

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 703**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A61K 31/145	(2006.01)
A61L 27/54	(2006.01)
A61L 29/16	(2006.01)
A61L 31/16	(2006.01)
A61L 15/44	(2006.01)
A61L 15/46	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2010 PCT/GB2010/000631**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10112848**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010 E 10715573 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2413949**

54 Título: **Inhibición de organismos de biopelículas**

30 Prioridad:

31.03.2009 GB 0905451
31.03.2009 US 165396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

O'NEIL, DEBORAH;
MERCER, DERRY y
CHARRIER, CEDRIC

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 704 703 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

Inhibición de organismos de biopelículas

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere a productos, composiciones, métodos y usos que son útiles en relación con la prevención y el tratamiento de biopelículas.

10 Antecedentes de la invención

Una biopelícula microbiana es una comunidad de células microbianas incrustadas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas y adheridas a una superficie biológica o no biótica. En estas biopelículas se puede encontrar una variedad de microorganismos (bacterias, hongos y/o protozoos, con bacteriófagos asociados y otros virus). Las biopelículas son de naturaleza ubicua, se encuentran comúnmente en una amplia gama de entornos. La comunidad científica y médica está reconociendo cada vez más que las biopelículas están implicadas en muchas infecciones, y especialmente su contribución a la recalcitrancia del tratamiento de la infección.

Las biopelículas son agentes etiológicos para varios estados de enfermedad en mamíferos y están implicadas en el 80% de las infecciones en seres humanos. Los ejemplos incluyen infecciones de la piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urogenital, infecciones de tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares (incluida la contaminación de lentes de contacto), endocarditis, infecciones en la fibrosis quística e infecciones de dispositivos médicos permanentes, tales como prótesis articulares, implantes dentales, catéteres e implantes cardíacos.

Los microbios planctónicos (es decir, microorganismos suspendidos o que crecen en un medio líquido) se usan típicamente como modelos para la investigación de susceptibilidad antimicrobiana según lo descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI) y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST). Los microbios en las biopelículas son significativamente más resistentes al tratamiento antimicrobiano que sus homólogos planctónicos. Sin embargo, no existe un método estandarizado para el estudio de la susceptibilidad a los antibióticos de los microbios de biopelículas.

La formación de biopelículas no se limita únicamente a la capacidad de los microbios para adherirse a una superficie. Los microbios que crecen en una biopelícula pueden interactuar más entre sí que con el sustrato físico real sobre el que se desarrolló inicialmente la biopelícula. Por ejemplo, este fenómeno favorece la transferencia conjugativa de genes, que ocurre a una mayor velocidad entre las células en las biopelículas que entre las células planctónicas. Esto representa una mayor oportunidad para la transferencia horizontal de genes entre bacterias, y es importante porque puede facilitar la transferencia de genes de resistencia a antibióticos o determinantes de virulencia de microbios resistentes a susceptibles. Las bacterias pueden comunicarse entre sí mediante un sistema conocido como detección de quórum, a través del cual las moléculas de señalización se liberan en el medio ambiente y su concentración puede ser detectada por los microbios circundantes. La detección de quórum permite a las bacterias coordinar su comportamiento, mejorando así su capacidad para sobrevivir. Las respuestas a la detección de quórum incluyen la adaptación a la disponibilidad de nutrientes, la defensa contra otros microorganismos que pueden competir por los mismos nutrientes y el evitar compuestos tóxicos potencialmente peligrosos para las bacterias. Es muy importante que las bacterias patógenas durante la infección de un huésped (por ejemplo, seres humanos, otros animales o plantas) coordinen su virulencia para escapar de la respuesta inmune del huésped para poder establecer una infección exitosa.

La formación de biopelículas desempeña un papel clave en muchas enfermedades infecciosas, como la fibrosis quística y la periodontitis, en las infecciones del tracto urinario y en el torrente sanguíneo y como consecuencia de la presencia de dispositivos médicos permanentes. Los mecanismos sugeridos por los cuales los microorganismos asociados a la biopelícula provocan enfermedades en su huésped incluyen los siguientes: (i) penetración retardada del agente antimicrobiano a través de la matriz de biopelícula, (ii) desprendimiento de células o agregados celulares de biopelículas de dispositivos médicos permanentes, (iii) producción de endotoxinas, (iv) resistencia al sistema inmunitario del huésped, (v) provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia antimicrobiana y/o genes determinantes de virulencia, y (vi) tasa de crecimiento alterada (es decir, inactividad metabólica) (Donlan y Costerton, Clin Microbiol Rev 15: 167-193, 2002; Parsek y Singh, Annu Rev Microbiol 57: 677-701, 2003; Costerton JW, Resistance of biofilms to stress. En 'The biofilm primer'. (Springer Berlin Heidelberg) páginas 56-64. 2007).

La evidencia experimental reciente ha indicado la existencia dentro de las biopelículas de una pequeña subpoblación de células persistentes especializadas no metabolizantes (células inactivas). Se cree que estas células pueden ser responsables de la alta resistencia/tolerancia de la biopelícula a los agentes antimicrobianos. Las células persistentes tolerantes a múltiples fármacos están presentes tanto en las poblaciones planctónicas como en las biopelículas y parece que las levaduras y las bacterias han desarrollado estrategias análogas que asignan la función de supervivencia a esta subpoblación. La protección ofrecida por la matriz polimérica permite que las células persistentes evadan la eliminación y sirvan como fuente para la repoblación. Existe evidencia de que las persistentes pueden ser

en gran parte responsables de la tolerancia a múltiples medicamentos de las biopelículas microbianas (LaFleur et al., *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 3839-46, 2006; Lewis, *Nature Reviews Microbiology* 5, 48-56, 2007).

5 Sigue existiendo la necesidad de mejores terapias para prevenir la formación de biopelículas y tratar afecciones asociadas con biopelículas microbianas.

