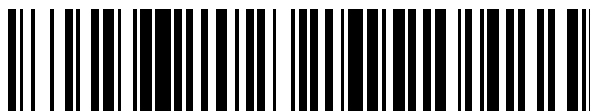


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 000**

51 Int. Cl.:

A61K 31/609 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/14 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2015 PCT/EP2015/070495**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16038035**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 15762551 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018 EP 3010511**

54 Título: **Uso antibacteriano de salicilanilidas halogenadas**

30 Prioridad:

12.09.2014 SE 1451054

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2018

73 Titular/es:

**ANTIBIOTX A/S (100.0%)
Tuborg Havnevej 18
2900 Hellerup , DK**

72 Inventor/es:

**DELAVENNE, EMILIE FLORA AURORE;
SIMON, DANIEL JEAN JACQUES;
SOMMER, MORTEN OTTO ALEXANDER y
TOFT-KEHLER, RASMUS VENDLER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 661 000 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

Uso antibacteriano de salicilanilidas halogenadas

5 Campo de la invención

10 La invención se refiere a las salicilanilida halogenada niclosamida y sales e hidratos de la misma para uso en el tratamiento tópico o prevención de ciertas afecciones causadas por bacterias Gram positivas tales como Staphylococcus, en particular Staphylococcus aureus y Streptococcus, en particular Streptococcus pyogenes. Las salicilanilidas halogenadas tienen una frecuencia de aparición de mutantes resistentes sorprendentemente baja en dichas cepas en comparación con antibióticos tópicos utilizados comúnmente.

Antecedentes de la invención

15 Hoy en día, existen muchas clases diferentes de antibióticos disponibles para los médicos. Sin embargo, muchas de las bacterias que van a tratar estos antibióticos que se diseñan rápidamente desarrollan resistencia a los fármacos en todas las clases. Desafortunadamente, las grandes compañías farmacéuticas han limitado su investigación para encontrar nuevos antibióticos. Diversas bacterias se han vuelto particularmente prominentes en los últimos años y han atraído la atención de los medios, particularmente el Staphylococcus aureus resistente a meticilina ('MRSA') y Streptococcus pyogenes. Las infecciones por MRSA sobre la piel y vías respiratorias son comunes en entornos hospitalarios y la resistencia de amplio espectro de las bacterias a casi todas las clases de antibióticos (por ejemplo, meticilina, ácido fusídico y mupirocina) las hace particularmente difíciles de combatir. Las infecciones por MRSA en pacientes que no han estado recientemente en el hospital (las llamadas infecciones por MRSA adquiridas en la comunidad) son cada vez más frecuentes.

25 El problema de la resistencia a los antibióticos es un problema creciente, pero aún no ha surgido una solución verdaderamente integral al problema. Un problema importante en la batalla contra la resistencia a los antibióticos es la falta de nuevos antibióticos para reemplazar a aquellos que ya no tratan efectivamente a los organismos debido al desarrollo de resistencia. Se necesitan urgentemente nuevos tratamientos para abordar este problema de resistencia a los fármacos.

35 El ácido fusídico es un antibiótico derivado de Fusidium coccineum que se ha utilizado durante más de 35 años para tratar infecciones por Staphylococcus aureus. En particular, el ácido fusídico se prescribe para infecciones de la piel provocadas por Staphylococcus aureus. Dichas infecciones incluyen impétigo, queilitis angular (una infección alrededor de la boca) y dermatitis infectada. Este funciona al detener el crecimiento de las bacterias que provocan la infección.

40 La resistencia al ácido fusídico en S. aureus se puede seleccionar fácilmente mediante exposición in vitro al antibiótico, lo que lleva a la recomendación de que para la terapia sistémica, solo se debe administrar el ácido fusídico en combinación con otro agente. Más controvertido es el uso de ácido fusídico tópico en el tratamiento de infecciones cutáneas y de tejidos blandos.

45 El aumento de la resistencia al ácido fusídico en Staphylococcus aureus podría ser importante por tres razones. En primer lugar, podría significar que el ácido fusídico sistémico ya no se puede utilizar en situaciones donde está clínicamente indicado. En segundo lugar, puede ocurrir un fracaso del tratamiento tópico, especialmente en entornos de atención primaria donde el tratamiento suele ser a menudo empírico. En tercer lugar, la resistencia al ácido fusídico podría estar vinculada a otras resistencias a antibióticos, favoreciendo de esta manera la propagación de Staphylococcus aureus resistente a múltiples antibióticos, como el MRSA (S. aureus resistente a la meticilina).

50 La mupirocina es un antibiótico tópico utilizado para tratar infecciones cutáneas superficiales y para controlar la diseminación del Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA). Se observó resistencia a mupirocina poco después de que estuvo disponible. La prevalencia de la resistencia a la mupirocina entre los aislados de MRSA se ha descrito principalmente en pacientes adultos y ancianos hospitalizados con amplia variabilidad, que varía desde 0 hasta 65% de los aislados. Se ha mostrado que las tasas de resistencia se correlacionan con un mayor uso en entornos de pacientes hospitalizados cerrados. Ahora se recomiendan recetas de mupirocina muy restrictivas para tratamiento local.

55 El impétigo es una infección bacteriana altamente contagiosa de las capas superficiales de la epidermis. El impétigo es una de las enfermedades cutáneas más comunes entre los niños, que representa aproximadamente el 10% de las enfermedades de la piel tratadas en clínicas pediátricas de EE. UU. Las bacterias que normalmente se consideran responsables son Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes, y a menudo una combinación de ambas. El impétigo generalmente se transmite por contacto directo, pero los fómites también cumplen una función importante. Con mayor frecuencia se está encontrando el Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA) como una bacteria que provoca el impétigo. El impétigo tiene tres variedades clínicas comunes: impétigo contagioso (impétigo común), impétigo ampolloso y ectima. Sin embargo, las características de los tres tipos de impétigo, pueden coexistir en cualquier paciente individual.

65

Se conoce una serie de composiciones tópicas que contienen ingredientes farmacéuticamente activos para el tratamiento del impétigo. La mupirocina tópica al 2% (ungüento y crema Bactroban) es una opción de tratamiento, al igual que los tratamientos más antiguos, como la violeta de genciana tópica y la vioforma. Para muchos pacientes, la mupirocina es una opción de tratamiento viable para MRSA, sin embargo, se ha reportado ampliamente la resistencia de las bacterias a la mupirocina.

El ácido fusídico tópico al 2% (crema Fucidin) se utiliza para el tratamiento del impétigo y se considera que es igual de eficaz que la mupirocina. Sin embargo, la utilidad del ácido fusídico para el tratamiento del impétigo está limitada por el problema del desarrollo de la resistencia, como se discutió anteriormente.

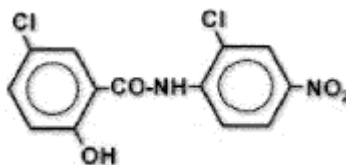
El *Staphylococcus aureus* resistente a ácido fusídico (FRSA) se ha identificado como una bacteria causante en brotes de impétigo y su aparición se ha asociado con un mayor uso del ácido fusídico tópico. De acuerdo con lo anterior, la utilidad del ácido fusídico como agente de primera línea para el tratamiento del impétigo es cuestionable debido a los niveles de resistencia actuales en las bacterias objetivo. La retapamulina al 1% (pomada Altabax), recientemente aprobada por la FDA, es un fármaco en la nueva clase de antibióticos de pleuromutilina para el tratamiento tópico del impétigo debido a *Staphylococcus aureus* (solo susceptible a meticilina) o *Streptococcus pyogenes*.

Una herida es una lesión del cuerpo (como consecuencia de violencia, accidente o cirugía) que normalmente implica laceración o rotura de una membrana (como la piel) y, por lo general, daños a los tejidos subyacentes (Merriam Webster Dictionary). Las quemaduras son lesiones en los tejidos provocadas por el calor, la fricción, la electricidad, la radiación o los productos químicos. Las heridas y quemaduras a menudo son colonizadas por patógenos microbiológicos, que incluyen bacterias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; y bacterias Gram-negativas, por ejemplo *Pseudomonas aeruginosa*.

A pesar de la ocurrencia muy común de infecciones de la piel, solo está aprobado un número limitado de antibióticos tópicos para el tratamiento de heridas y particularmente heridas infectadas. La mupirocina (Bactroban) es un antibiótico, desarrollado por GSK. La resistencia emergente a la mupirocina se está convirtiendo en una preocupación. En los aislados de estafilococos negativos a coagulasa, las tasas de resistencia a la mupirocina son mayores, variando desde 12.7% en Europa hasta 38.8% en los Estados Unidos. La retapamulina (Altabax, GSK) es otro antibiótico tópico utilizado para el tratamiento de heridas. La fucidina (LEO Pharma) también es efectiva en infecciones cutáneas primarias y secundarias provocadas por cepas sensibles de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* especies y *Corynebacterium minutissimum*.

Las infecciones bacterianas son una de las principales causas de muerte en todo el mundo, y la resistencia bacteriana está reduciendo en gran medida las opciones de tratamiento disponibles. Por lo tanto, subsiste la necesidad de nuevos antibióticos, para los cuales no está entendido el desarrollo de resistencia en las bacterias objetivo, para la prevención y tratamiento de infecciones tópicas provocadas o contribuidas a bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* está fuertemente justificado.

Las salicilanilidas halogenadas son una serie de compuestos generalmente utilizados como agentes antihelmínticos. Uno de dichos compuestos es la niclosamida (5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-2-hidroxibenz-amida; también conocida como 2',5-dicloro-4'-nitrosalicilanilida, 2-hidroxi-5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-benzamida, 5-cloro-2'-cloro-4'-nitrosalicilanilida o 5-cloro-N-(2-cloro-4-nitrofenil)-salicilamida):



Niclosamida

Toxicidad aguda de niclosamida:
 LD₅₀, ratones, p.o., >5000 mg/kg
 LD₅₀, ratas, p.o., 5000 mg/kg
 LD₅₀, ratas, dérmico, 2000 mg/kg
 LD₅₀, conejos, p.o., 5000 mg/kg
 LD₅₀, gatos, p.o., >1000 mg/kg

La niclosamida es un agente teniacida (= asesino de tenia) que es efectiva contra varias tenias parásitas del ganado y las mascotas (por ejemplo *Taenia* spp., *Moniezia* spp) y también contra las platijas del rumen (*Paramphistomum* spp) y los parásitos sanguíneos (*Schistosoma* spp). Esto está en contraste con la mayoría de las otras salicilanilidas, que generalmente exhiben actividad como flucicidas pero no como tenicidas.

La niclosamida se utiliza actualmente en humanos como un fármaco antihelmíntico para tratar infecciones intestinales y muestra una baja toxicidad general, es poco soluble en agua, muestra una baja absorción intestinal y una vez en el

torrente sanguíneo se elimina rápidamente a través del tracto urinario o por metabolismo enzimático en el hígado. Terapéuticamente es útil contra cestoda en humanos.

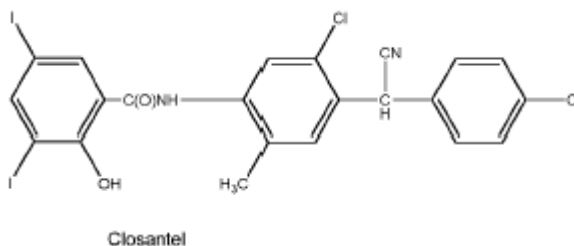
5 La Niclosamida también ha mostrado que previene la penetración de *Schistosoma mansoni* a través de la piel humana. También se utiliza como fármaco contra el cáncer, como pesticida y como fármaco contra el tripanosoma. Prácticamente todas las aplicaciones y las aplicaciones propuestas de niclosamida se dirigen a organismos eucarióticos.

10 La Niclosamida también ha mostrado inhibir la replicación viral en células humanas. Sin embargo, se considera que el mecanismo se dirige a células anfitrionas humanas para proporcionar condiciones que eviten la vida viral en lugar de dirigirse específicamente al virus. De acuerdo con lo anterior, la aplicación viral de niclosamida resulta en su capacidad para dirigirse a un proceso eucariótico.

15 La niclosamida está disponible comercialmente en una serie de formulaciones que incluyen, pero no se limitan a Bayer73®, Bayer2353®, Bayer25648®, Bayluscid®, Baylucide®, Cestocid®, Clonitralid, Dichlosale®, Fenasal®, HL 2447®, lomesan®, lomezan®, Manosil®, Nasemo®, Niclosamid®, Phenasal®, Tredemine®, Sulqui®, Vermitid®, Vermitin® y Yomesan®.

Otros compuestos de salicilanilida halogenada con

20 • Closantel, (N-[5-cloro-4-[(4-clorofenil)cianometil]-2-metilfenil]-2-hidroxi-3,5-diiodobenzamida) se utiliza como un antihelmíntico veterinario:



25 Toxicidad aguda de closantel:

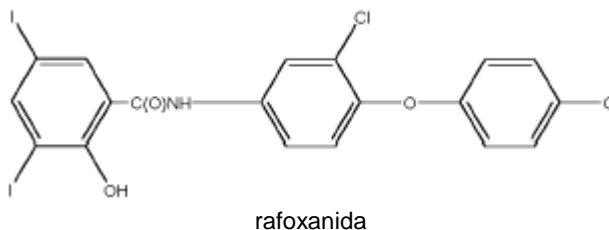
LD₅₀, ratas, p.o., 262-342 mg/kg (dependiendo del estudio), mediana 302 mg/kg

LD₅₀, ratas, s.c., 67 mg/kg

LD₅₀, ratones, p.o., 331 mg/kg

30 LD₅₀, ratones, i.m., 57 mg/kg

• La rafoxanida (3'-cloro-4'-(p-clorofenoxi)-3,5-diiodosalicilanilida) se conoce para uso veterinario como un fasciolicida y anthelmíntico.



