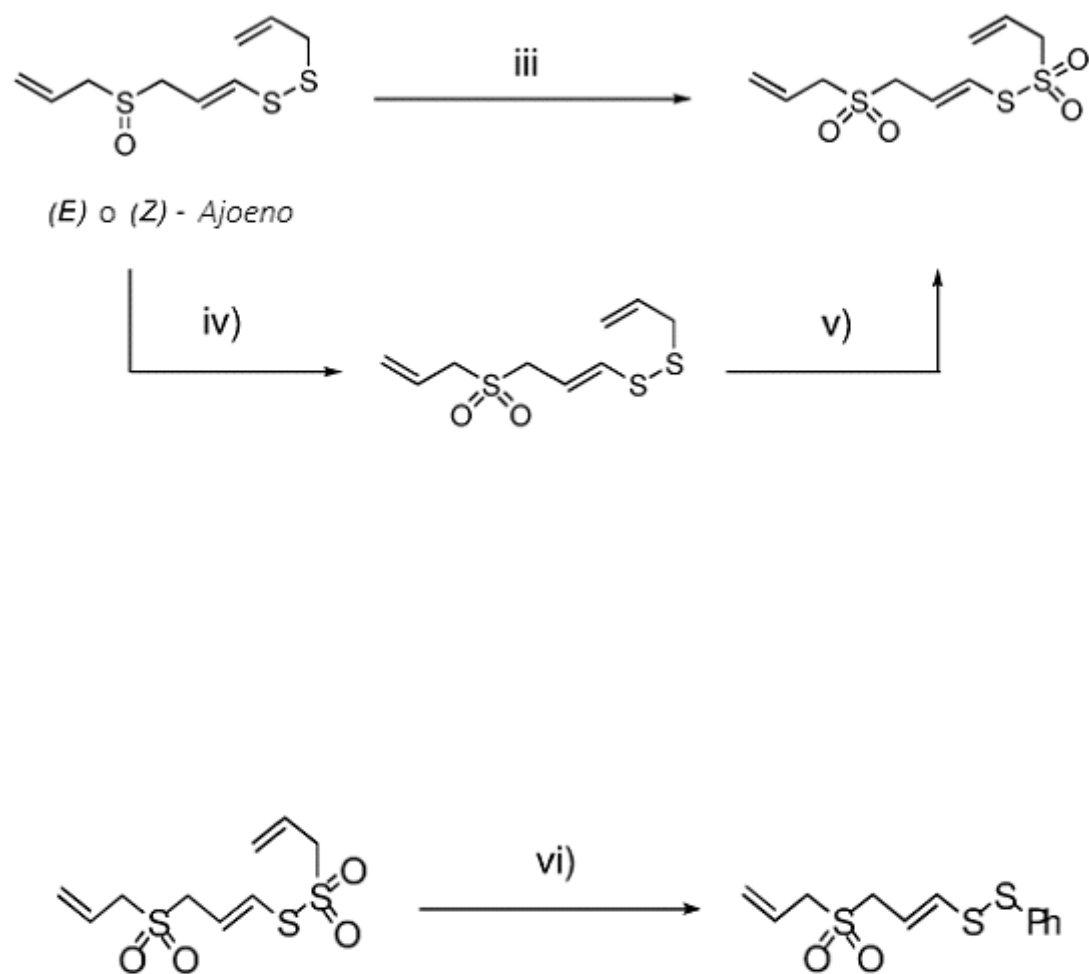


Fig. 2