Declaraciones de la invención

10 La invención se define por las reivindicaciones.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un producto que comprende al menos dos agentes antibiopelícula en donde al menos uno de los agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano. El otro agente antibiopelícula es la cisteamina.

15 El término "agente antibiopelícula" se usa en el presente documento para describir un agente que es capaz de destruir o inhibir el crecimiento de una biopelícula microbiana. El agente antibiopelícula puede ser capaz de romper la estructura de la biopelícula, por ejemplo la matriz mucosa extracelular, o puede ser capaz de destruir o inhibir el crecimiento de células microbianas dentro de la biopelícula.

20 La divulgación proporciona además un método para prevenir la formación de biopelículas en un entorno que comprende la etapa de administrar al medio ambiente un péptido antimicrobiano. Ventajosamente, el método comprende la etapa de administrar al medio ambiente un producto de acuerdo con la invención.

25 La invención proporciona además un producto para usar en un método para tratar una infección microbiana, particularmente una biopelícula microbiana, mediante profilaxis o terapia, que comprende la administración en una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido antimicrobiano, por ejemplo un péptido catiónico. Normalmente, el método implica la administración secuencial o combinada en una cantidad terapéuticamente eficaz de:

- un primer agente antibiopelícula; y
- 30 • un segundo agente antibiopelícula diferente al primero; en el que al menos uno de los primero y segundo agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano, por ejemplo, un péptido catiónico.

35 Los agentes activos mencionados anteriormente pueden administrarse como combinaciones libres o fijas. Se pueden proporcionar combinaciones libres como paquetes de combinación que contienen todos los agentes activos en combinaciones libres. Las combinaciones fijas son a menudo tabletas o cápsulas.

40 En la divulgación se incluye el uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, particularmente una infección microbiana de biopelícula, mediante profilaxis o terapia de los péptidos antimicrobianos, o combinaciones de agentes activos descritos anteriormente.

Los productos tienen la ventaja de que demuestran actividad antibacteriana contra, entre otras cosas, las células persistentes presentes en las biopelículas, lo que es una etapa esencial hacia la erradicación de las biopelículas.

45 Los agentes de la invención se pueden administrar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden sintetizar a partir del compuesto original que contiene una fracción básica o ácida por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de base o ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; en general, se prefieren medios no acuosos, tales como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimoséptima edición, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE. UU., 1985, página 1418, cuya divulgación se incorpora a la presente memoria por referencia; véase también Stahl et al., Editores, "Handbook of Pharmaceutical Salts Properties Selection and Use", Verlag Helvetica Chimica Acta y Wiley-VCH, 2002. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en este documento para referirse a esos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que sean, dentro del alcance de un buen juicio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de seres humanos o, según el caso, un animal sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una razonable relación riesgo/beneficio.

60 La invención incluye, por lo tanto, sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos divulgados en los que el compuesto original se modifica elaborando sales ácidas o básicas del mismo, por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario que se forman, por ejemplo, a partir de ácidos o bases orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos de dichas sales de adición de ácido incluyen acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato, canforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, clorhidrato, bromohidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato,

succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, y undecanoato. Las sales básicas incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y potasio, sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio, sales con bases orgánicas tales como sales de dicitclohexilamina, N-metil-D-glucamina y sales con aminoácidos tales como como arginina, lisina, etc. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; sulfatos de dialquilo tales como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo; haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros.

10 La divulgación, por lo tanto, incluye productos farmacéuticos que generalmente comprenden al menos:

- un primer agente antibiopelícula; y
- un segundo agente antibiopelícula diferente del primero en el que al menos el primero y segundo agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano, por ejemplo, un péptido catiónico.

15 El primer agente antibiopelícula

El primer agente antibiopelícula es un péptido antimicrobiano, en lo sucesivo denominado "el primer agente antimicrobiano". El primer agente antimicrobiano comprende aminoácidos de acuerdo con la fórmula I:



en la que 1 y m son números enteros de 1 a 10, por ejemplo 1 a 5; n es un número entero de 1 a 10; X y Y, que pueden ser iguales o diferentes, son independientemente un aminoácido hidrófobo o catiónico.

25 Preferiblemente, el primer agente antimicrobiano comprende aminoácidos de acuerdo con la fórmula (I) en la que X y Y son aminoácidos catiónicos.

30 El péptido antimicrobiano puede comprender de 2 a 200 aminoácidos, por ejemplo 3, 4, 5, 6 o 7 hasta 100 aminoácidos, incluidos 3, 4, 5, 6 o 7 hasta 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos. De acuerdo con una realización, el péptido antimicrobiano comprende 3 o 4 a 50 aminoácidos. Alternativamente, el péptido puede comprender más de 27 aminoácidos, típicamente de 27 a 300 aminoácidos, adecuadamente de 27 a 200 aminoácidos.

35 El péptido puede comprender de 100 a 200 aminoácidos, de 20 a 100, 20 y 45 aminoácidos, tales como 20, 25, 30, 35, 40, 42 o 45 aminoácidos. El péptido puede comprender entre 3 y 15 aminoácidos, por ejemplo de 5 a 15 aminoácidos.

40 Como se usa en el presente documento, el término "hidrófobo" se refiere a un aminoácido que tiene una cadena lateral que no está cargada a pH fisiológico, que no es polar y que generalmente es repelida por una solución acuosa.

Como se usa en el presente documento, el término "catiónico" se refiere a aminoácidos que tienen una carga neta que es mayor o igual a 0. En general, el término "catiónico" se refiere a aminoácidos que tienen una carga neta que es mayor que cero.

45 En general, un residuo amino hidrófobo tiene una hidrofobicidad mayor o igual a -1,10 y una carga mayor o igual a 0.

Los aminoácidos hidrófobos pueden incluir, leucina, fenilalanina, prolina, alanina, triptófano, valina, isoleucina y metionina.