35

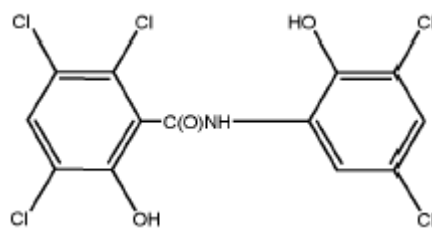
Toxicidad aguda de rafoxanida:

40 LD₅₀, ratas, p.o., 980->2000 mg/kg (dependiendo del estudio), mediana >1490 mg/kg

LD₅₀, ratones, p.o., 232-300 mg/kg (dependiendo del estudio), mediana 266 mg/kg

LD₅₀, conejos, p.o., 3200 mg/kg

45 • Se conoce la oxiclozanida (3,3',5,5',6-pentacloro-2'-hidroxisalicilanilida), para uso veterinario como un antihelmíntico, principalmente contra trematodos un antihelmíntico, principalmente contra trematodos.



oxiclozanida

LD₅₀, ratas, p.o., 980-3519 mg/kg (dependiendo del estudio), mediana 2250 mg/kg

LD₅₀, ratones, p.o., 300 mg/kg

LD₅₀, conejos, p.o., 3200 mg/kg

Bajo margen de seguridad después de administración

El modo de acción molecular de las salicilanilidas, que incluyen niclosamida, no está completamente dilucidado. Todos ellos son desacopladores de la fosforilación oxidativa en la mitocondria celular, lo que altera la producción de ATP. Esto afecta la motilidad de los parásitos y probablemente también otros procesos. La niclosamida también actúa sobre las tenias a través de la inhibición de la absorción de glucosa

Se ha propuesto la niclosamida como un posible tratamiento sistémico para las infecciones pulmonares crónicas provocadas por la proteobacteria *Pseudomonas aeruginosa* y la actinobacteria *Mycoplasmum tuberculosis*. Se ha demostrado que la niclosamida reduce la respuesta de detección de quórum, así como la producción de metabolitos de detección de quórum en *P. aeruginosa*. Dado que la detección de quórum se considera un proceso importante para la patogenicidad durante las infecciones pulmonares crónicas provocadas por esta bacteria, llevó a la propuesta de que se podría utilizar la niclosamida como terapia adyuvante para estas infecciones. La niclosamida no afecta el crecimiento de *P. aeruginosa* y, de acuerdo con lo anterior, no tiene ninguna actividad antibacteriana directa. La concentración requerida para la actividad óptima fue de 20 μ M, sin embargo, se detectó algo de inhibición a 1 μ M. (F. Imperi et al., *Antimicrobial, Agents and Chemotherapy*, 557(2), 996-1005 (2013)).

Ghazi et al. (*Zentralbl. Mikrobiol.* 141 (1986), 225-232) probaron el efecto antibacteriano y la toxicidad de los derivados de salicilanilida sintetizados contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, pero no se menciona nada sobre la velocidad de desarrollo de la resistencia.

J. Vinsova et al. describe la actividad antibacteriana de las salicilanilidas (*Molecules*, vol. 12, no. 1, pp. 1-12, 2007; *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 19, no. 2, pp. 348-351, 2009; *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 6106-6113, 2010), pero en ninguna parte se menciona el problema con el desarrollo de la resistencia.

M. J. Macielag et al. probaron la actividad antibacteriana del closantel y derivados relacionados contra los organismos resistentes a los medicamentos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VREF) (*J. Med. Chem.*, 41(16), 2939-45 (1998)) pero en ninguna parte se mencionó el problema con el desarrollo de la resistencia. DJ. Hlasta et al. encontraron que el closantel tenía actividad antibacteriana contra *S. aureus* resistente a fármaco y *E. faecium* (*Bioorg. Med. Chem. Letters*, 8(14), 1923-28 (1998)), pero en ninguna parte se mencionaba el problema del desarrollo de la resistencia.

R. Rajamuthiah et al. identificó el closantel como un acierto en un ensayo de cribado de líquidos de alto rendimiento y encontró actividad antiestafilocócica del closantel contra aislados de *S. aureus* resistentes a vancomicina y otras bacterias Gram-positivas. No se menciona el problema del desarrollo de la resistencia (*PLoS One*, 2014, 9(2): e89189).

El documento WO 2008/155535 describe el uso de salicilanilidas halogenadas para el tratamiento del acné, en el que las propionibacterias son las que provocan el acné. No se menciona el problema con el desarrollo de la resistencia.

El documento US 3,914,418 describe las salicilanilidas como agentes antibacterianos activos y, en particular, son efectivos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas gerugirosa* y *Proteus vulgaris*.

Resumen de la invención

Muchas bacterias son resistentes a, o desarrollan rápidamente resistencia contra agentes antibióticos y, por lo tanto, indeseable o inefectivo tratar a un mamífero que padece una enfermedad bacteriana tópica o infección provocada por bacterias que son resistentes a los antibióticos. Se describe aquí el uso tópico de una salicilanilida halogenada nicosamida para el tratamiento de ciertas infecciones provocadas por bacterias Gram positivas. El uso tópico de las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con la invención tiene una frecuencia sustancialmente reducida de mutantes resistentes espontáneos en comparación con los antibióticos tópicos utilizados comúnmente.

En un primer aspecto de la invención se proporciona una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma, para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram positivas, en la que las bacterias Gram positivas no son una propionibacteria; y en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica infecciones

relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis, ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna y úlceras diabéticas.

5 En un segundo aspecto de la invención se proporciona una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma, para uso en la prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas que son resistentes a un fármaco seleccionado de ácido fusídico, mupirocina y retapamulina; en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis, ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna y úlceras diabéticas; opcionalmente en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana y dermatitis atópica.

15 Los inventores han descubierto que la salicilanilida halogenada niclosamida o una sal farmacéuticamente aceptable de o hidrato la misma es altamente efectiva contra bacterias Gram-positivas, tales como Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes e inesperadamente también son muy efectivas para reducir el desarrollo de bacterias resistentes, tales como aquellas mencionadas anteriormente. Se espera que los compuestos sean agentes tópicos muy útiles para uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades o infecciones. Ejemplos de enfermedades que se pueden tratar mediante administración tópica de la salicilanilida halogenada incluyen impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis (ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna, úlceras diabéticas y similares).

25 En una realización el ingrediente activo es niclosamida o un derivado de la misma o como un hidrato de la misma tal como monohidrato de niclosamida, o una sal de la misma tal como su sal de etanolamina, o sal de piperazina u otras sales o hidratos adecuados de dichas sales.

30 La niclosamida es bacteriostática para S. aureus (véase Figura 1), es decir, previene el crecimiento, pero no mata a la bacteria. Sorprendentemente, se ha encontrado que la niclosamida tiene un efecto igualmente bueno sobre las cepas de S. aureus resistentes a meticilina, el ácido fusídico y la mupirocina como cepas no resistentes (véase Figura 2). Las pruebas biológicas (entre otras cosas) también han revelado inesperadamente que las salicilanilidas halogenadas, y particularmente la niclosamida, tiene una tasa de mutación menor contra MRSA 01 que los compuestos como ácido fusídico, mupirocina y retapamulina (véase Tabla 4).

35 Puede ser que la salicilanilida halogenada es niclosamida en la forma de base libre del compuesto. Puede ser que la salicilanilida halogenada sea una sal de niclosamida farmacéuticamente aceptable.

40 Se puede utilizar la niclosamida como una formulación farmacéutica tópica que comprende la salicilanilida halogenada nicosamida o sales o hidratos de la misma, en la que los componentes de la formulación se seleccionan de tal manera que proporcionen un pH local de menos de 6 en el sitio de la infección.

45 Los inventores han descubierto que la actividad antibacteriana de las salicilanilidas halogenadas, por ejemplo niclosamida, es más alta a pH bajo que a pH neutro o básico. Puede ser que la formulación no comprenda un tampón o modificador de pH. Esto puede significar que la formulación no altera significativamente el pH naturalmente bajo de la piel en el sitio de la infección.

50 Puede ser que la salicilanilida halogenada, por ejemplo niclosamida, esté en la forma de una base libre. Las salicilanilidas halogenadas son normalmente ligeramente ácidas, ya que comprenden grupos fenólicos. Las sales de salicilanilidas halogenadas se forman normalmente con aminas (por ejemplo, etanolamina) que pueden proporcionar un aumento en el pH local.

55 La descolonización bacteriana puede ser una estrategia efectiva para reducir la incidencia de infecciones nosocomiales (adquiridas en el hospital), particularmente aquellas asociadas con MRSA. Muchas personas tienen MRSA sin síntomas. Descolonizar tales pacientes puede ser beneficioso para la prevención de la propagación del MRSA en un entorno hospitalario o para reducir el riesgo de que el paciente desarrolle una infección luego de un procedimiento quirúrgico o médico en el hospital.

60 También se divulga un método para tratar, prevenir o eliminar la colonización bacteriana por bacterias Gram positivas en un sujeto, el método comprende administrar tópicamente al sujeto una cantidad efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada nicosamida o una sal o hidrato de la misma. Por tanto, la invención puede proporcionar la salicilanilida halogenada niclosamida o una sal o hidrato de la misma, para uso en el tratamiento, prevención o eliminación de la colonización bacteriana en un sujeto por bacterias Gram positivas diferentes a propionibacterias mediante administración tópica.

65 Puede ser que la salicilanilida halogenada se administre tópicamente al sujeto antes de realizar un procedimiento quirúrgico en el sujeto. Puede ser que la salicilanilida halogenada se administre a la nariz del sujeto, ya sea por vía

intranasal o a la piel externa de la nariz. Por lo tanto, puede ser que la salicilanilida halogenada se administre tópicamente a la nariz del sujeto para realizar un procedimiento quirúrgico en la nariz o cara del sujeto.

5 Puede ser que las bacterias Gram-positivas desarrollen mutaciones espontáneas que confieren resistencia a la salicilanilida halogenada a una frecuencia de menos de 10^{-6} a la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la salicilanilida halogenada a las bacterias Gram positivas. Puede ser que las bacterias Gram-positivas desarrollen mutaciones espontáneas que confieren resistencia a la salicilanilida halogenada a una frecuencia de menos de 10^{-7} en la MIC de la salicilanilida halogenada a las bacterias Gram positivas. Puede ser que las bacterias Gram-positivas desarrollen mutaciones espontáneas que confieren resistencia a la salicilanilida halogenada a una frecuencia de menos de 10^{-8} en la MIC de la salicilanilida halogenada a las bacterias Gram positivas. Por lo tanto, puede ser que las bacterias Gram-positivas desarrollen mutaciones espontáneas que confieren resistencia a la salicilanilida halogenada a una frecuencia de menos de 4×10^{-9} en la MIC de la salicilanilida halogenada a las bacterias Gram positivas.

15 Puede ser que las bacterias Gram positivas no sean una propionibacteria. Puede ser que las bacterias Gram positivas se seleccionen desde *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*. Puede ser que la bacteria sea resistente a un fármaco seleccionado entre ácido fusídico, mupirocina y retapamulina. Puede ser que la bacteria sea *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA).

20 Puede ser que el tratamiento se administre por vía tópica durante 2 semanas o menos.

25 Puede ser que la salicilanilida halogenada esté comprendida en una formulación cuyos componentes se seleccionan de tal manera que proporcionen un pH local de menos de 6 en el sitio de la infección. Los inventores han descubierto que la actividad antibacteriana de las salicilanilidas halogenadas, por ejemplo niclosamida, es más alta a pH bajo que a pH neutro o básico. Por lo tanto, puede ser que la formulación no comprenda un tampón o un modificador de pH. Por lo tanto, puede ser que la salicilanilida halogenada, por ejemplo niclosamida, tenga la forma de una base libre. Los componentes de la formulación se pueden seleccionar de tal manera que proporcionen un pH local mayor que 4.5 (por ejemplo, mayor que 5) en el sitio de la infección. La referencia a un 'pH local' se refiere al pH en el sitio donde se aplica la formulación, por ejemplo, el pH en la superficie de la piel después de aplicar la formulación que contiene la salicilanilida halogenada.

30 Puede ser que la salicilanilida halogenada (niclosamida) esté en la forma de una base libre. Puede ser que la salicilanilida halogenada (niclosamida) no esté en la forma de un hidrato. Cuando la salicilanilida halogenada es niclosamida puede ser que no esté en forma de monohidrato.

35 Puede ser que las bacterias Gram-positivas no sean una cepa resistente a los antibióticos. Alternativamente, puede ser que las bacterias Gram-positivas sean una cepa resistente a antibióticos.

40 Puede ser que la infección o enfermedad sea en un humano o animal, por ejemplo, en el que la infección sea en un humano.

En algunas realizaciones, la población de bacterias Gram-positivas incluye bacterias Gram-positivas resistentes a antibióticos.

45 Puede ser que las bacterias Gram positivas no sean una propionibacteria, por ejemplo que no sea *Propionibacterium acnes*.

En algunas realizaciones, la población de bacterias Gram-positivas incluye bacterias gram-positivas de coccus. En algunas realizaciones, las bacterias Gram-positivas son del género *Streptococcus* o *Staphylococcus*.

50 En algunas realizaciones, las bacterias Gram-positivas son del género *Streptococcus*. Puede ser que las bacterias Gram-positivas sean *Streptococcus* seleccionadas de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus agalactiae* o *Streptococcus viridans*.