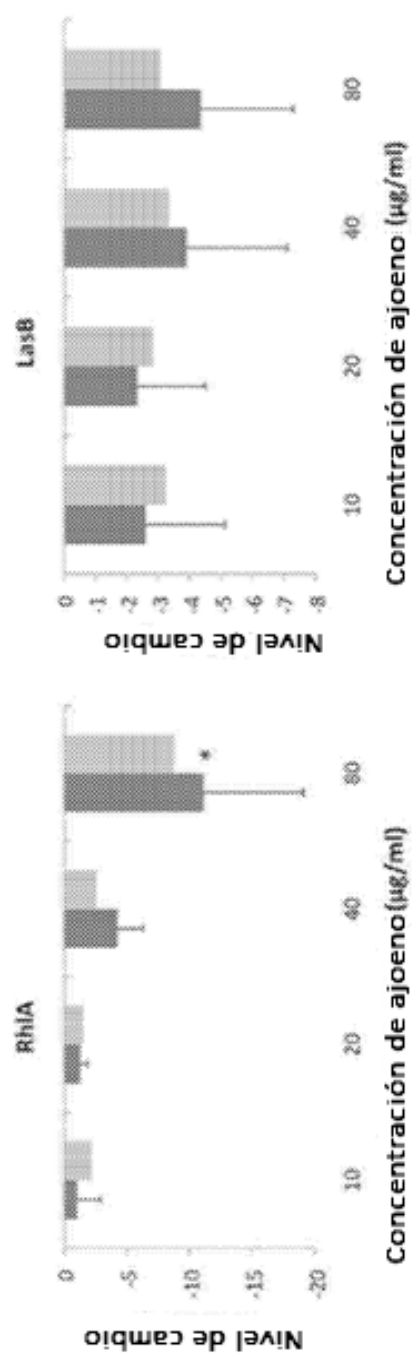


Fig. 3

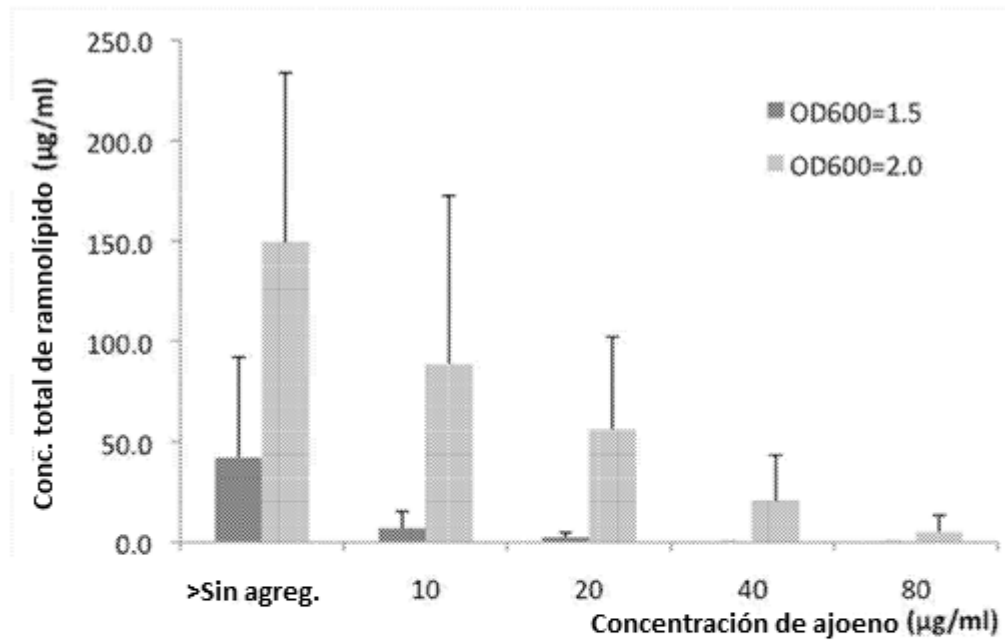