50 Preferiblemente, X y/o Y son aminoácidos catiónicos, por ejemplo, seleccionados del grupo que consiste en histidina, arginina y lisina. Preferiblemente, todavía X y/o Y son arginina o lisina. X y/o Y pueden seleccionarse de aminoácidos no naturales, por ejemplo, el aminoácido catiónico ornitina.

55 X y/o Y pueden ser isómeros ópticos de un aminoácido catiónico como se define en el presente documento, por ejemplo, D o L-aminoácidos. Además, X y/o Y pueden ser aminoácidos alternantes.

60 Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. La invención también incluye isómeros conocidos (estructurales, estereo conformacionales y estereo configuracionales) y análogos estructurales de los anteriores aminoácidos, y aquellos modificados de forma natural (por ejemplo, modificación postraducciona) o químicamente, incluyendo, pero no exclusivamente, fosforilación, glicosilación, Sulfonilación y/o hidroxilación.

65 De acuerdo con una realización, el péptido puede incluir una o más sustituciones de los aminoácidos X y Y catiónicos o hidrófobos. Sin embargo, el péptido comprendería predominantemente los aminoácidos X y Y catiónicos o hidrófobos. Típicamente, el péptido puede comprender de 1 a 5 sustituciones, adecuadamente 1 a 3 sustituciones, generalmente una sustitución. Las sustituciones pueden ser terminales o no terminales.

Las sustituciones pueden consistir en aminoácidos o no aminoácidos. Las sustituciones pueden ser cargadas o no cargadas. Normalmente, una o más de las sustituciones son aminoácidos no cargados. Alternativa o adicionalmente, una o más de las sustituciones pueden ser no aminoácidos tales como cisteamina.

5 Preferiblemente, X y Y son iguales y son lisina o arginina.

De acuerdo con una realización, el péptido comprende predominantemente aminoácidos de arginina que pueden estar sustituidos con uno o más aminoácidos que no son arginina.

10 En general, el péptido comprende de 7 a 20 aminoácidos de arginina, opcionalmente sustituidos con 1 a 5 aminoácidos que no son arginina, típicamente de 3 a 5 sustituciones que no son arginina.

Alternativamente, el péptido puede comprender de 7 a 20 aminoácidos de lisina, opcionalmente sustituidos con 1 a 5 aminoácidos que no son lisina, típicamente de 3 a 5 sustituciones que no son lisina.

15 De acuerdo con una realización adicional, el péptido puede comprender de 27 a 300 aminoácidos de lisina, generalmente de 27 a 200 aminoácidos de lisina. Típicamente, el péptido no comprende sustituciones no terminales con aminoácidos que no son lisina.

20 En el péptido de fórmula (I), l y m pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 y n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En el péptido de fórmula (I), l puede ser 1, n puede ser 1 y m puede estar entre 4 y 9, por ejemplo, m puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

25 En el péptido de fórmula (I) l, n y/o m pueden estar entre 1 y 5, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5.

En el péptido de fórmula (I), l y m pueden ser un número entero entre 0 y 7, y n puede ser un número entero entre 1 y 10.

30 En el péptido de fórmula (I), l y m pueden ser 0, 1 o 2 y n puede ser un número entero entre 1 y 10.

En el péptido de fórmula (I), X y Y pueden ser iguales, l puede ser 0, m puede ser 1 y n puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

35 En el péptido de fórmula (I), X y Y pueden ser iguales, l y m pueden ser 1 y n puede ser 2, 3, 4 o 5.

En el péptido de fórmula (I), X y Y pueden ser iguales, l puede ser 1, m puede ser 2 y n puede ser 1, 2, 3 o 4.

40 En el péptido de fórmula (I), X e Y pueden ser iguales, l y m pueden ser 2 y n puede ser 1, 2, 3 o 4.

Preferiblemente, el primer agente antimicrobiano comprende una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en polilisina y poliarginina.

45 En una realización, el primer agente antimicrobiano comprende una polilisina.

En una realización alternativa, el primer agente antimicrobiano comprende poliarginina.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se considera el uso del primer agente antimicrobiano en el tratamiento de prevención de una biopelícula.

50 Típicamente, el primer agente antimicrobiano está en la forma del producto de la invención como se describe a continuación.

El segundo agente antibiopelícula

55 El segundo agente antibiopelícula es un agente que inhibe la formación de biopelícula. A modo de ejemplo, el segundo agente antibiopelícula puede inhibir la adhesión, la hidrofobicidad o la producción de limo bacteriano. El segundo agente antibiopelícula es un dispersante.

60 De acuerdo con la presente invención, el segundo agente antibiopelícula no es un péptido.

El término "dispersante" pretende incluir cualquier agente capaz de dispersar las partículas de una biopelícula. En particular, el dispersante puede promover la dispersión del limo producido por microbios tales como bacterias, mucosas que forman parte de la biopelícula, por ejemplo, mucosa producida por las células a las que se adhieren los microbios de biopelículas, y microbios de biopelículas tales como bacterias.

65

El dispersante puede ser un agente mucolítico. El agente mucolítico es una amina que es cisteamina.

El segundo agente antibiopelícula puede ser un agente antibacteriano. El agente antibacteriano puede ser un agente mucolítico, por ejemplo, un agente mucolítico que tiene actividad tanto mucolítica como antibacteriana. El agente antibacteriano es la cisteamina.

Los productos de la invención

El producto de la presente invención puede comprender un péptido antimicrobiano.

Un producto preferido comprende un péptido antimicrobiano y un agente mucolítico.