55 En algunas realizaciones, las bacterias Gram-positivas son *Streptococcus pyogenes*.

60 En algunas realizaciones, las bacterias Gram-positivas son del género *Staphylococcus*. Es posible que las bacterias Gram-positivas sean *Staphylococcus* seleccionadas de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* o *Staphylococcus lugdunensis*. En algunas realizaciones, las bacterias Gram positivas a coccus son *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina).

Las bacterias Gram-positivas descritas aquí pueden ser resistentes a otro fármaco antibiótico. Por ejemplo, las bacterias pueden ser resistentes a otro fármaco antibiótico distinto de una salicilanilida halogenada seleccionada de closantel, rafoxanida, oxiclozanida y o niclosamida, o un derivado de la misma. Puede ser que la bacteria sea resistente a un fármaco seleccionado entre ácido fusídico, mupirocina y retapamulina.

65

5 También se divulgan métodos para tratar un sujeto que tiene una infección bacteriana Gram-positiva que incluye la administración tópica a un sujeto que tiene una infección bacteriana Gram-positiva de una de las salicilanilida halogenada niclosamida o una sal o hidrato de la misma en cantidades suficientes para reducir la población de bacterias Gram-positivas en el sujeto. La invención puede ser caracterizada por una tasa de desarrollo de resistencia espontánea a estas bacterias de menos de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

10 También se divulga un método para tratar a un sujeto que padece una infección contribuida o provocada por bacterias Gram-positivas como se describió anteriormente, dicho método comprende la etapa de administrar tópicamente una cantidad eficaz de una salicilanilida halogenada niclosamida o una sal o hidrato de la misma. La invención se puede caracterizar por una tasa de desarrollo de resistencia espontánea a estas bacterias de menos de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida, que se puede caracterizar por una tasa de desarrollo de resistencia espontánea a estas bacterias de menos de 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} .

15 También se divulga el uso de una cantidad farmacéuticamente efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma en la preparación de un medicamento para su uso en la prevención y/o tratamiento tópico de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales como eccema o psoriasis. La divulgación se puede caracterizar por una tasa de desarrollo de resistencia espontánea a estas bacterias de menos de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

20 También se divulga un método para la prevención y/o tratamiento tópico de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales como eccema o psoriasis que comprenden administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o un hidrato o una sal o un hidrato de dicha sal de la misma. La invención se puede caracterizar por una frecuencia de tasa de frecuencia de mutación espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

25 También se divulga un método para el tratamiento tópico de infecciones bacterianas Gram-positivas resistentes a antibióticos que comprende administrar a un sujeto infectado con bacterias Gram-positivas resistentes a antibióticos seleccionadas del grupo que consiste de Staphylococcus aureus resistente a antibióticos y/o Streptococcus pyogenes, una cantidad farmacéuticamente efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o un hidrato o una sal o hidrato de dicha sal de la misma. Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

30 También se divulga un método para la prevención y/o tratamiento de conjuntivitis y queratitis provocada por bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que comprende administrar por vía tópica a un sujeto una cantidad farmacéuticamente efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o un hidrato o una sal o hidrato de dicha una sal de la misma. Cuyo ejemplo de especial interés es la niclosamida.

35 También se divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma que se va a administrar para la prevención tópica y/o tratamiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales como eczema o psoriasis y caracterizadas por una tasa de resistencia espontánea de desarrollo a estas bacterias de menos de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

40 También se divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de niclosamida o un derivado de la misma que se va a administrar para la prevención tópica y/o tratamiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales como eczema o psoriasis y caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} .

45 También se divulga una composición farmacéutica que comprende niclosamida como el ingrediente activo que se va a administrar para la prevención tópica y/o tratamiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales

como eczema o psoriasis y caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} .

5 Ejemplos de enfermedades que se pueden tratar por vía tópica utilizando la salicilanilida halogenada incluyen impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis (ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna, úlceras diabéticas y similares).

10 La infección o enfermedad tratada por vía tópica utilizando la salicilanilida halogenada puede ser una infección de la piel, una dermatitis infectada o una dermatosis infectada, por ejemplo, cualquiera de las infecciones de la piel descritas aquí. La infección cutánea, por ejemplo, se puede seleccionar entre impétigo (que incluye impétigo contagioso, impétigo bulloso y ectima) dermatitis infectada (por ejemplo, dermatitis atópica infectada) eczema infectado, heridas cutáneas infectadas, quemaduras infectadas y úlceras infectadas (por ejemplo, úlceras diabéticas).

15 La infección o enfermedad tratada por vía tópica utilizando la salicilanilida halogenada puede ser una dermatosis secundariamente infectada por Gram positiva, por ejemplo, una infección cutánea secundaria. Las infecciones por Gram positivas secundarias son complicaciones comunes de dermatosis primarias, infecciones cutáneas no bacterianas primarias, lesiones traumáticas, úlceras, infestaciones cutáneas y otras enfermedades de la piel. De acuerdo con lo anterior, la salicilanilida halogenada puede ser para uso en el tratamiento tópico de, por ejemplo, infecciones secundarias de una afección seleccionada entre eczema, pediculosis, sarna, picaduras de insectos (por ejemplo, urticaria papular), psoriasis péufigosa, úlceras cutáneas, kerion y una infección viral de la piel (por ejemplo, herpes simple o varicela).

25 La salicilanilida halogenada se puede utilizar para descolonizar a un sujeto que lleva una bacteria Gram positiva (que incluye cualquiera de las bacterias Gram positivas descritas aquí, por ejemplo, MRSA), en el que la salicilanilida halogenada se aplica por vía tópica al sujeto. Dicha descolonización puede ser efectiva para prevenir o reducir la propagación de la infección a otros sujetos, particularmente en un ambiente hospitalario. La descolonización también puede prevenir o reducir el riesgo de infecciones del sitio quirúrgico como resultado de procedimientos quirúrgicos o médicos llevados a cabo en el paciente o en el sitio de dispositivos médicos tales como catéteres o líneas IV o cánula. De acuerdo con esto, la salicilanilida halogenada se puede utilizar para la descolonización de un sujeto antes de llevar a cabo un procedimiento quirúrgico sobre el sujeto, en el que la salicilanilida halogenada se aplica por vía tópica al sujeto. Dichos procedimientos quirúrgicos incluyen, por ejemplo, procedimientos quirúrgicos electivos tales como reemplazo de cadera o rodilla. La descolonización se puede lograr al administrar por vía tópica la salicilanilida halogenada a sitios en el sujeto que están colonizados por las bacterias Gram positivas. Se sabe que un sitio común para la colonización bacteriana tal como MRSA es la nariz. De acuerdo con lo anterior, la salicilanilida halogenada se puede aplicar por vía tópica a la nariz. En particular, la salicilanilida halogenada se puede aplicar a las fosas nasales anteriores (la superficie interna de la nariz).

40 Las infecciones y la descolonización descritas en los párrafos anteriores y aquí se pueden tratar por vía tópica con cualesquiera de las salicilanilinas halogenadas aquí seleccionadas de niclosamida o una sal o hidrato de las mismas. Particularmente, la salicilanilida halogenada puede ser niclosamida.

45 También se divulga una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de la salicilanilida halogenada niclosamida o una sal o hidrato de la misma que se va a administrar para la prevención tópica y/o tratamiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus aureus y/o Streptococcus pyogenes que colonizan o infectan la piel afectada con una afección dermatológica seleccionada del grupo que consiste de impétigo, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel tales como eczema o psoriasis caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} contra MRSA 01, MRSA 15 y MRSA 16 a una concentración de MIC x 1 cuando se mide de acuerdo con el método de evaluación de frecuencia mutacional que se describe en la sección experimental. Se ha encontrado que la niclosamida es superior contra S. aureus y S. pyogenes (ambas en μM y $\mu\text{g/ml}$).

50 Una salicilanilida halogenada seleccionada del grupo que consiste de niclosamida o una sal o hidrato de la misma para uso en la prevención tópica o tratamiento de una infección provocada por bacterias Gram-positivas, es altamente efectiva en inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus, en particular Staphylococcus aureus, y Streptococcus, en particular Streptococcus pyogenes caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

60 También se divulga un método para la fabricación de un medicamento para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección provocada por bacterias Gram-positivas, en el que el medicamento es niclosamida o una sal o hidrato en el que el uso de la salicilanilida halogenada es altamente efectivo en inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas tales como Staphylococcus, en particular Staphylococcus aureus, y Streptococcus, en particular Streptococcus pyogenes caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} .

Mediante el uso tópico de las salicilanilidas halogenadas, tales como niclosamida, es posible tratar a un humano que padece de una infección provocada por bacterias tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes* mientras que tiene una tasa reducida de aparición de mutantes resistentes espontáneos contra el agente.

Otras ventajas y objetos de la presente invención se describirán con más detalle, entre otros, con referencia a los dibujos acompañantes.

Breve descripción de los dibujos y tablas

• La figura 1 muestra datos microbiológicos de niclosamida probados contra cepas de MRSA, MSSA y *S. pyogenes*. A. MIC ($\mu\text{g/ml}$) contra todas las cepas objetivo. La MIC de niclosamida fue $\leq 0.4 \mu\text{g/ml}$ contra las cepas de *S. aureus*, que incluyen las cepas resistentes al ácido fusídico (*) y las resistentes a mupirocina (\ddagger), y $\leq 3.2 \mu\text{g/ml}$ contra las cepas de *Streptococcus pyogenes*. Las curvas dosis-respuesta de las cepas amarillas resaltadas se representan en B.

• La Figura 2 muestra una curva de tiempo-muerte de MRSA 01 incubado con niclosamida (MIC x 10). La niclosamida tuvo un efecto bacteriostático contra MRSA 01 (cepa utilizada en experimentos con animales) en las condiciones probadas (inóculo inicial: $7 \log_{10}$ cfu/ml, niclosamida: $4 \mu\text{g/ml}$ [MIC x 10]).

• La Figura 3 muestra CFU en lesiones cutáneas después de tres días de tratamiento con las Muestras 5. Muestra - control corresponde a la muestra sin niclosamida *: $P < 0.05$, prueba t no apareada; **: $P < 0.005$, prueba t no apareada; ***: $P < 0.001$, prueba t no apareada; ns: no significativo.

• La Figura 4 muestra las curvas dosis-respuesta de niclosamida, ácido fusídico y mupirocina contra *S. aureus* con cepas resistentes a meticilina (A), cepa resistente a ácido fusídico (B) y cepa resistente a mupirocina (C).

• La Figura 5 muestra el crecimiento de *S. aureus* a pH diferente en función de la concentración de niclosamida (promedio de 3 repeticiones). El crecimiento de *S. aureus* sin niclosamida ($0 \mu\text{g/ml}$) es comparable desde pH 7.4 hasta pH 6.0. El crecimiento sin niclosamida se inhibe ligeramente a pH 5.5 y se inhibe por completo con un pH igual o por debajo de 5.0.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En el contexto de la presente solicitud e invención, se aplican las siguientes definiciones:

El término '*Staphylococcus aureus*' o '*S. aureus*' como se utiliza aquí, sin más descripción, se refiere a cualquier cepa de bacterias gram-positivas clasificadas como *Staphylococcus aureus*, y que se han asociado con diversas infecciones, que incluyen neumonía, osteomielitis, artritis, endocarditis, sepsis y síndrome de choque tóxico, así como también causa infecciones menos graves de la piel y los tejidos blandos.

El término '*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina' o 'MRSA' como se utiliza aquí incluye cepas de *Staphylococcus aureus* que son resistentes a meticilina y también se pueden relacionar ampliamente con cepas de bacterias Gram-positivas (por ejemplo, bacterias productoras de beta-lactamasa) que son resistentes a antibióticos que caen dentro de la clasificación general de penicilinas. La meticilina es el nombre común para el ácido (2S,5R,6R)-6-[(2,6-dimetoxibenzoil)amino]-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico que es un antibiótico de beta-lactama de espectro estrecho que se ha utilizado para tratar infecciones provocadas por bacterias Gram-positivas susceptibles (por ejemplo, que incluyen *Staphylococcus aureus*).

El término 'derivado' se refiere, pero no se limita a, metabolitos, profármacos (convertidos en fármacos activos), ésteres, hidratos y/o una sal y/o hidratos farmacéuticamente aceptables de dichas sales de las salicilanilidas halogenadas de la presente invención. También dentro del término 'derivados' están las formas cristalinas de los compuestos y cocrystalos formados entre la salicilanilida halogenada y un coformador(es) adecuado(s). Un experto en la técnica es consciente de diversos métodos químicos y técnicas para generar una sustancia química para generar un derivado, que todavía comprende la base química, tales como adición, eliminación o sustitución de un grupo o grupo funcional y, por lo tanto, sea fácil generar un compuesto similar como la niclosamida que tiene el mismo efecto que el original.

El término 'sal farmacéuticamente aceptable' se refiere a sales (por ejemplo, sales de etanolamina o piperazina) que retienen la efectividad biológica y propiedades de los compuestos descritos aquí y que no son biológicamente indeseables. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en la técnica. De acuerdo con lo anterior, puede ser que una referencia a una sal de una salicilanilida halogenada aquí se refiera a una sal farmacéuticamente aceptable de la salicilanilida halogenada.

El término 'solvato' se utiliza aquí para referirse a un complejo de soluto, tal como un compuesto o sal del compuesto, y un solvente, si el solvente es agua, el solvato se puede denominar hidrato, por ejemplo, un monohidrato, dihidrato, trihidrato, etc., dependiendo del número de moléculas de agua presentes por molécula de sustrato.