Fig. 4

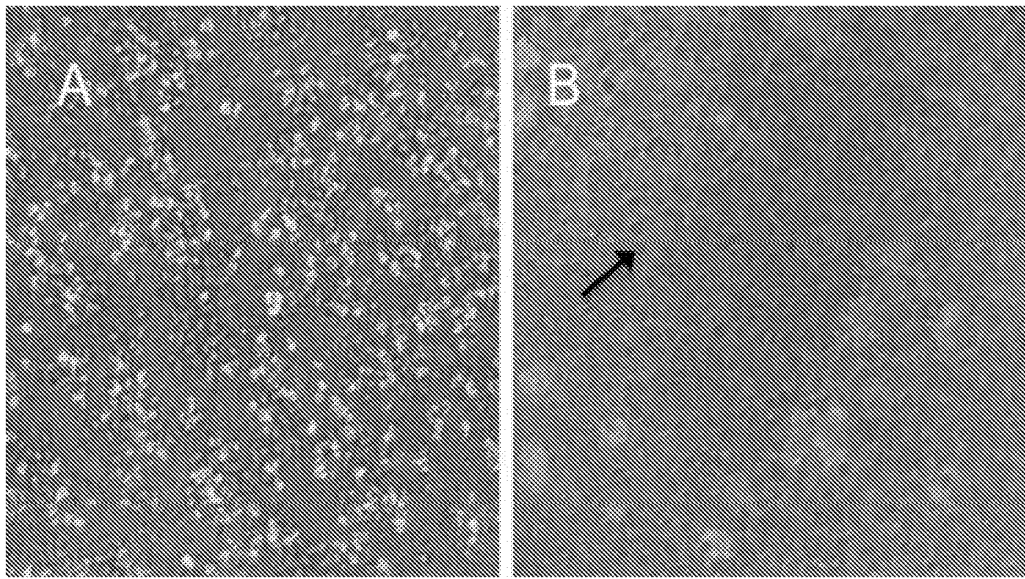


Fig. 5