La relación del primer agente antibiopelícula con respecto al segundo agente antibiopelícula en los productos de la invención puede ser de 1:10 a 10:1; en general, al menos 2:1, por ejemplo, al menos 3:1 o 4:1. De acuerdo con una realización, la relación del primer agente antibiopelícula con respecto al segundo agente antibiopelícula es aproximadamente 1:1. Preferiblemente, el primer agente antibiopelícula es un péptido catiónico y el segundo agente antibiopelícula es un agente mucolítico y la relación del péptido catiónico:agente mucolítico varía desde 2:1 hasta 4:1. De acuerdo con una realización adicional, la relación puede ser de aproximadamente 1:1.

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

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

Los agentes activos de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica adaptada a tal vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento previsto. Los compuestos activos y la composición pueden, por ejemplo, administrarse por vía parenteral, oral, intranasal, intrabronquial, enteral, transdérmica, sublingual, rectal, vaginal, ocular o tópica. Se contempla tanto la administración local como la sistémica.

Para los fines de administración parenteral ("parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, enteral, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular, e infusión de las cuales la más preferida es la intravenosa (incluida administración intravenosa continua)) se pueden emplear soluciones en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las correspondientes sales solubles en agua. Dichas soluciones acuosas se pueden regular adecuadamente, si es necesario, y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas son especialmente adecuadas para inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles empleados se pueden obtener fácilmente mediante técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los productos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de atomización en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, rociador, atomizador, nebulizador, con o sin uso de un propelente adecuado.

Alternativamente, los productos de la invención pueden administrarse en forma de supositorio o pesario, o pueden aplicarse tópicamente en forma de gel, hidrogel, loción, solución, crema, pomada o polvo. Los productos de la invención pueden administrarse por vía dérmica o transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel, depósito o inyección subcutánea. También pueden administrarse por vía pulmonar o rectal.

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

Los productos de la invención también pueden encontrar aplicación tal como en una formulación oral en la que el producto se formula en un vehículo, por ejemplo, seleccionado de películas, cintas, geles, microesferas, pastillas, goma de mascar, dentífricos y colutorios.

La cantidad de compuesto terapéuticamente activo que se administra y el régimen de dosificación para tratar una condición de enfermedad con los compuestos y/o composiciones de esta invención depende de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso, el sexo y la condición médica del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la ruta y la frecuencia de administración, y el compuesto particular empleado, así como las propiedades farmacocinéticas del individuo tratado, y por lo tanto pueden variar ampliamente. La dosis generalmente será más baja si los compuestos se administran localmente en lugar de sistémicamente, y para prevención en lugar de para tratamiento. Dichos tratamientos pueden administrarse tan a menudo como sea necesario y durante el período de tiempo que el médico tratante considere necesario. Un experto en la materia apreciará que el régimen de dosificación o la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor a administrar puede necesitar ser optimizado para cada individuo. Las composiciones farmacéuticas pueden contener ingrediente activo en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 2.000 mg, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a 500 mg y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 200 mg. Puede ser apropiada una dosis diaria de aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 a 20 mg/kg de peso corporal. La dosis diaria se puede administrar en una a cuatro dosis por día.

Los productos de la invención se administran preferiblemente al tracto respiratorio. Por lo tanto, la presente invención también proporciona formulaciones farmacéuticas en aerosol que comprenden un producto de la invención. También se proporciona un nebulizador o inhalador que contiene un producto de la invención.

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

Los productos de la invención pueden incluir cantidades sinérgicamente eficaces de cada agente activo definido en el presente documento. Por lo tanto, la invención incluye productos que comprenden una cantidad sinérgicamente eficaz de (i) un primer agente antibiopelícula, (ii) un segundo agente antibiopelícula que es diferente del primer agente antibiopelícula y es típicamente un péptido antimicrobiano. El producto puede ser para uso en la fabricación de un medicamento, para la administración simultánea, separada o secuencial de dichos agentes en el tratamiento de una infección microbiana, por ejemplo, una infección por biopelícula. "Sinérgicamente", como se usa en este documento, puede describir la acción de los dos o más agentes del producto de la invención trabajando juntos para producir un efecto mayor que el efecto combinado esperado de los agentes usados por separado.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un sustrato al que se aplica o se une un producto de la invención. Preferiblemente, el sustrato es adecuado para la aplicación a heridas o el suministro a sitios de heridas. Preferiblemente, el sustrato permite la transferencia de los agentes activos del producto de la invención desde el sustrato al sitio de la herida para lograr su efecto antibiopelícula. El sustrato puede ser un apósito, por ejemplo, apósito para heridas. El apósito puede comprender un material de tela o puede ser un material similar a colágeno. El sustrato puede estar en cualquier forma adecuada para su aplicación a una herida, típicamente el sustrato puede estar en forma de hidrogel, coloide, pomada, crema, gel, espuma o aerosol.

Los productos de la invención también pueden encontrar una aplicación como/en un desinfectante o biocida. En este contexto, el péptido o las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden aplicar, solos o en combinación con otros agentes desinfectantes, a una superficie a tratar. Como se usa en el presente documento, una "superficie a tratar" puede ser un sustrato como se define en el presente documento y puede incluir dispositivos médicos y dispositivos permanentes, por ejemplo, cánulas intraluminales, catéteres, tubos de diálisis peritoneal, dispositivos de drenaje, prótesis articulares, implantes dentales y similares.

Métodos y uso

La divulgación proporciona un método para prevenir la formación de biopelículas en un entorno que comprende la etapa de administrar al medio ambiente un producto de acuerdo con la invención. El método puede ser *in vivo* o *ex vivo*.

De acuerdo con una realización, el método comprende la etapa de administrar un péptido antimicrobiano.

De manera ventajosa, el método comprende la etapa de administrar

- un primer agente antibiopelícula; y
- un segundo agente antibiopelícula diferente del primero en el que al menos uno del primero y segundo agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano, por ejemplo, un péptido catiónico.

El entorno puede comprender cualquier microorganismo formador de biopelículas seleccionado de bacterias, hongos, levaduras, virus y protozoos.