5 El término 'tratamiento' aquí indica (i) la prevención de la enfermedad provocada por bacterias, tal como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; (ii) la supresión de la enfermedad provocada por bacteria, tal como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; y (iii) el alivio de la enfermedad provocada por bacteria, tal como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; v) la erradicación de una colonización no sintomática por *Staphylococcus aureus* de un área en el cuerpo (v) la erradicación de bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y/o
10 *Streptococcus pyogenes* de infección sintomática, (vi) la erradicación de bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; de un área del cuerpo afectada por otra enfermedad que puede permitir el establecimiento de una infección más fácilmente, que en un área no afectada por la enfermedad - por ejemplo un área de la piel afectada por eczema o dermatitis atópica, (vii) la supresión de la enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y/o *Streptococcus pyogenes*; de un área del cuerpo afectada por otra
15 enfermedad no infecciosa que permite el establecimiento de una infección más fácilmente que en un área no afectada por la enfermedad - por ejemplo un área de la piel afectada por eczema o dermatitis atópica.

Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el tratamiento de una afección abarca tanto el tratamiento terapéutico como el profiláctico, de ya sea una afección infecciosa o no infecciosa, en un mamífero tal como un humano
20 o animal, pero en particular un humano. Puede implicar la erradicación completa o parcial de la afección, la eliminación o la mejora de los síntomas asociados, la detención del desarrollo posterior de la afección y/o la prevención o reducción del riesgo de la aparición posterior de la afección. La cepa bacteriana se puede caracterizar por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} , tal como menos de 10^{-7} o 10^{-8} , tal como menos de 4×10^{-9} . El tratamiento normalmente involucrará el uso de las salicilanilidas halogenadas closantel, rafoxanida, oxiclozanida o
25 niclosamida o derivados de los mismos contra bacterias Gram-positivas tales como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Un ejemplo que es de especial interés es la niclosamida.

Puede ser que la infección o enfermedad que se va a tratar esté en un animal, por ejemplo un mamífero. En particular, la salicilanilida halogenada se puede utilizar para tratar animales comerciales tales como ganado (por ejemplo, vacas,
30 ovejas, pollos, cerdos, gansos, patos, cabras, etc.). Alternativamente, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para tratar animales de compañía tales como gatos, perros, caballos, etc.

Un 'medicamento tópico' es un medicamento que se aplica a superficies corporales como la piel o las membranas mucosas para tratar dolencias a través de un amplio rango de clases que incluyen pero no se limitan a cremas,
35 espumas, geles, gotas, lociones y ungüentos. Los medicamentos tópicos difieren de muchos otros tipos de medicamentos porque su manejo incorrecto puede ocasionar ciertas complicaciones en un paciente o administrador del medicamento. Muchos medicamentos tópicos son epicutáneos, lo que significa que se aplican directamente en la piel. Los medicamentos tópicos también pueden ser inhalatorios, como medicamentos para el asma, o aplicarse a la superficie de tejidos diferentes a la piel, como gotas para los ojos aplicadas a la conjuntiva o gotas para los oídos en la
40 oreja o medicamentos aplicados en la superficie de un diente.

En la aplicación tópica, una composición farmacéutica adecuada, por ejemplo una crema, loción, gel, ungüento, pasta, gotas o similar, puede extenderse sobre la superficie afectada y frotarse suavemente. Se puede aplicar de la misma
45 manera una solución, pero más normalmente se aplicará con un cuentagotas, hisopo o similar, y se aplicará con cuidado a las áreas afectadas.

La aplicación tópica de la salicilanilida halogenada de acuerdo con la presente invención, permite que la salicilanilida halogenada se administre selectivamente a un sitio específico, y evita variaciones inter e intrapacientes que pueden estar asociadas con rutas alternativas de administración de fármacos.
50

Las composiciones farmacéuticas tópicas de acuerdo con la presente divulgación se pueden utilizar para tratar una variedad de trastornos de la piel o de la membrana, tales como infecciones de la piel o membranas (por ejemplo, infecciones de membranas nasales, axila, ingle, perineo, recto, piel dermatítica, úlceras cutáneas, y sitios de inserción de equipos médicos tales como agujas iv, catéteres y tubos de traqueostomía o alimentación) con cualquiera de las
55 bacterias descritas anteriormente (por ejemplo, cualquiera de los estafilococos, estreptococos tales como *S. aureus* (por ejemplo, *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA)) Las afecciones bacterianas particulares que se pueden tratar mediante composiciones farmacéuticas tópicas de la presente invención también incluyen afecciones relacionadas con la piel y la membrana descritas anteriormente aquí, así como: rosácea (que incluye rosácea eritematotelangiectásica, pápulo-pustulosa rosacea, rosácea fimatosa y rosácea ocular); erisipela; eritrasma; ectima; ectima gangrenoso; impétigo; paroniquia; celulitis; foliculitis (que incluye foliculitis de jacuzzi); furunculosis; carbunculosis; síndrome de la piel escaldada estafilocócica; escarlatina quirúrgica; enfermedad perianal estreptocócica; síndrome de choque tóxico estreptocócico; queratolisis con hoyuelos; tricomicosis axilaris; pioderma; infecciones del oído externo del canal; síndrome de uñas verdes; espiroquetas; fascitis necrotizante; infecciones micobacterianas de la piel (tales como lupus vulgaris, escrofulodermia, tuberculosis verrugosa, tuberculitis, eritema nudoso, eritema indurado, manifestaciones cutáneas de lepra tuberculoide o lepra lepromatosa, eritema nodoso leproso, infecciones cutáneas por *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* (que incluye
60

5 M. abscessus) o M. fortuitum, granuloma de piscina (o tanque de peces), linfadenitis y úlcera de Buruli (úlceras de Bairnsdale, úlcera de Searles, úlcera de Kakerifu o úlcera de Toro)); así como eczema infectado, quemaduras, abrasiones y heridas en la piel. Las afecciones fúngicas particulares que se pueden tratar mediante composiciones farmacéuticas tópicas de la presente invención también incluyen las afecciones relacionadas con la piel y la membrana descritas anteriormente aquí, así como también: candidiasis; esporotricosis; tiña (por ejemplo, tiña pedis, tiña cruris, tiña capitis, tiña unguium o tiña corporis); tiña versicolor; e infecciones con los hongos Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton o Pityrosporum ovale.

10 El régimen de aplicación dependerá de una serie de factores que se pueden determinar fácilmente, tales como la gravedad de la afección y su capacidad de respuesta al tratamiento inicial, pero normalmente implicará una o más aplicaciones por día de forma continua. La dosificación efectiva de la composición farmacéutica de la presente invención varía de la formulación, ruta de administración, edad, peso y género del animal o humano con una enfermedad provocada por Staphylococcus aureus, gravedad de una enfermedad, dieta, frecuencia y ruta de administración, excreción y sensibilidad.

15 Generalmente, la cantidad de la salicilanilida halogenada o un derivado de la misma que se va a administrar por vía tópica está en el rango de 0.01-10000 mg/cm², preferiblemente entre 0.1-1000 mg/cm² e incluso más preferiblemente entre 1-100 mg/cm² utilizando una formulación farmacéutica que contiene entre 1-20%, preferiblemente 2-10%, más preferiblemente 3-8% e incluso más preferiblemente 4-6% de ingrediente activo (todos los números se dan en peso).

20 En microbiología, la concentración mínima inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de un antibacteriano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche.

25 Las concentraciones inhibitorias mínimas son importantes en los laboratorios de diagnóstico para confirmar la resistencia de los microorganismos a un agente antimicrobiano y también para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos. En general, se considera que una CMI es la medida de laboratorio más básica de la actividad de un agente antimicrobiano contra un organismo.

30 En toxicología, la dosis letal media, LD₅₀ (abreviatura de 'dosis letal, 50%') de una toxina, radiación o patógeno es la dosis requerida para matar a la mitad de los miembros de una población evaluada después de una duración específica de la prueba. Las cifras de LD₅₀ se utilizan con frecuencia como un indicador general de la toxicidad aguda de una sustancia.

35 El índice terapéutico (relación terapéutica) se define como la cantidad de un agente terapéutico que provoca el efecto terapéutico medido como CMI a la cantidad que provoca la muerte en estudios en animales medida como LD₅₀. Algunos antibióticos requieren monitorización para equilibrar la eficacia con minimización de los efectos adversos, que incluyen: gentamicina, vancomicina, anfotericina B (apodada 'anfo-terrible' por esta misma razón) y polimixina B. También se podrían utilizar otros valores CMI.

40 La tasa de desarrollo de resistencia se cuantifica como la frecuencia de mutantes espontáneos en una población de bacterias que es capaz de resistir una concentración dada del antibiótico. Por ejemplo, la tasa de desarrollo de resistencia puede ser de 10⁻⁹ si en promedio 1 célula en 10⁹ células es capaz de sobrevivir a una concentración de antibiótico correspondiente a 1x CMI.

45 En microbiología, la unidad formadora de colonias (UFC) es una estimación aproximada del número de bacterias viables o células fúngicas en una muestra. Viable se define como la capacidad de multiplicarse mediante fisión binaria bajo las condiciones controladas.

50 También se divulgan pero no se reivindican las siguientes cláusulas numeradas

55 1. Salicilanilidas halogenadas seleccionadas del grupo que consiste de closantel, rafoxanida, oxiclozanida y niclosamida y derivados de los mismos que incluyen sales, hidratos y ésteres para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10⁻⁶.

2. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con la cláusula 1, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10⁻⁷ o 10⁻⁸.

60 3. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con la cláusula 2, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 4 x 10⁻⁹.

65 4. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-3, seleccionadas del grupo que consiste de closantel, rafoxanida, oxiclozanida y niclosamida y sales de los mismos para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10⁻⁶ o menos de 10⁻⁷ o 10⁻⁸ o menos de 4 x 10⁻⁹.

5. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-4, seleccionadas del grupo que consiste de closantel, rafoxanida, oxiclozanida y niclosamida para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} o menos de 10^{-7} o 10^{-8} o menos de 4×10^{-9} .
6. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-5, en las que la salicilanilida halogenada es niclosamida y derivados de la misma que incluye sales, hidratos y ésteres para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} o menos de 10^{-7} o 10^{-8} o menos de 4×10^{-9} .
7. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-6, en las que la salicilanilida halogenada es niclosamida y hidratos de sales de la misma o hidratos de dichas sales para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas, caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-8} o menos de 4×10^{-9} .
8. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-7, en las que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica e infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis, ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna y úlceras diabéticas.
9. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con la cláusula 8, en las que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica e infecciones asociadas con diferentes afecciones de la piel.
10. Las salicilanilidas halogenadas de acuerdo con cualquiera de las cláusulas 1-9, en las que la bacteria es *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes*.
11. Un método para fabricar un medicamento para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección provocada por bacterias, en el que el medicamento es niclosamida y derivados de la misma que incluyen sales, hidratos y ésteres y caracterizadas por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-6} o menos de 10^{-7} o 10^{-8} o menos de 4×10^{-9} .
12. El método para fabricar un medicamento de acuerdo con la cláusula 11 para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección provocada por bacterias, en el que el medicamento es niclosamida y hidratos de sales de la misma o hidratos de dichas sales y caracterizado por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-8} o menos de 4×10^{-9} .
13. Una composición farmacéutica que comprende niclosamida y derivados de la misma que incluye sales, hidratos, ésteres e hidratos de dichas sales como el ingrediente activo en la que la composición farmacéutica reduce o elimina el desarrollo de resistencia por las bacterias, *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus pyogenes* contra la niclosamida utilizada por una tasa de frecuencia de resistencia espontánea de desarrollo menor de 10^{-8} o menor de 4×10^{-9} .

Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, pero no limitar, la invención de cualquier manera, aspecto o forma, explícita o implícitamente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se realizaron pruebas experimentales para determinar la actividad antibacteriana y la tasa de mutación que confiere resistencia a salicilanilidas halogenadas y compuestos de referencia.

Microorganismos

Elegido por su relevancia con respecto a las infecciones bacterianas de la piel, se utilizó la cepa 01 de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) como el microorganismo de prueba primario. Esta cepa es un aislado clínico de MRSA adquirido en la comunidad del tipo USA 300, de un absceso cutáneo.

Otras veintidós cepas de MRSA y *S. aureus* sensible a meticilina, y 4 cepas de *Streptococcus pyogenes*, también se incluyeron en el estudio (Tabla 1). Estas cubrieron las cepas resistentes a ácido fusídico y mupirocina, estos dos tipos de resistencia tienen relevancia clínica.

Las cepas se conservaron en Caldo de Luria Bertani (LB) (*S. aureus*) o Infusión de Cerebro Corazón (BHI) (*S. pyogenes*) suplementado con glicerol 15% (v/v) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se reactivaron por aislamiento sobre placas de agar de LB (*S. aureus*) o BHI (*S. pyogenes*). Las cepas se cultivaron en Caldo-catión ajustado de Mueller Hinton (MH) (*S. aureus*)

suplementado con sangre de caballo lisada al 2.5% (v/v) (*S. pyogenes*). Todas las cepas se cultivaron a 37°C, aeróbicamente para cepas de *S. aureus*.