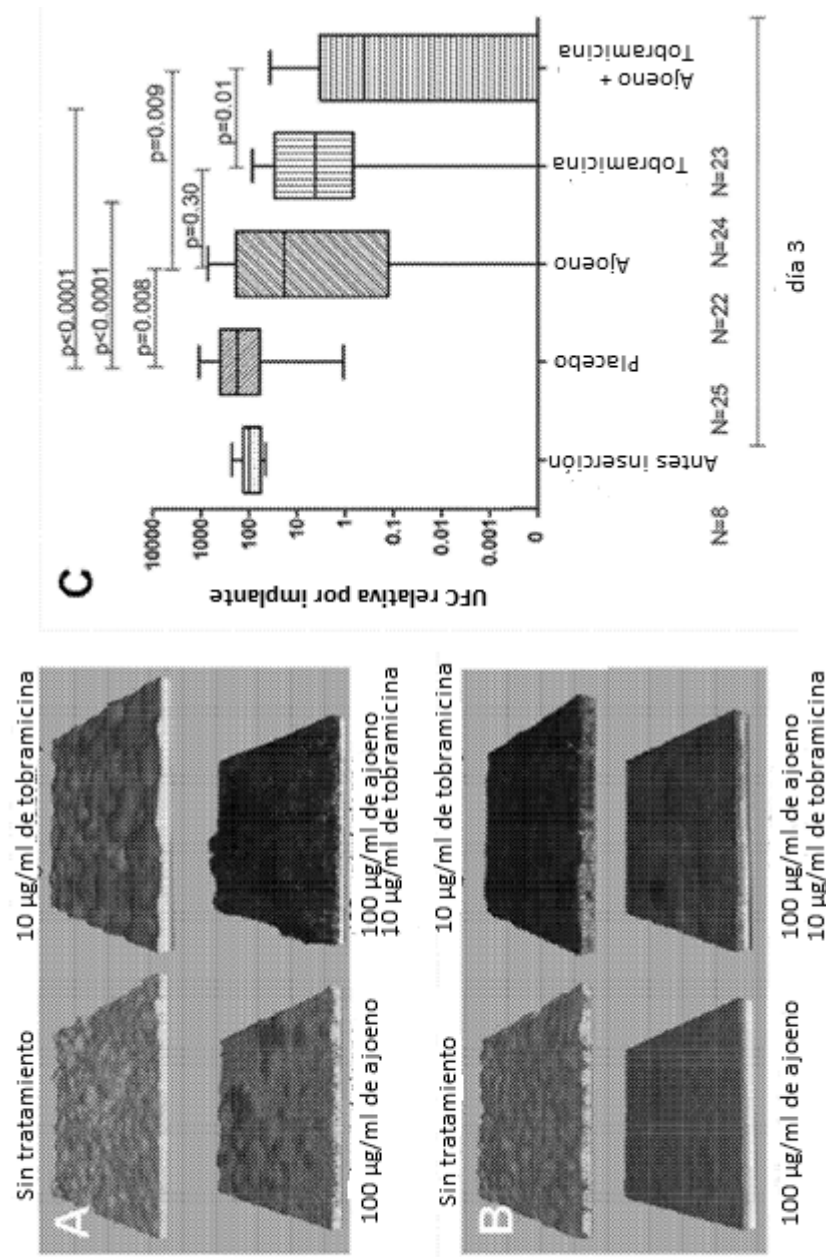


Fig. 6

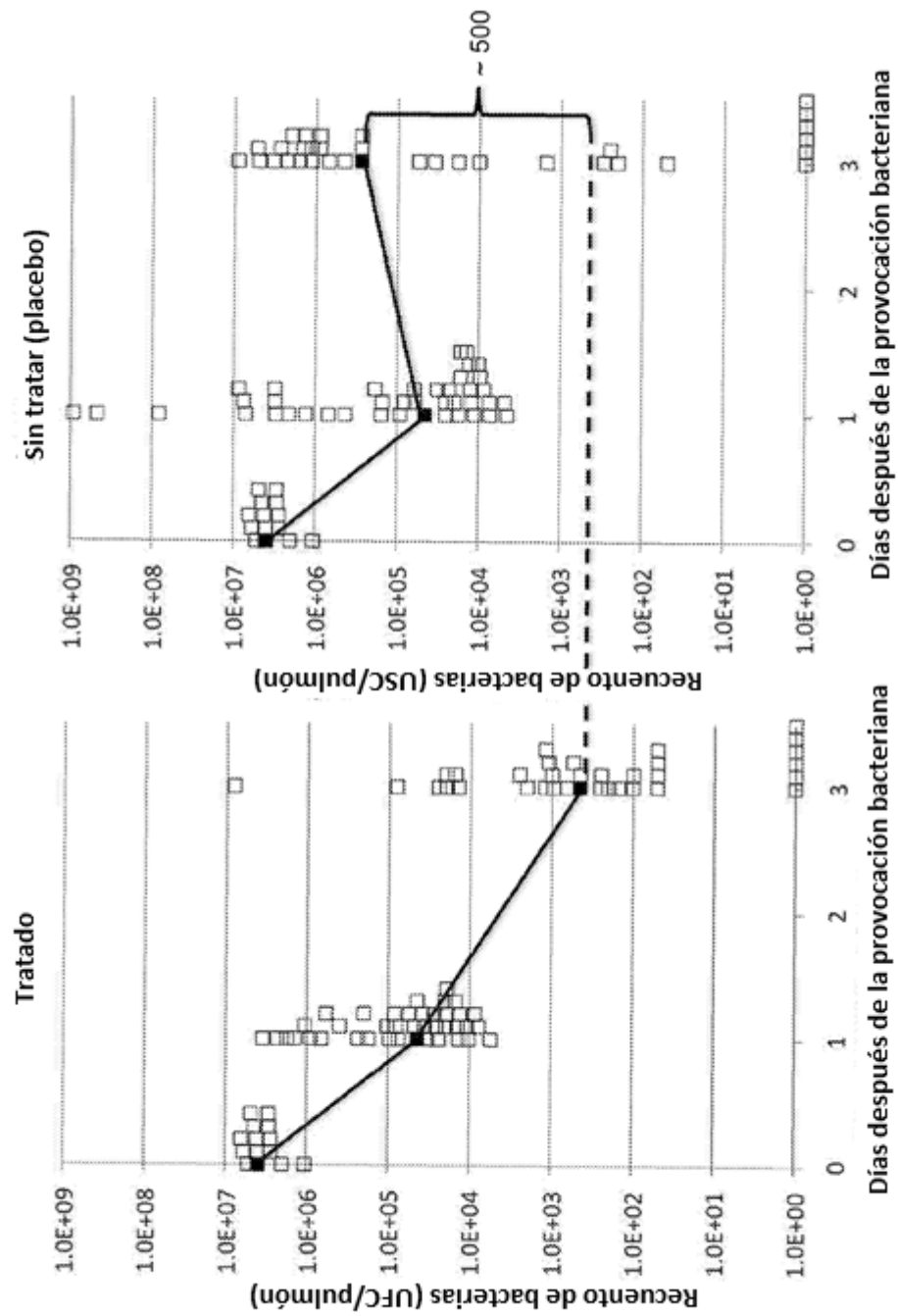