5 Normalmente, el microorganismo es una bacteria, por ejemplo, una bacteria Gram positiva o Gram negativa. Un patógeno bacteriano puede derivarse de una especie bacteriana seleccionada del grupo que consiste en: *Staphylococcus* spp., por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*; *Enterococcus* spp., por ejemplo, *Enterococcus faecalis*; *Streptococcus pyogenes*; *Listeria* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Mycobacterium* spp., por ejemplo, *Tuberculosis micobacteriana*; *Enterobacter* spp.; *Campylobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Streptococcus* spp., por ejemplo, *Streptococcus* Grupo A o B, *Streptococcus pneumoniae*; *Helicobacter* spp., por ejemplo, *Helicobacter pylori*; *Neisseria* spp., por ejemplo, *Neisseria gonorrhoea*, *Neisseria meningitidis*; *Borrelia burgdorferi*; *Shigella* spp., por ejemplo, *Shigella flexneri*; *Escherichia coli*; *Haemophilus* spp., por ejemplo, *Haemophilus influenzae*; *Chlamydia* spp., por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*; *Francisella tularensis*; *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus Anthracis*; *Clostridia* spp., por ejemplo, *Clostridium botulinum*; *Yersinia* spp., por ejemplo, *Yersinia pestis*; *Treponema* spp.; *Burkholderia* spp.; por ejemplo, *Burkholderia mallei* y *B. pseudomallei*.

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

Un patógeno viral puede derivarse de un virus seleccionado del grupo que consiste en: Virus de inmunodeficiencia humana (HTV1 y 2); Virus de leucemia de células T humanas (HTLV 1 y 2); Virus del Ébola; virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV-2, HPV-5, HPV-8, HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-52, HPV-54 y HPV-56); papovavirus; rinovirus; poliovirus; herpesvirus; adenovirus; virus de Epstein Barr; virus de la influenza, virus de la hepatitis B y C, virus Variola, rotavirus o coronavirus del SARS.

Un patógeno parásito puede derivarse de un patógeno parásito seleccionado del grupo que consiste en *Trypanosoma* spp. (*Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*), *Leishmania* spp., *Giardia* spp., *Trichomonas* spp., *Entamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Schistosoma* spp., *Plasmodium* spp., *Cryptosporidias* spp., *Loa Loa*, *Ascaris lumbricoides*, *Dirofilaria immitis*, *Toxoplasma* spp., por ejemplo, *Toxoplasma gondii*. Un patógeno fúngico puede derivarse de un patógeno fúngico que es del género *Candida* spp. (Por ejemplo, *C. albicans*), *Epidermophyton* spp., *Exophiala* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp., (Por ejemplo, *T. rubrum* y *T. interdigitale*), *Tinea* spp., *Aspergillus* spp., *Blastomyces* spp., *Blastoschizomyces* spp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Histoplasma* spp., *Paracoccidiomyces* spp., *Sporotrix* spp., *Absidia* spp., *Cladophialophora* spp., *Fonsecaea* spp., *Phialophora* spp., *Lacazia* spp., *Arthrographis* spp., *Acremonium* spp., *Actinomyces* spp., *Apophysomyces* spp., *Emmonsia* spp., *Basidiobolus* spp., *Beauveria* spp., *Chrysosporium* spp., *Conidiobolus* spp., *Cunninghamella* spp., *Fusarium* spp., *Geotrichum* spp., *Graphium* spp., *Leptosphaeria* spp., *Malassezia* spp., *Mucor* spp., *Neotestudina* spp., *Nocardia* spp., *Nocardiosis* spp., *Paecilomyces* spp., *Phoma* spp., *Piedraia* spp., *Pneumocystis* spp., *Pseudallescheria* spp., *Pyrenochaeta* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp., *Sporobolomyces* spp., *Syncephalastrum* spp., *Trichoderma* spp., *Trichosporon* spp., *Ulocladium* spp., *Ustilago* spp., *Verticillium* spp., *Wangiella* spp.

45 De acuerdo con una realización adicional, el microorganismo puede ser un hongo, en particular *Candida*.

El método de la invención se puede usar para minimizar y, preferiblemente, prevenir la formación de biopelículas en una variedad de ambientes que incluyen, entre otros, hogares, lugares de trabajo, laboratorios, entornos industriales, entornos acuáticos (por ejemplo, sistemas de tuberías), dispositivos médicos que incluyen dispositivos permanentes, como se definen en el presente documento, dispositivos dentales o implantes dentales, cuerpo animal, por ejemplo, cuerpo humano.

El método de la invención se puede usar por lo tanto, en la boca para prevenir la formación de placa o caries en un diente humano o implante dental, por ejemplo, una dentadura postiza.

El método de la invención se puede usar para prevenir o restringir la formación de una biopelícula en el cuerpo humano, especialmente en el tratamiento de infecciones microbianas. Las condiciones asociadas con las infecciones por biopelículas pueden incluir infecciones tóxicas, infecciones orales e infecciones sistémicas. Las infecciones tóxicas pueden incluir heridas, úlceras y lesiones, por ejemplo, heridas cutáneas tales como cortes o quemaduras, y condiciones asociadas con ellas.

Las infecciones orales pueden incluir gingivitis, periodontitis y mucositis.

Las infecciones sistémicas pueden incluir fibrosis quística y otras afecciones asociadas con infecciones de la mucosa, por ejemplo, infecciones gastrointestinales, urogenitales o respiratorias.

Otro aspecto de la invención reside en los métodos para tratar, prevenir o retrasar la progresión de una enfermedad o afección asociada con la presencia de una infección microbiana de biopelículas en un mamífero, especialmente un ser humano, administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto de la invención al mamífero.

5 Por "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de una o más sustancias activas que, dentro del alcance del buen juicio médico, es suficiente para proporcionar un efecto deseado sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable de beneficio/riesgo.