TABLA 1. Lista de cepas e información

Especies	Cepas	Gen de resistencia a mupirocina y ácido fusídico	Tipo USA	MLSTSCC mec	Tipo spa	Origen
<i>S. aureus</i>	Newman					
	MRSA 01		USA 300	ST8 -IV	t008	SSI
	MRSA 02			ST30-IV	t019	SSI
	MRSA 03*	ND	USA 400	ST1-IV	t127	SSI
	MRSA 04			ST772-V	t657	SSI
	MRSA 05			ST130-XI	t843	SSI
	MRSA 06			CC97-5C2 (V)		SSI
	MRSA 07			ST398		KU
	MRSA 08 ‡	ND	USA 300	ST8		KU
	MRSA 09		USA600	ST45		KU
	MRSA 10			ST22 -IV		KU
	MRSA 11			ST36 -II		KU
	EEFIC 01 *			CC123	t171	SSI
	EEFIC 02 *			CC123	t171	SSI
	MRSA 12 *	<i>fusB</i>		CC80	t044	SSI
	MRSA 13 *	<i>fusB</i>		CC80	t044	SSI
	MSSA 01 *	<i>fusC</i>		CC1	t127	SSI
MSSA 02 *	<i>fusC</i>		CC1	t127	SSI	
MRSA 14 *	<i>fusA</i>		CC22	t2006	SSI	
MRSA 15 *	<i>fusA</i>		CC30	t166	SSI	
MRSA 16 ‡	<i>mupA</i>		CC30	t019	SSI	
MRSA 17 ‡	<i>mupB</i>		CC509	t375	SSI	
<i>S. pyogenes</i>	01					SSI
	CCUG 25571					
	ATCC 19615					
	ATCC 12385					

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* menos una (MRSA 07) son aislados clínicos humanos; MRSA 07 es un MRSA asociado a ganado; MRSA 02 y MRS 04 son MRSA asociados a la comunidad; *: cepas resistentes a ácido fusídico; ‡ cepas resistentes a mupirocina; ND: no determinado; EEFIC: clon de impétigo resistente al ácido fusídico epidémico europeo; MLST: tipificación de secuencia de múltiples locus; SSCmec: cromosoma del casete estafilocócico mec; spa: proteína A de *S. aureus*; KU: Universidad de Copenhague; SSI: Laboratorio Nacional de Referencia para Estafilococos, Statens Serum Institut, Copenhague, Dinamarca.

5

Actividad antibacteriana

Se realizaron las siguientes pruebas para evaluar la actividad antibacteriana in vitro (Figura 1):

10 1. Ensayo de concentración inhibidora mínima (CIM)

15 La CIM se determinó utilizando placas de 96 pozos, y diluciones en serie de dos veces de niclosamida (de Sigma) (desde 51.2 hasta 0.025 µg/ml) en el medio indicado anteriormente, con 150 µl por pozo. Los cultivos bacterianos se detuvieron en su fase de crecimiento exponencial y las placas se inocularon con la concentración aproximada de 10³ células por pozo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas (*S. aureus*) o 24 horas (*S. pyogenes*). Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm al final del tiempo de incubación. La inhibición se calculó como (Inhibición=1 - OD_{prueba}/OD_{no tratamiento}) y los valores de CIM se determinaron como la concentración mínima dando 100% de inhibición. Los experimentos se realizaron por lo menos como réplicas biológicas triplicadas con todas las cepas.

20 La inhibición se podría deber a una actividad bactericida o bacteriostática, que no se conoce a partir de este experimento. El siguiente ensayo se llevó a cabo con el fin de determinar si la niclosamida mata o inhibe el crecimiento de *S. aureus*.

25 2. Ensayo de muerte en tiempo

El ensayo se realizó en 20 ml de medio. Incluía un control negativo (medio sin bacterias), un control positivo (bacterias cultivadas sin niclosamida) y el ensayo (bacterias cultivadas con niclosamida). La niclosamida se probó a 10 veces su CIM, determinado en el experimento previo. Este experimento se realizó con el microorganismo de prueba primario indicado anteriormente.

30

Se detuvo el cultivo nocturno y se midió OD₆₀₀. El cultivo luego se diluyó en el medio indicado para obtener una OD₆₀₀ de 0.25 para tener aproximadamente 5x10⁸ ufc/ml. Luego, se agregaron doscientos µl de este cultivo diluido en todas las condiciones excepto en el control negativo. La concentración bacteriana inicial fue de aproximadamente 5x10⁶ ufc/ml. Los tubos se incubaron aeróbicamente a 37°C durante 24 horas.

5

Las bacterias se enumeraron antes de incubación, después de 30 minutos, 1, 2, 4, 8 y 24 horas de incubación mediante diluciones en serie en NaCl al 0.9% y se colocaron en placas de agar LB, con 2 placas por dilución. Las placas se incubaron a 37°C y las colonias se enumeraron después de 24 horas.

10 El compuesto se consideró bactericida si la reducción del inóculo bacteriano era superior o igual a 3 log₁₀ ufc/ml, bacteriostático si la reducción era inferior a 3 log₁₀ ufc/ml.

3. Evaluación de frecuencia mutacional

15 La frecuencia de las mutaciones espontáneas en una sola etapa se determinó sobre 3 cepas diferentes (MRSA, resistente al ácido fusídico y resistente a la mupirocina) según lo descrito por Drago et al. (2005) >(Drago, L., De Vecchi, E., Nicola, L., Tocalli, L., y Gismondo, M. R. (2005). La selección de resistencia in vitro en *Pseudomonas aeruginosa* y *Actinobacter* spp. por levofloxacina y ciprofloxacina sola y en combinación con beta-lactamas y amikacina. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 353-359). Cien µl de un inóculo inicial de 10⁹ cfu/ml de un cultivo de una noche se sembraron en placas de agar LB suplementadas con el compuesto de prueba (0x, 1x, 2x, 4x y 10x CIM). Se colocaron en placas diluciones adecuadas sin el compuesto.

20

El crecimiento celular viable se enumeró después de 48 horas de incubación a 37°C.

25 Se llevaron a cabo diez réplicas para cada cepa y se utilizaron ácido fusídico, mupirocina y retapamulina como controles para la cepa MRSA 01.

Unidad formadora de colonias (UFC) en lesiones cutáneas

30 Se realizaron tres estudios en animales con niclosamida y ácido fusídico en comparación con diferentes formulaciones y dosis.

En cada experimento, ratones Balb/c hembras recibieron una lesión cutánea de aproximadamente 1 cm² y se expusieron a 1.5x10⁸ cfu MRSA 01 por vía tópica. Veinticuatro horas después de la formación de la herida y la contaminación, los ratones se trataron por vía tópica con 0.05 ml dos veces al día durante tres días. Los ratones se sacrificaron el día 4, las lesiones cutáneas se extirparon y se cuantificó la ufc. Se incluyó ungüento de Fusidin (2% de Leo Pharma) como control.

35

Experimento 1

40

Muestra 5. - Crema de base modificada de niclosamida (N) al 5% con mayor contenido de lípidos - Lipocrema - de acuerdo con la descripción en Danske Laegemiddelsstandarder (DLS).

45 2.25 g de niclosamida se mezclaron con 47.75 g de nata preparada de acuerdo con Danske Laegemiddels-standarder (DLS) (véase Figura 3).

Fase oleosa:	Polisorbato 80	10 g
	Alcohol cetostearilo	100 g
	Aceite de parafina	100 g
	Monostearato de glicerol 40-50	120 g
Fase acuosa:	Parabenzoato de metilo	1 g
	Glicerol 85%	40 g
	Sorbitol	70 g
	Agua Milli-Q	724 g

Resultados y Conclusiones

50 Microbiología:

Curvas de CIM & muerte - Figuras 1 & 2 y Tablas 2 y 3

Tabla 2 - Susceptibilidad in vitro de aislados clínicos de *S. aureus* y cepa de referencia de *S. aureus* ATCC 29213.

Cepas de <i>S. aureus</i>		CIM (µg/ml)
	Newman	0.2
	MRSA 01	0.4
	MRSA 02	0.2

	CIM ($\mu\text{g/ml}$)
MRSA 03*	0.4
MRSA 04	0.4
MRSA 05	0.2
MRSA 06	0.4
MRSA 07	0.2
MRSA 08*	0.4
MRSA 09	0.2
MRSA 10	0.4
MRSA 11	0.1
EEFIC 01*	0.4
EEFIC 02*	0.2
MRSA 12*	0.4
MRSA 13*	0.4
MSSA 01*	0.4
MSSA 02*	0.4
MRSA 14*	0.4
MRSA 15*	0.2
MRSA 16*	0.2
MRSA 17*	0.2
Cepas de <i>S. pyogenes</i>	
01	3.2
CCUG 25571	3.2
ATCC 19615	3.2
ATCC 12385	1.6

Tabla 3. Índices terapéuticos de salicilanilidas halogenadas, calculadas a partir de sus CIM contra cepas de *S. aureus* y *S. pyogenes* y su dosis letal 50 (LD_{50}) en ratas y ratones.

Compuesto	Mic_{100}				LD_{50} en ratas p.o (mg/kg)	LD_{50} en ratones p.o (mg/kg)	Índice terapéutico (LD_{50} , ratas/ MIC_{100} , <i>S. aureus</i>)
	<i>S. aureus</i>		<i>S. pyogenes</i>				
	$\mu\text{g/ml}$	μM	$\mu\text{g/ml}$	μM			
Niclosamida	≤ 0.4	≤ 1.25	≤ 3	≤ 3	5000	>1500	12,500,000
Closantel	≤ 1.7	≤ 2.5	12.8‡	19‡	300	331	176,000
Oxiclozanida	1.6*	4*	6.4‡	15.9‡	980 -3500	300	612,000 -2187,000
Rafoxanida	0.8*	1.25*	6.4	10‡	1500	270	1,875,000

* Probado contra una cepa: MRSA 01
 ‡ Probado contra una cepa: *S. pyogenes* 01

5 Los datos muestran que las salicilanilidas halogenadas tales como closantel, oxiclozanida, rafoxanida y particularmente niclosamida son muy potentes contra cepas Gram-positivas tales como *S. aureus* y *S. pyogenes*. Notablemente, el efecto es independiente del perfil de resistencia de los aislados con respecto a otros antibióticos utilizados actualmente para el tratamiento tópico de estos microorganismos, que incluyen el ácido fucídico y la mupirocina. De acuerdo con lo anterior, las salicilanilidas halogenadas en general y la niclosamida en particular son muy adecuadas como un posible tratamiento para cepas Gram-positivas susceptibles y resistentes.

Desarrollo de resistencia a microbiología - Tabla 4

15 Las mutaciones espontáneas que confieren resistencia a las salicilanilidas halogenadas ocurrieron a una frecuencia muy baja (frecuencia mutacional = 5×10^{-9} , 2×10^{-8} y 1×10^{-7} a CIM x 1 para rafoxanida, closantel y oxiclozanida respectivamente) y para la niclosamida a una frecuencia extremadamente baja ($0 \leq$ frecuencia mutacional $< 4 \times 10^{-10}$ a CIM x 1) en comparación con los antibióticos actualmente utilizados como ácido fusídico, retapamulina y mupirocina (frecuencia mutacional: $\geq 4 \times 10^{-5}$ a CIM x 1) (véase Tabla 4).

20 Tabla 4. Tasas de mutación que confieren resistencia a las salicilanilidas halogenadas.

Compuesto	Tasa de mutación de resistencia A CIM x 1
Niclosamida	$< 4 \pm 10^{-9}$
Closantel	$= 2 \pm 10^{-8}$
Oxiclozanida	$= 1 \pm 10^{-7}$
Rafoxanida	$= 5 \pm 10^{-9}$
Ácido fusídico	$\geq 4 \pm 10^{-5}$
Mupirocina	$\geq 4 \pm 10^{-5}$
Retapamulina	$\geq 4 \pm 10^{-5}$

1. Tasa de mutación que confiere resistencia contra MRS A 01, MRS A 15 (resistente al ácido fusídico) y MRS A 16 (resistente a mupirocina)

* Probado contra una cepa: MRSA 01

A. Los datos de frecuencia mutacional dan la frecuencia de un mutante resistente dentro de una población determinada. Cuando la frecuencia mutacional es inferior a 10^{-9} significa que hay menos de un mutante resistente en una población de 10^9 células.

5

Inesperadamente, el desarrollo de resistencia hacia las salicilanilidas halogenadas en general y la niclosamida en particular es mucho más lenta que el desarrollo de resistencia hacia fármacos como el ácido fusídico, la mupirocina y la retapamulina que se encuentran en el mercado.

10

En combinación, la alta potencia y la implementación de la baja tasa de desarrollo de resistencia hace que la niclosamida sea particularmente útil para el tratamiento, especialmente el tratamiento tópico de infecciones provocadas por organismos Gram positivos.

15

En vista de los hallazgos microbiológicos inesperados de que la niclosamida tiene propiedades únicas que lo hacen un candidato ideal como un tópico antiinfeccioso, se realizaron experimentos en animales para evaluar el efecto de la niclosamida in vivo.

20

Los datos descritos aquí muestran que la niclosamida reduce la colonización por *S. aureus* en el modelo animal utilizado para las pruebas.

En el Experimento 1 (Figura 3), la niclosamida en las formulaciones de pomada y crema probadas condujo a reducciones bacterianas significativas en comparación con los vehículos de control.

25

En conclusión, los datos in vivo muestran que la niclosamida es muy adecuada como antibiótico tópico para el tratamiento de infecciones provocadas por organismos Gram positivos.

Ejemplo 2

30

Tamizado adicional más extenso de aislados clínicos realizados con niclosamida.

Métodos

Microorganismos

35

Elegido por su relevancia con respecto a las infecciones bacterianas de la piel, se utilizó la cepa 01 de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) como el microorganismo de prueba primario. Esta cepa es un aislado clínico de MRSA adquirido en la comunidad del tipo USA 300, de un absceso cutáneo.

40

También se incluyeron en el estudio otras doscientas cuatro cepas de MRSA y *S. aureus* sensibles a meticilina y cuatro cepas de *Streptococcus pyogenes*. Estas cubrieron las cepas resistentes a ácido fusídico y mupirocina, estos dos tipos de resistencia tienen relevancia clínica.