Fig. 7

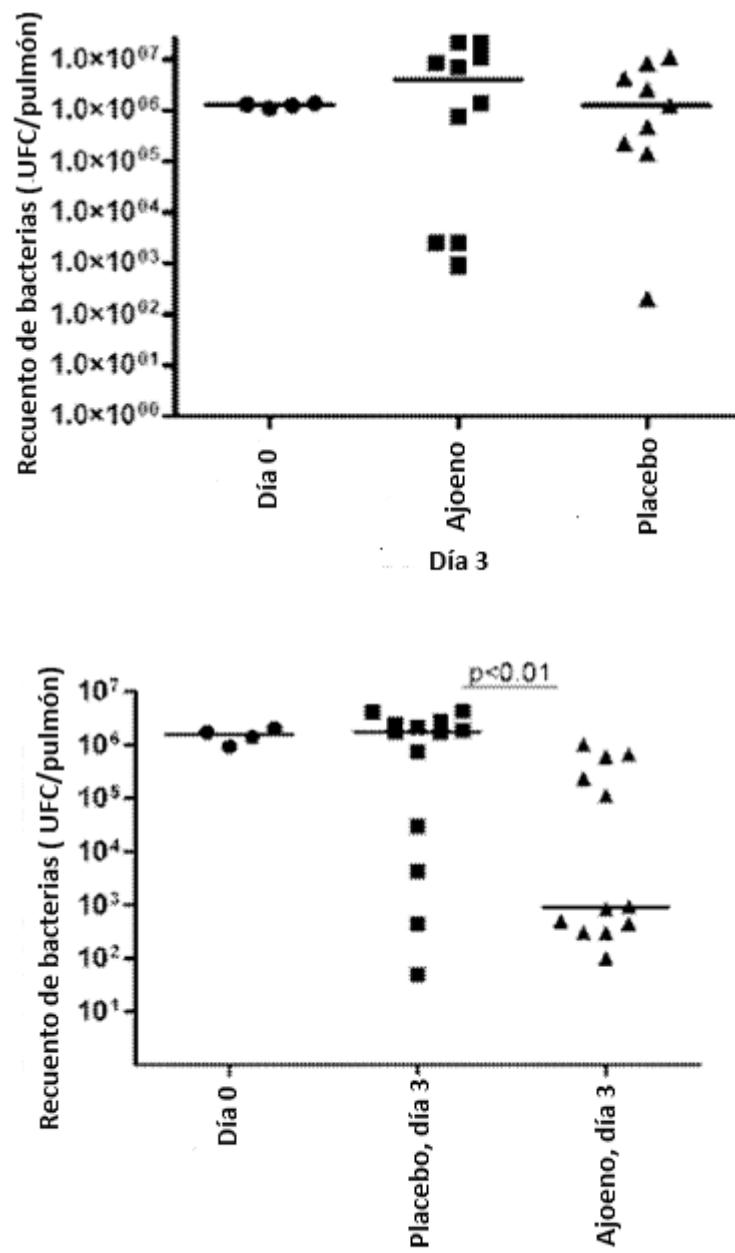


Fig. 8