10 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el método comprende la etapa de administrar un péptido antimicrobiano.

De manera ventajosa, el método comprende la etapa de administrar

15 • un primer agente antibiopelícula; y
• un segundo agente antibiopelícula diferente del primero en el que al menos uno del primero y segundo agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano, por ejemplo, un péptido catiónico.

20 La divulgación proporciona además el uso de un producto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, particularmente una infección microbiana de biopelículas, mediante profilaxis o terapia de combinaciones de agentes activos descritos anteriormente.

25 Adicionalmente, la presente divulgación proporciona el uso del péptido antimicrobiano descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, particularmente una infección microbiana de biopelícula, mediante profilaxis o terapia.

30 De este modo, el producto de la invención puede ser útil en la prevención, el retraso de la progresión o el tratamiento de una enfermedad o afección seleccionada del grupo que consiste en infecciones de la piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urogenital, infecciones de tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares (incluida la contaminación de lentes de contacto), endocarditis, infecciones en la fibrosis quística e infecciones de dispositivos médicos permanentes, como se describe en este documento.

35 La invención también incluye métodos de tratamiento en los que un producto de la invención se administra a un mamífero junto con uno o más agentes antibacterianos, por ejemplo, un antibiótico.

40 Los inventores han encontrado sorprendentemente que ciertos dispersantes, en particular los agentes mucolíticos, inhiben el crecimiento de células persistentes de biopelículas. Por lo tanto, la divulgación también incluye un método para tratar/prevenir la formación de biopelículas en un entorno que comprende administrar a dicho entorno un agente mucolítico, por ejemplo, cisteamina. El agente mucolítico se puede administrar solo o en combinación con otro agente antimicrobiano, por ejemplo, un péptido antimicrobiano.

45 La divulgación también proporciona un método para tratar una infección microbiana, particularmente una biopelícula microbiana, mediante profilaxis o terapia, que comprende la administración en una cantidad terapéuticamente eficaz de un dispersante, en particular un agente mucolítico, por ejemplo cisteamina.

50 La divulgación proporciona además el uso de un dispersante, en particular un agente mucolítico, por ejemplo cisteamina, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección microbiana, particularmente una infección microbiana de biopelícula.

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

55 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, la memoria descriptiva debe entenderse como contemplando la pluralidad y la singularidad, a menos que el contexto requiera lo contrario.

60 Los rasgos, números enteros, características, compuestos, fracciones químicas o grupos descritos junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención deben entenderse como aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento, a menos que sea incompatible con ellos.

65 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significa "que incluye pero no se limita a", y no pretenden excluir (y no lo hacen) otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas.

En general, el término "aproximadamente" pretende abarcar un intervalo del 10% o menos de cualquier valor numérico al que se aplica.

Otros aspectos y formas de realización de la invención se exponen en la siguiente descripción y en las reivindicaciones.

La invención se describirá ahora a modo de ejemplos solamente con referencia a las siguientes figuras en las que:

Figura 1: Actividad antibacteriana de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células planctónicas de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 2: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP108 y NM001 (cisteamina) contra las células planctónicas de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 3: Actividad antibacteriana de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células planctónicas de *S. aureus* DSM 11729.

Figura 4: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP108 y NM001 (cisteamina) contra células planctónicas de *S. aureus* DSM 11729.

Figura 5: Actividad de NP339 contra células de biopelícula de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 6: Actividad de NP339 contra células persistentes de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 7: Actividad de NP341 contra células de biopelícula de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 8: Actividad de NP341 contra células persistentes de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 9: Actividad de NM001 (cisteamina) contra células de biopelícula de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 10: Actividad de NM001 (cisteamina) contra células persistentes de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Figura 11: Actividad antibacteriana de las combinaciones de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células de biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 12: Actividad antibacteriana de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 13: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP108 y NM001 (cisteamina) contra células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 14: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP339 y NM001 (cisteamina) contra células de biopelícula (a) de *P. aeruginosa* DSM 1128, (b) de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47, (c) de *P. aeruginosa* DSM 1299 y (d) de *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Figura 15: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP339 y NM001 (cisteamina) contra (a) de *P. aeruginosa* DSM 1128 y (b) células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

Figura 16: Actividad antibacteriana de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células de biopelícula de *S. aureus* DSM 11729.

Figura 17: Actividad antibacteriana de combinaciones de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células de biopelícula de *S. aureus* DSM 11729

Figura 18: Actividad antibacteriana de NP108 y NM001 (cisteamina) contra células persistentes de *S. aureus* DSM 11729.

Figura 19: Actividad antibacteriana de las combinaciones NP108 y NM001 (cisteamina) contra células persistentes de *S. aureus* DSM 11729.

Figuras 20 y 21: Actividad de los agentes mucolíticos N-acetilcisteína (Figura 20(a) y 20(b)) y NM001 (cisteamina) (Figura 21(a) y 21(b)) solos y en combinación con NP341 contra células planctónicas de *P. aeruginosa* 27853.

Figura 22a: biopelícula de *S. aureus* de control sin tratar después de 24 horas.

Figura 22b: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con NM001 (cisteamina) a razón de 2 mg/mL.