45

Las cepas se conservaron en Caldo de Luria Bertani (LB) (*S. aureus*) o Infusión de Cerebro Corazón (BHI) (*S. pyogenes*) suplementado con glicerol 15% (v/v) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se reactivaron por aislamiento sobre placas de agar de LB (*S. aureus*) o BHI (*S. pyogenes*). Las cepas se cultivaron en Caldo-cación ajustado de Mueller Hinton (MH) (*S. aureus*) o BHI (*S. pyogenes*). Todas las cepas se cultivaron aeróbicamente (microaeróbicamente para cepas de *S. pyogenes*) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

50

Actividad antibacteriana

1. Ensayo de concentración inhibidora mínima (CIM)

55

Las concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de niclosamida, ácido fusídico y mupirocina se determinaron de acuerdo con los criterios de CLSI con un rango de concentración de dilución doble (16 a $0.008\text{ }\mu\text{g/ml}$) en Caldo-cación ajustado de Mueller Hinton (Fluka Analytical 90922), utilizando placas de 96 pozos, para 205 cepas de *S. aureus* diferentes. Se incluyó *S. aureus* ATCC 29213 como cepa de referencia de control y se incluyeron clindamicina y vancomicina como antibióticos de control.

60

Los cultivos bacterianos se detuvieron en su fase de crecimiento exponencial y las placas se inocularon con la concentración aproximada de 5×10^5 células por pozo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas (*S. aureus*) o 24 horas (*S. pyogenes*). Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm al final del tiempo de incubación. La inhibición se calculó como $(\text{Inhibición} = 1 - \text{OD}_{\text{prueba}} / \text{OD}_{\text{no tratamiento}})$ y los valores de CIM se determinaron como la concentración mínima dando 100% de inhibición.

65

Debido a la interferencia con la sangre (la CIM aumentó en 16 con 5% de sangre de caballo lisada), la determinación de CIM contra cepas de *S. pyogenes* se realizó en BHI.

Resultados y discusión

Determinación CIM in vitro y amplitud de efecto

5

La CIM de niclosamida fue <0.5 µg/ml contra todas las cepas dirigidas de *S. aureus* y *S. pyogenes*, incluidas las cepas resistentes al ácido fusídico, mupirocina, clindamicina y retapamulina (Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7 y Figura 4). Las curvas dosis-respuesta de niclosamida, ácido fusídico y mupirocina contra *S. aureus* con diferentes perfiles de resistencia se representan en la Figura X.

10

Tabla 5. Susceptibilidad in vitro de aislados clínicos de *S. aureus* y cepa de referencia ATCC 29213 de *S. aureus*. Las resistencias están indicadas en negrita. ND: no determinado.

	CIM (µG/ML)					
	Niclosamida	Ácido fusídico	Mupirocina	Retapamulina	Clindamicina	
ATCC29213	0.5	0.06	0.125	0.03	0.125	1
Newman	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 01	0.25	0.125	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 02	0.25	0.5	0.25	0.06	0.25	2
MRSA 03	0.25	16	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 04	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	2
MRSA 05	0.25	0.125	0.125	0.03	0.125	1
MRSA 06	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 07	0.125	0.25	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 08	0.25	0.125	>16	0.03	>16	1
MRSA 09	0.125	0.25	0.25	0.06	0.25	2
MRSA 10	0.25	1	0.25	0.06	0.25	1
MRSA 11	0.25	1	0.5	0.06	>16	1
EEFIC 01	0.25	4	0.125	0.03	0.125	1
EEFIC 02	0.25	4	0.125	0.03	0.125	1
MRSA 12	0.5	4	0.125	0.03	ND	ND
MRSA 13	0.25	4	0.25	0.06	0.125	1
MSSA01	0.5	4	0.125	0.03	0.125	1
MSSA02	0.25	4	0.125	0.03	0.125	1
MRSA 14	0.25	>16	0.125	0.03	>16	1
MRSA 15	0.25	>16	0.25	0.06	0.125	2
MRSA 16	0.25	0.25	>16	0.06	0.25	1
MRSA 17	0.25	4	>16	0.03	>16	2
MRSA 18	0.25	0.25	0.125	0.06	0.125	1
MRSA 19	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 20	0.25	0.125	0.25	0.06	0.06	1
MRSA 21	0.25	0.125	0.125	0.125	0.03	1
MRSA 22	0.25	>16	0.25	0.06	0.06	0.5
MRSA 23	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 24	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	2
MRSA 25	0.25	16	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 26	0.5	0.5	0.5	0.06	>16	1
MRSA 27	0.5	0.25	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 28	0.25	0.06	0.5	0.03	0.06	1
MRSA 29	0.5	4	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 30	0.25	0.125	0.125	0.03	0.06	1
MRSA 31	0.25	0.25	0.25	16	>16	1
MRSA 32	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 33	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 34	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 35	0.25	16	0.5	0.03	>16	1
MRSA 36	0.25	8	0.25	0.06	0.06	1
MRSA 37	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 38	0.25	8	0.125	0.06	0.125	1
MRSA 39	0.25	8	0.25	0.06	0.06	1
MRSA 40	0.25	0.125	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 41	0.25	>16	0.125	0.02	0.06	1

ES 2 661 000 T3

	CIM (µG/ML)					
	Niclosamida	Ácido fusídico	Mupirocina	Retapamulina	Clindamicina	Vancomicina
MRSA 42	0.25	0.25	0.25	0.06	>16	1
MRSA 43	0.25	0.125	0.25	0.06	0.06	1
MRSA 44	0.25	4	0.25	0.02	0.03	1
MRSA 45	0.25	0.06	0.13	0.02	0.06	1
MRSA 46	0.25	0.06	0.13	0.02	0.03	1
MRSA 47	0.25	0.06	0.25	0.02	>16	0.5
MRSA 48	0.25	2	0.13	0.02	0.03	0.5
MRSA 49	0.25	0.25	0.25	0.02	0.03	2
MRSA 50	0.25	0.03	0.25	0.02	0.02	1
MRSA 51	0.125	0.13	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 52	0.25	0.06	0.25	0.02	0.03	1
MRSA 53	0.25	0.25	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 54	0.25	0.125	0.25	0.03	0.06	2
MRSA 55	0.25	4	0.25	0.02	0.03	0.5
MRSA 56	0.25	0.06	0.25	<0.01	0.03	1
MRSA 57	0.25	0.125	0.125	0.02	0.03	1
MRSA 58	0.25	4	0.125	0.02	0.06	1
MRSA 59	0.25	0.06	0.125	0.02	0.03	1
MRSA 60	0.25	8	0.25	0.02	0.06	0.5
MRSA 61	0.25	0.06	0.25	0.02	0.03	2
MRSA 62	0.25	0.06	0.25	0.02	0.06	2
MRSA 63	0.25	0.125	0.125	0.02	0.06	1
MRSA 64	0.25	0.25	0.25	0.02	0.06	1
MRSA 65	0.25	0.06	0.25	0.02	0.03	1
MRSA 66	0.25	0.06	0.25	0.02	0.03	1
MRSA 67	0.25	0.25	0.125	0.02	0.03	1
MRSA 68	0.25	0.125	0.25	0.02	0.03	1
MRSA 69	0.25	4	0.125	<0.01	0.03	1
MRSA 70	0.125	8	0.25	0.02	0.06	1
MRSA 71	0.25	0.06	0.125	<0.01	0.02	1
MRSA 72	0.25	16	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 73	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 74	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 75	0.5	0.5	0.5	0.03	0.125	1
MRSA 76	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 77	0.25	16	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 78	0.5	0.125	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 79	0.25	0.5	0.25	<0.01	0.03	1
MRSA 80	0.5	0.125	0.25	0.02	0.06	1
MRSA 81	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 82	0.25	8	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 83	0.5	0.06	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 27b	0.25	8	0.25	0.02	0.06	1
MRSA 84	0.25	8	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 85	0.5	4	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 86	0.25	>16	0.25	0.03	0.06	2
MRSA 87	0.25	0.125	0.25	0.02	0.06	1
MRSA 88	0.25	0.06	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 89	0.5	0.06	0.25	0.02	>16	1
MRSA 90	0.5	16	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 91	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 92	0.25	8	0.25	0.06	0.06	1
MRSA 93	0.25	0.02	0.25	0.02	0.03	2
MRSA 94	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 95	0.25	8	0.25	0.03	0.125	2
MRSA 96	0.25	0.125	0.125	0.03	>16	1
MRSA 97	0.25	8	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 98	0.5	0.06	0.5	0.03	>16	1
MRSA 99	0.25	0.125	0.5	0.03	0.125	1
MRSA 100	0.25	0.125	0.5	1	0.25	1

ES 2 661 000 T3

	CIM (µG/ML)					
	Niclosamida	Ácido fusídico	Mupirocina	Retapamulina	Clindamicina	Vancomicina
MRSA 101	0.5	8	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 102	0.25	0.06	0.25	0.03	0.06	2
MRSA 103	0.25	8	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 104	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 105	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 106	0.25	0.125	0.25	0.06	0.125	1
MRSA 107	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	2
MRSA 108	0.25	4	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 109	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 110	0.25	0.06	0.125	0.03	0.125	1
MRSA 111	0.5	8	0.25	0.03	0.125	1
MRSA 112	0.25	0.06	0.25	0.03	0.06	1
MRSA 113	0.25	0.125	0.25	0.03	0.06	1
K000796	0.25	8	0.5	0.03	0.125	1
K115688	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	2
K000866	0.25	8	0.5	0.03	0.125	1
K000864	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
K000863	0.25	1	0.5	0.03	0.125	1
KI15689	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	2
K000772	0.25	>16	0.125	0.06	0.125	1
KI15498	0.25	0.125	0.5	0.03	0.125	2
R000024	0.25	16	0.5	0.06	0.125	1
R000020	0.5	0.125	0.5	0.03	0.125	1
R000019	0.5	0.125	0.5	0.06	0.125	2
UI15579	0.25	0.25	0.5	0.06	0.125	1
115370U	0.25	0.5	0.125	0.06	0.125	1
114660U	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
115584D	0.25	0.25	0.5	0.06	0.125	2
115740E	0.5	0.25	0.25	0.06	0.125	1
115810E	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
115628T	0.25	8	0.25	0.03	0.06	2
000274T	0.25	0.5	0.5	0.06	0.125	1
115691T	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
115903T	0.5	8	0.5	0.03	0.125	1
116122T	0.25	0.125	0.5	0.03	0.125	1
115015T	0.5	0.25	0.5	0.06	0.125	2
115273C	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
000040C	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
115690C	0.25	8	0.125	0.25	0.5	2
115561C	0.25	0.125	0.5	0.03	0.125	1
115445C	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
115263C	0.25	0.125	0.25	0.03	0.06	1
115303C	0.5	0.25	0.25	0.03	16>	1
115268C	0.5	0.25	0.5	0.03	0.125	1
115295C	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	1
115242C	0.5	8	0.25	0.03	0.06	1
115427C	0.25	0.125	0.25	0.03	0.06	1
000041C	0.25	0.25	0.25	0.03	0.06	1
E5-1048654	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	1
9-2955245	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
E5-1046019	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1046020	0.5	0.25	0.25	0.06	0.125	1
E5-1047585	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1038294	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1035779	0.5	0.125	0.5	0.03	0.125	1
9-1862936	0.5	0.125	0.25	0.03	0.125	1
E5-1033091	0.5	0.03	0.25	0.02	0.06	1
9-26422166	0.5	8	0.25	0.03	0.125	1
9-2642158	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
E5-1035775	0.5	>16	0.25	0.06	0.125	1

ES 2 661 000 T3

	CIM (µG/ML)					
	Niclosamida	Ácido fusídico	Mupirocina	Retapamulina	Clindamicina	Vancomicina
E5-1029558	0.25	16	0.5	0.03	0.125	1
E5-1038279	0.5	4	0.25	0.03	0.125	1
E5-1039697	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	1
E5-1041979	0.5	0.25	0.5	0.03	0.125	1
E5-1035284	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1030469	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	2
E5-1030472	0.5	0.25	0.5	0.06	0.125	1
E5-1041977	0.5	16	0.5	0.03	0.125	2
E5-1041987	0.5	16	0.25	0.03	0.125	1
E5-1039684	0.5	16	0.25	0.06	0.125	1
E5-1041980	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1033088	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1035277	0.5	16	0.5	0.03	0.125	1
E5-1046096	0.5	0.5	0.5	0.06	0.125	1
E5-1046085	0.5	8	0.5	0.06	0.125	2
9-2625962	0.5	0.25	0.5	0.03	0.125	1
E5-1043668	0.25	1	0.25	0.06	0.25	1
E5-1048428	0.25	0.5	0.25	0.06	0.25	1
E5-1047924	0.5	0.25	0.5	0.03	0.125	1
E5-1047606	0.5	8	0.5	0.03	0.125	1
E5-1046070	0.25	0.25	0.5	0.03	0.125	1
E5-1046298	0.25	0.125	0.25	0.03	0.125	1
E5-1046296	0.5	0.125	1	0.03	0.125	1
E5-1046297	0.5	0.125	0.25	0.06	0.125	1
E5-1043184	0.5	16	0.5	0.03	0.125	1
E5-1038286	0.25	0.25	0.5	0.06	0.125	1
E5-1037958	0.5	16	0.5	0.06	0.125	1
E5-1037971	0.25	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1033076	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1033076	0.5	0.25	0.25	0.03	0.125	1
E5-1029252	0.25	0.25	0.5	0.03	0.125	1
E5-1030440	0.25	0.25	0.25	0.06	0.06	1
E5-1030482	0.125	16	0.25	0.02	0.06	1
E5-1046074	0.25	0.125	0.25	0.06	0.125	1
E5-1048204	0.25	0.25	0.25	0.03	0.06	2
E5-1048670	0.125	0.5	0.5	0.06	0.125	2
E5-1046039	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
E5-1045179	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	1
E5-1046723	0.25	0.5	0.25	0.06	0.125	2

Tabla 6. Distribución CIM de niclosamida contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (porcentaje y relación)

CIM (µg/ml)	0.0625	0.125	0.25	0.5
Cepas DE <i>Staphylococcus aureus</i>		3% (6/205)	70% (144/205)	27% (55/205)
Cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i>	25% (1/4)	25% (1/4)	25% (1/4)	25% (1/4)

5 Tabla 7. Rangos de niclosamida CIM90, CIM50 y CIM para cepas de *Staphylococcus aureus*.

CIM90	CIM50	Valores de rango
0.5 µg/ml	0.25 µg/ml	0.125 -0.5 µg/ml

La niclosamida era inhibitora a una concentración igual o inferior a 0.5 µg/ml para todas las cepas dirigidas de *S. aureus* y *S. pyogenes*, que incluyen las cepas resistentes al ácido fusídico y a la mupirocina.