- Figura 22c: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con colistina a razón de 0,2 mg/mL.
- Figura 22d: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con el péptido NP108 a razón de 2 mg/mL.
- 5 Figura 23a: biopelícula de *S. aureus* de control sin tratar después de 24 horas.
- Figura 23b: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con NM001 (cisteamina) a razón de 2 mg/mL.
- Figura 23c: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con colistina a razón de 0,2 mg/mL.
- 10 Figura 23d: biopelícula de *S. aureus* 24 horas después del tratamiento con el péptido NP108 a razón de 2 mg/mL.
- Figura 24a: biopelícula de *P. aeruginosa* de control sin tratar después de 24 horas.
- 15 Figura 24b: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con NM001 (cisteamina) a razón de 2 mg/mL.
- Figura 24c: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con colistina a razón de 0,2 mg/mL.
- 20 Figura 24d: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con el péptido NP108 a razón de 2 mg/mL.
- Figura 25a: biopelícula de *P. aeruginosa* de control sin tratar después de 24 horas.
- Figura 25b: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con NM001 (cisteamina) a razón de 2 mg/mL.
- 25 Figura 25c: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con colistina a razón de 0,2 mg/mL.
- Figura 25d: biopelícula de *P. aeruginosa* 24 horas después del tratamiento con el péptido NP108 a razón de 2 mg/mL.
- 30 Figura 26: Actividad de NP432 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1.
- Figura 27: Actividad de NP445 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1.
- 35 Figura 28: Actividad de NP458 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1.
- Figura 29: Actividad de NP462 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1.
- 40 Figura 30: Actividad de NP432 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923.
- 45 Figura 31: Actividad de NP445 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923.
- Figura 32: Actividad de NP458 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923.
- 50 Figura 33: Actividad de NP462 solo y en combinación con NM001 (cisteamina) o en combinación con NP108 contra biopelícula de *S. aureus* ATCC 25923.
- 55 Tabla 1: resumen de la actividad de los agentes antimicrobianos probados contra las cepas de *P. aeruginosa* Gram-negativa y *Staphylococcus* spp Gram positiva.
- Tabla 2: Resumen de la actividad de los agentes antimicrobianos probados contra *S. epidermidis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.
- 60

Tabla 2

NP	Secuencia	MIC (µg/mL) a pH 7						Ejemplo # 1-2 <i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47
		<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC25923	<i>S. aureus</i> DSMZ11729	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>P. aeruginosa</i> ATCCBAA-47	
NP432	RRRFRFFFRFR	<7,8	31,25	62,5	62,5	15,6	15,6	
NP438	HHHFRFFFRFR	<7,8	>500	>500	>500	500	>500	
NP441	HHPRRKPRPKRHH	>500	>500	>500	>500	>500	>500	
NP445	KKFPWRLRLRYGRR	<7,8	500	500	62,5	31,25	31,25	
NP449	KKPRRKPRRPKRKK- cist	31,25	250	125	250	125	250	
NP451	HHPRRKPRRPKRHH- cist	125	500	500	>500	>500	>500	
NP457	RRRR-cist	31,25	125	125	>500	>500	250	
NP458	RRRRHH-cist	31,25	250	250	250	125	62,5	

Tabla 2

NP	MBC (µg/mL) después MIC a pH 7		S. aureus		S. aureus DSMZ11729	P. aeruginosa DSMZ1128		P. aeruginosa DSMZ1299	Ejemplo # 3 P. aeruginosa ATCC BAA-47	
	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> DSMZ11729		<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1128	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299		<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47	
NP432		16	250	500	250(2)	32 (2)	250			
NP438		125	>500	>500	>500	>500	>500			
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500			
NP445		62.5	>500	>500	250	125	250			
NP449		125	>500	250	>500(2)	250 (2)	>500			
NP451	>500	125	>500	>500	>500	>500	>500			
NP457	>500	125(2)	62.5	125(2)	>500	>500	>500			
NP458		500	125	250	>500	>500	>500			

Tabla 2

NP	Ejemplo # 4		Ejemplo # 3		Ejemplo # 4		Ejemplo # 4		MBC (µg/mL) pH 5,5, NaCl 320 mM		
	<i>P. aeruginosa</i> DSMZ1299	MIC (µg/mL) <i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47	MIC (µg/mL) <i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47	MIC (µg/mL) <i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47	MBC (µg/mL) <i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47	MBC (µg/mL) <i>S. aureus</i> 11729	<i>P. aeruginosa</i> ATCC BAA-47
NP432		>500	125	>500	125	>500	125	>500	>500	>500	>500
NP438		>500	125	>500	62,5	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP441	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP445		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP449		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP451	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	>500
NP457	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
NP458		>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500

Ejemplos

Actividad de los agentes antimicrobianos contra las biopelículas bacterianas.

5 Materiales y métodos

1.1 Cepas bacterianas

10 Se utilizaron en este estudio *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, de *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1), *P. aeruginosa* DSM1128, *P. aeruginosa* DSM1299 y *S. epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Staphylococcus aureus* DSM 11729 resistente a meticilina (MRSA) (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Se obtuvieron cuatro aislados clínicos de *P. aeruginosa* (NH57388A-D, Hoffmann et al., 2005, 2007) y se usaron para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

15 1.2 Preparación de compuestos antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos probados en este estudio fueron el péptido catiónico NP108, que corresponde a un bromhidrato de poli-L-lisina de 10 a 20 kDa, y cisteamina (NM001). Ambos agentes se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Gillingham, Reino Unido) y las soluciones madre se prepararon a razón de 20 mg/mL en agua pura de 14-18 MΩ.cm (sistema de purificación de agua Purite HP40, Oxon, Reino Unido). Una vez disueltas, las preparaciones se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0,22 μm (Millipore, Watford, Inglaterra) y se almacenaron a -20°C.

Los siguientes péptidos antimicrobianos NovaBiotics también fueron investigados

NP339	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR
NP340	Ac-dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
NP341	dRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdRdR-CONH
NP352	RRRRRRRRRRRRRRRR
NP432	RRRFRFFFRFRRR
NP438	HHHFRFFFRFRRR
NP441	HHPRRKPRRPKRHH
NP445	KKFPWRLRLRYGRR
NP449	KKPRRKPRRPKRKK-cisteamina
NP451	HHPRRKPRRPKRHH-cisteamina
NP457	RRRRR-cisteamina
NP458	RRRRRHH-cisteamina

25 Los péptidos antimicrobianos de NovaBiotics fueron sintetizados por NeoMPS (Estrasburgo, Francia) utilizando la síntesis de Fmoc y tenían una pureza de al menos el 95%.