10 Ejemplo 3

Se llevó a cabo un estudio adicional para examinar la frecuencia de la mutación espontánea que confiere resistencia a la niclosamida en 3 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, que incluyen cepas resistentes al ácido fusídico y a la mupirocina. Esta frecuencia se comparó con las frecuencias de mutación espontánea que confieren resistencia al ácido fusídico, mupirocina y retapamulina en una cepa MRSA.

5

Métodos

Microorganismos

10 Tres aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), con diferentes perfiles de resistencia (MRSA 01, MRSA15 [cepa resistente al ácido fusídico] y MRSA 16 [cepa resistente a la mupirocina]) fueron elegidos por su relevancia con respecto a infecciones bacterianas de la piel. La cepa MRSA 01 se utilizó como el microorganismo de prueba primaria. Esta cepa es un aislado clínico de MRSA adquirido en la comunidad del tipo USA 300, de un absceso cutáneo.

15

Las cepas se conservaron en Caldo Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol 15% (v/v) a -80°C, y se reactivaron mediante aislamiento en placas de agar LB. Las cepas se cultivaron aeróbicamente en Caldo-cati3n ajustado de Mueller Hinton (MH) a 37°C.

20

Evaluaci3n de frecuencia mutacional

La frecuencia de mutaciones espontáneas en una sola etapa se determinó en las 3 cepas diferentes según lo descrito por Drago et al. (2005) y Pannu et al. (2011). Cien µl de un inóculo inicial de aproximadamente 10⁹ cfu/ml de un cultivo de una noche se sembraron en placas de agar sobre LB complementadas con el compuesto de prueba (0x, 1x, 2x, 4x y 25 10x CIM). Se colocaron en placa las diluciones adecuadas en placas sin el compuesto.

El crecimiento celular viable se enumeró después de 48 horas de incubaci3n a 37°C.

30

La frecuencia de resistencia espontánea para una combinaci3n aislado-fármaco se calculó a partir del número de colonias que crecieron en las placas que contienen fármaco frente al número de colonias que crecieron en agar libre de fármaco.

Se llevaron a cabo diez réplicas para cada cepa y se utilizaron ácido fusídico, mupirocina y retapamulina como controles para la cepa MRSA 01.

35

Resultados y discusi3n

Las mutaciones espontáneas que confieren resistencia a niclosamida se produjeron a una frecuencia extremadamente baja (por debajo del límite de detecci3n) (0 ≤ frecuencia mutacional < 4.10⁻⁹ a CIM x 1) para todas las cepas probadas 40 (MRSA 01, MRSA 15 (resistente a ácido fusídico) y MRSA 16 (resistente a mupirocina)) en comparaci3n con el ácido fusídico (frecuencia mutacional: 3.10⁻⁷ a CIM x 10 y ≥ 4.10⁻⁵ a CIM x 1) y a mupirocina y retapamulina. Los resultados con la cepa MRSA 01 se muestran en la Tabla 8.

45

Tabla 8. Frecuencias de mutaciones espontáneas que confieren resistencia a niclosamida, ácido fusídico, mupirocina y retapamulina con la cepa MRSA 01. Promedio de 10 réplicas.

		Niclosamida	Ácido Fusídico	Mupirocina	Retapamulina
Concentraci3n	CIM x 1	< 4310 ^{-9*}	≥ 4.10 ⁻⁵	≥ 4.10 ⁻⁵	≥ 4.10 ⁻⁵
	CIM x 2	< 4310 ^{-9*}	2.10 ⁻⁵	8.10 ⁻⁸	3.10 ⁻⁷
	CIM x 4	< 4310 ^{-9*}	1.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁸	2.10 ⁻⁸
	CIM x 10	< 4310 ^{-9*}	3.10 ⁻⁷	≤ 4.10 ⁻⁹	< 4.10 ^{-9*}

*: Por debajo del límite de detecci3n (no hay colonias en las placas)

En cuanto a MRSA 01, ninguna colonia creció sobre placas con niclosamida con las cepas MRSA 15 y MRSA 16. Esto condujo a una frecuencia de mutaci3n < 3x10⁻⁸ para MRSA 15 y < 1x10⁻⁷ para MRSA 16 a CIM x 1 (0.25 µg/ml), estas 50 diferencias en los límites de detecci3n se deben a las diferencias en las concentraciones bacterianas de cultivos durante la noche.

Conclusiones

55

Las frecuencias de mutaciones espontáneas que confieren resistencia a la niclosamida en *Staphylococcus aureus* fueron mucho más bajas que las frecuencias de mutaciones espontáneas que confieren resistencia al ácido fusídico, mupirocina y retapamulina en *Staphylococcus aureus*. Esto apoya el uso de niclosamida para la descolonizaci3n cutánea de *S. aureus*.

Ejemplo 4

5 Se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de la niclosamida contra el Staphylococcus aureus para evaluar si la niclosamida es aún activa contra S. aureus a un pH cercano al pH de la piel.

Métodos

10 Microorganismos

Elegido por su relevancia con respecto a las infecciones bacterianas de la piel, se utilizó la cepa 01 de S. aureus resistente a meticilina (MRSA). Esta cepa es un aislado clínico de MRSA adquirido en la comunidad del tipo USA 300, de un absceso cutáneo.

15 Esta cepa se conservó en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol 15% (v/v) a -80°C, y se reactivó mediante aislamiento sobre placas de agar LB. Luego se cultivó aeróbicamente en Caldo-catión ajustado de Mueller Hinton (MH) a 37°C.

20 Evaluación del efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de niclosamida

El pH del Caldo-catión ajustado de Mueller-Hinton se ajustó con HC1 2M a 7, 6.5, 6, 5.5, 5, 4.5 y 5. Se prepararon diez ml de medio para cada pH. El pH del MHBII no ajustado fue igual a 7.4.

25 Cada muestra ajustada al pH se filtró en filtros de 0.2 µm antes de utilizarse para el ensayo de determinación de CIM. Para cada pH, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitoras (CIM) de niclosamida de acuerdo con los criterios de CLSI con un rango de concentración de dilución doble (16 a 0.008 µg/ml).

30 El cultivo bacteriano se detuvo en su fase de crecimiento exponencial y las placas se inocularon con la concentración aproximada de 5×10^5 células por pozo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 horas (S. aureus). Se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm al final del tiempo de incubación. La inhibición se calculó como $(\text{Inhibición} = 1 - \text{OD}_{\text{prueba}} / \text{OD}_{\text{no tratamiento}})$ y los valores de CIM se determinaron como la concentración mínima dando 100% de inhibición.

35 El experimento se realizó en repeticiones biológicas triples.

Resultados y discusión

40 El pH de diferentes medios ajustados al pH se verificó después de la adición de niclosamida con el fin de verificar que la adición de niclosamida no tuviera ninguna influencia sobre el pH. Las mediciones mostraron que la adición de niclosamida (16 µg/ml) en los medios ajustados al pH no tuvo influencia sobre el pH (Tabla 9).

45 La MRSA 01 creció igualmente bien desde pH 6 hasta pH 7.4 ($\text{OD}_{600} \sim 0.2$ en promedio en pozos de control positivo) y ligeramente menor en pH 5.5 ($\text{OD}_{600} \sim 0.1$ en promedio en pozos de control positivo). Sin embargo, la cepa fue inhibida por el pH más bajo (pH 4 a pH 5) (Figura 5).

Las determinaciones de CIM mostraron que la actividad inhibitora de niclosamida contra MRSA 01 se incrementó cuando el pH disminuyó, con CIM más bajas (Tabla 9).

Tabla 9. pH y CIM s relacionadas de niclosamida contra MRSA 01 con las 3 repeticiones diferentes.

	Réplica 1			Réplica 2		Réplica 3	
	pH actual	pH después de adición de niclosamida	CIM (µg/ml)	pH actual	CIM (µg/ml)	pH actual	CIM (µg/ml)
No ajustado	7.4	7.4	0.5	7.4	0.25	7.4	0.5
pH 7.0	6.921	6.938	0.25	7.071	0.125	7.025	0.125
pH 6.5	6.512	6.543	0.125	6.566	0.06	6.540	0.03
pH 6.0	5.893	5.954	0.06	5.955	0.06	5.980	0.016
pH 5.5	5.569	5.616	<0.03	5.547	≤0.008	5.530	≤0.008
pH 5.0	5.070	5.095	Sin	5.068	Sin crecimiento	5.008	Sin

ES 2 661 000 T3

	Réplica 1			Réplica 2		Réplica 3	
	pH actual	pH después de adición de niclosamida	CIM (µg/ml)	pH actual	CIM (µg/ml)	pH actual	CIM (µg/ml)
pH 4.5	4.569	4.589	crecimiento o en control positivo. Cepa inhibida por pH ácido	4.568	en control positivo. Cepa inhibida por pH ácido	4.550	crecimiento en control positivo. Cepa inhibida por pH ácido
pH 4.0	4.076	4.105		4.044		4.023	
Concentración bacteriana inicial	2.E+05 cfu/ml			2.E+05 cfu/ml		3.E+05 cfu/ml	

Conclusiones

El efecto inhibitor máximo de niclosamida se observó a pH 5.5, que es cercano al pH de la piel.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma, para uso en prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram positivas, en la que la bacteria Gram positiva no es una propionibacteria; y
 en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica y infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis, ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna y úlceras diabéticas.
- 10 2. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las bacterias Gram positivas se seleccionan de Staphylococcus spp o Streptococcus spp.
- 15 3. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana y dermatitis atópica.
- 20 4. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tratamiento se administra por vía tópica durante 2 semanas o menos.
- 25 5. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la salicilanilida halogenada está comprendida en una formulación cuyos componentes se seleccionan de tal manera que proporcionan un pH local de menos de 6 en el sitio de la infección.
- 30 6. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la salicilanilida es niclosamida o una sal de la misma, por ejemplo niclosamida en la forma de base libre.
- 35 7. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las bacterias Gram-positivas no son una cepa resistente a antibiótico.
- 40 8. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que las bacterias Gram-positivas son una cepa resistente a antibiótico.
- 45 9. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la infección o enfermedad es en un humano o animal, por ejemplo en la que la infección es en un humano.
- 50 10. Una salicilanilida halogenada seleccionada de niclosamida o una sal o hidrato de la misma para uso en la prevención tópica o tratamiento de una infección o enfermedad provocada por bacterias Gram-positivas que son resistentes a un fármaco seleccionado de ácido fusídico, mupirocina y retapamulina;
 en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana, dermatitis atópica y infecciones relacionadas, erradicación nasal, sycosis barbae, foliculitis superficial, eritrasma paroniquia, dermatosis secundarias infectadas, carbuncos, furunculosis, ectima, celulitis, erisipelas, fascitis necrosante, infecciones cutáneas secundarias de heridas, dermatitis, sarna y úlceras diabéticas; opcionalmente en la que la infección o enfermedad se selecciona del grupo que consiste de impétigo, conjuntivitis bacteriana y dermatitis atópica.
- 55 11. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que las bacterias Gram positivas resistentes a un fármaco seleccionado de ácido fusídico, mupirocina y retapamulina no son una propionibacteria.
12. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 o reivindicación 11, en la que las bacterias Gram-positivas se seleccionan de una Staphylococcus spp. o Streptococcus spp. resistente a un fármaco seleccionado de ácido fusídico, mupirocina y retapamulina.
13. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que el tratamiento se administra por vía tópica durante 2 semanas o menos.
14. La salicilanilida halogenada para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en la que la salicilanilida halogenada está comprendida en una formulación cuyos componentes se seleccionan de tal manera que proporcionan un pH local de menos de 6 en el sitio de la infección.

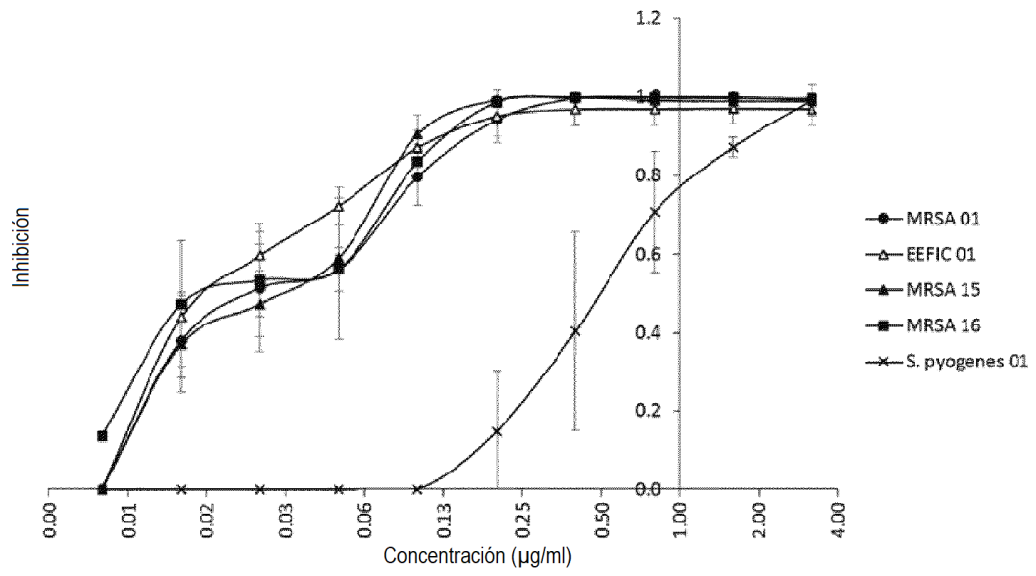


FIG. 1

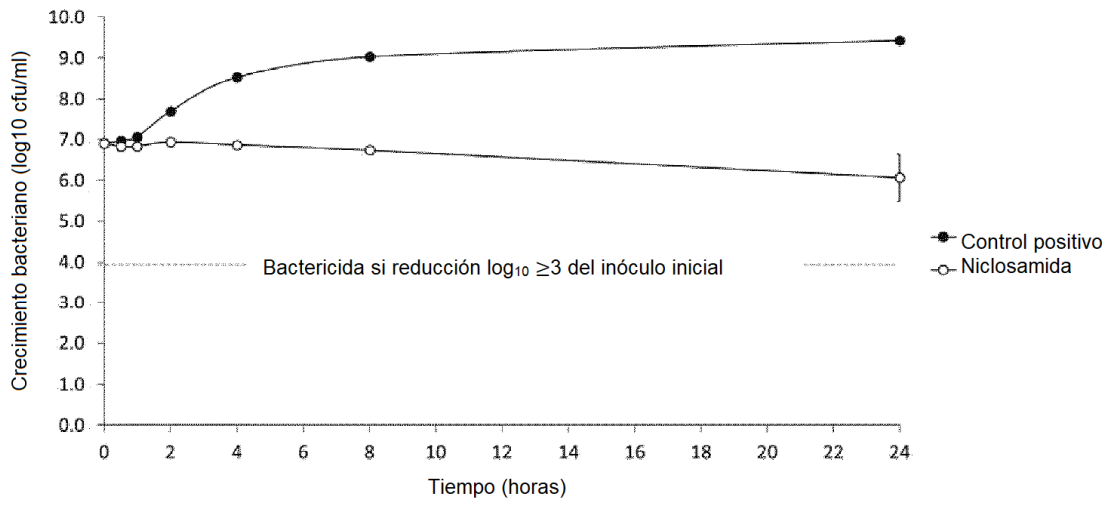


FIG. 2

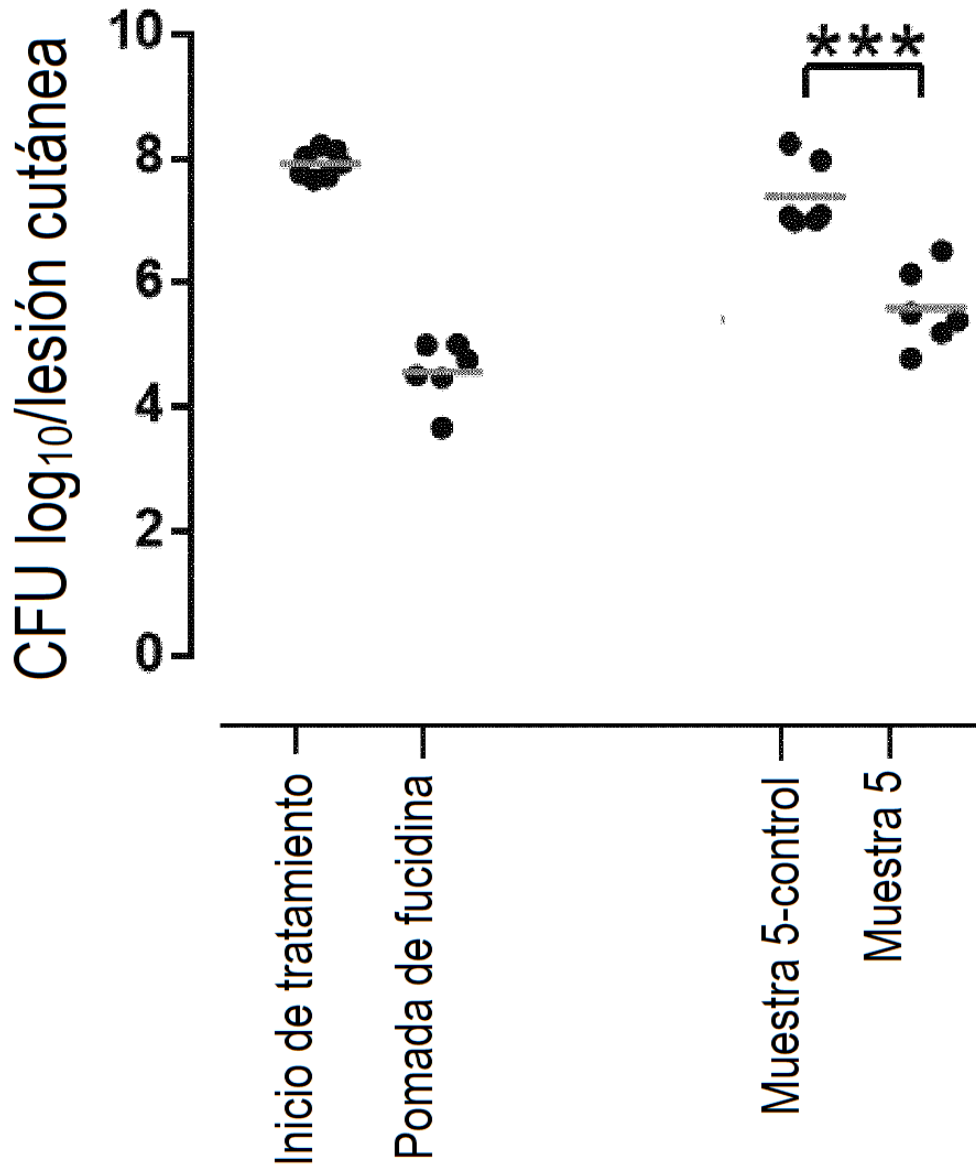


FIG. 3

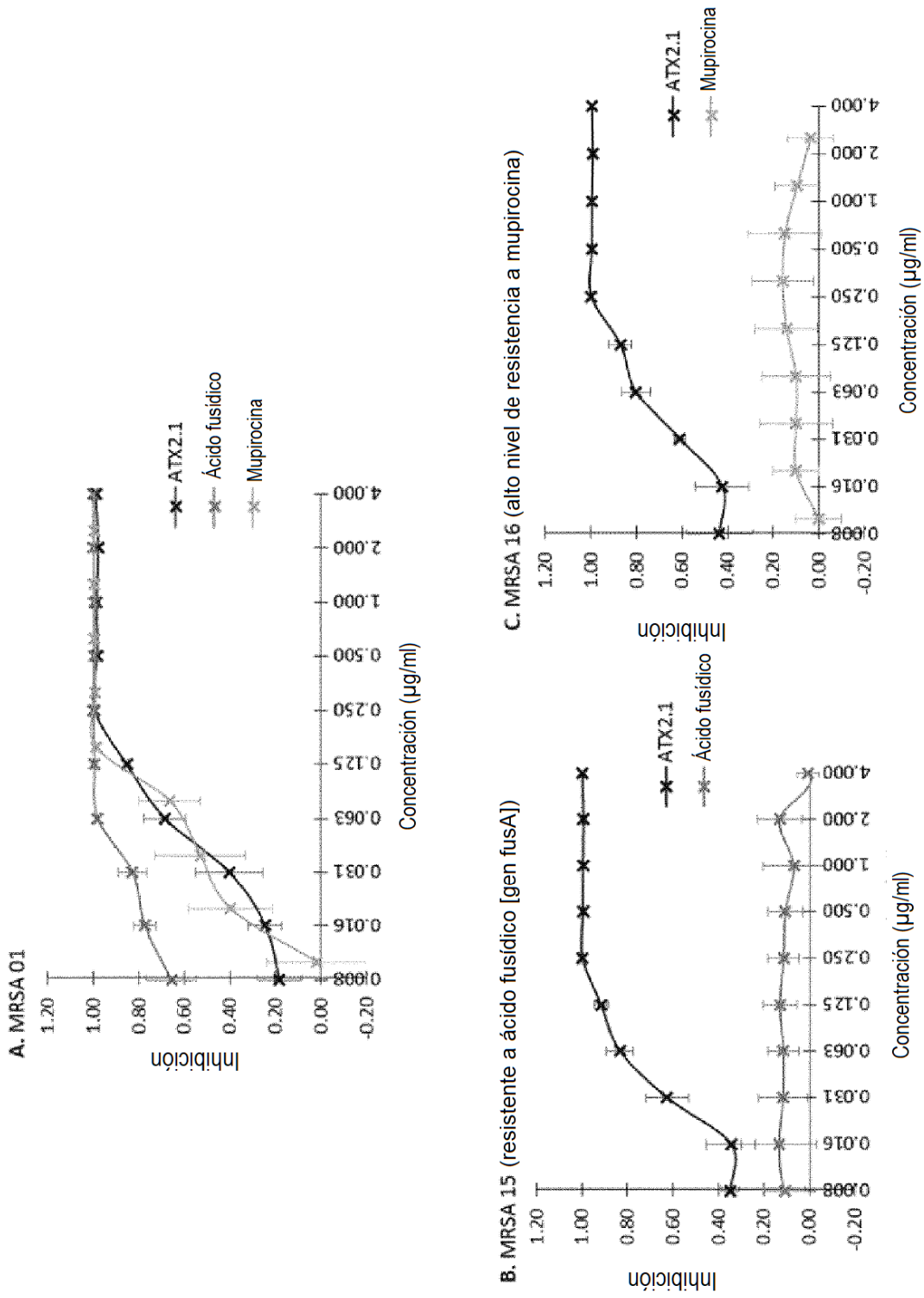


FIG. 4

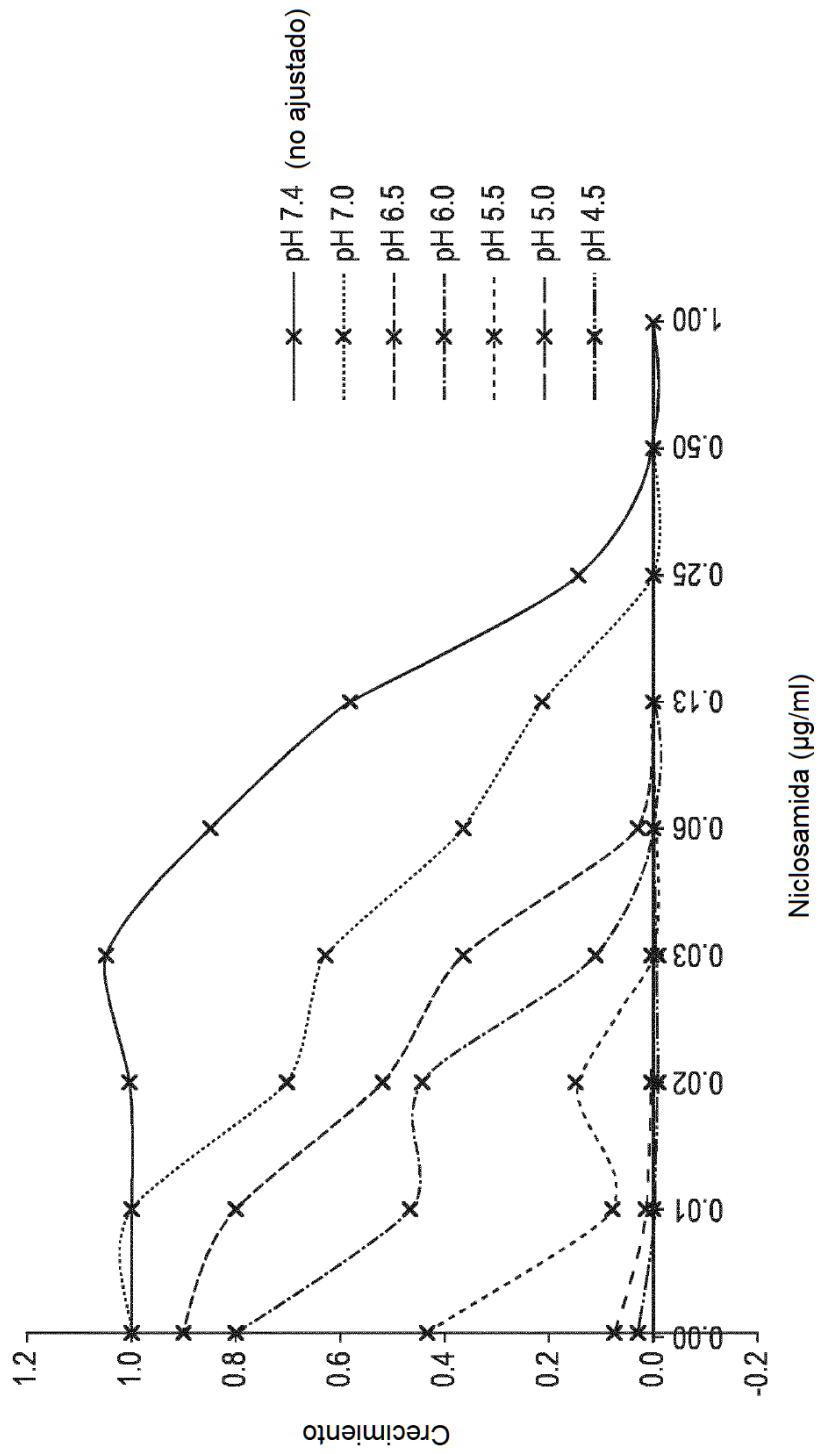


FIG. 5