30 1.3 Preparación del inóculo bacteriano.

El inóculo bacteriano se estableció mediante el método de dilución a partir de cultivos de crecimiento activo en caldo Mueller-Hinton, estandarizado con un estándar de turbidez McFarland de 0,5 como se describe en el método CLSI M26-A.

35 1.4 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC)

40 Para determinar la prevención de la formación de biopelículas, tanto el inóculo bacteriano como los agentes antimicrobianos se agregaron simultáneamente a las placas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y la densidad óptica se leyó a 625 nm en un lector de placas de microtitulación (BioTek Powerwave XS, Winooski, EE. UU.). La MIC se obtuvo como la concentración más baja de antimicrobianos que muestra una inhibición total del crecimiento bacteriano.

1.5 Determinación de la concentración inhibitoria fraccional (FIC)

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

50
$$FIC = MIC_{A[combinación]} / MIC_{A[solo]} + MIC_{B[combinación]} / MIC_{B[solo]}$$

Las combinaciones de aditivos de dos agentes antimicrobianos se indican mediante un índice FIC de 1, mientras que un índice FIC <1 indica combinaciones sinérgicas. Las combinaciones neutrales darían un FIC entre 1 y 4, un índice FIC mayor que 4 indica efectos antagonistas entre los dos agentes antimicrobianos.

La FIC también se calculó para evaluar la interacción de dos agentes antimicrobianos en combinación contra biopelículas bacterianas. Las mismas fórmulas aplicadas, usando MBEC en lugar de MIC.

1.6 Determinación de la concentración mínima para erradicación de biopelículas (MBEC)

Se añadió un volumen total de 100 µL de inóculo bacteriano en Mueller-Hinton a cada pozo de placas de 96 pozos (placas para exposición) y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h en una plataforma de agitación giratoria (Grant-bio PS-3D, Shepreth, Inglaterra) a 24 rpm para permitir la formación de biopelícula.

Las placas para exposición se enjuagaron luego una vez con PBS estéril (1x) y se agregaron diluciones en serie de agentes antimicrobianos en Mueller-Hinton a las placas para exposición. Las placas para exposición se incubaron a 37°C durante 24 h en una plataforma de agitación giratoria (Grant-bio PS-3D, Shepreth, Inglaterra) a 24 rpm.

Los sobrenadantes de cada una de las placas para exposición se transfirieron a placas nuevas y se midió la densidad óptica a 625 nm en un lector de placas de microtitulación (BioTek Powerwave XS, Winooski, EE. UU.). La MBEC se obtuvo por la concentración más baja de antimicrobianos que no mostró crecimiento bacteriano.

1.7 Estimación de las células persistentes en las biopelículas

Tras la transferencia del sobrenadante de las placas para exposición, las biopelículas se enjuagaron una vez con PBS estéril (1x) y se agregaron 100 µL de solución de tinción fluorescente BacLight de bacterias vivas/muertas (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) que contenía SYTO9 4 µM y yoduro de propidio 20 µM (PI) en PBS estéril (1x) a los pozos de las placas para exposición. Las placas se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos y la fluorescencia se leyó a 485 (ex)/528 (em) y 485 (ex)/645 (em) para fluorescencia de SYTO9 y PI, respectivamente, en el lector de placas de microtitulación de fluorescencia (BioTek Synergy HT, Winooski, EE. UU.) con la sensibilidad establecida en 50 y se seleccionó la posición de la óptica inferior. La observación directa de las biopelículas con un microscopio de fluorescencia Axiovert 40 (Zeiss, Göttingen, Alemania) permitió identificar la presencia de bacterias vivas y muertas y se tomaron imágenes de las biopelículas con un aumento de 100 a 400 veces.

La viabilidad relativa de las células persistentes se determinó mediante la relación de mediciones de fluorescencia de bacterias vivas/muertas y se usaron observaciones microscópicas para confirmar la presencia o ausencia de células vivas.

2. Resultados

2.1 Prevención de la formación de biopelícula

Para evaluar la prevención de la formación de biopelículas por bacterias Gram positivas y Gram negativas, se agregaron simultáneamente en las placas el inóculo bacteriano y los agentes antimicrobianos. El intervalo de concentraciones de agentes antimicrobianos fue de 0-500 µg/mL de NP108 y 0-320 µg/mL de cisteamina contra la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 y 0-1000 µg/mL de NP108 y 0-320 µg/mL de cisteamina contra MRSA Gram positiva.

2.1.1 Actividad contra *P. aeruginosa* ATCC BAA-47

La MIC de NP108 fue de 62,5 µg/mL y 320 µg/mL para cisteamina. NP108 fue bactericida a 250 µg/mL mientras que la cisteamina no fue bactericida hasta 320 µg/mL (datos no mostrados).

En presencia de 160 µg/mL de cisteamina, la MIC de NP108 se redujo a 31,25 µg/mL. Cuando la concentración de cisteamina se duplicó (es decir, 320 µg/mL) no se observó crecimiento independientemente de la concentración de NP108.

La determinación de la FIC para esta combinación indica que los agentes antimicrobianos tienen efectos aditivos (FIC = 1). Además, se obtuvo actividad bactericida en presencia de 125 µg/mL de NP108 y 320 µg/mL de cisteamina (datos no mostrados), lo que confirma el efecto aditivo de estos agentes.

2.1.2 Actividad contra *S. aureus* DSM 11729

La MIC de NP108 fue de 125 µg/mL y más de 320 µg/mL para la cisteamina. NP108 fue bactericida a 125 µg/mL mientras que la cisteamina no fue bactericida hasta 320 µg/mL (datos no mostrados).

Las concentraciones crecientes de cisteamina mostraron una mayor inhibición del crecimiento para cualquier concentración dada de NP108. En presencia de 40 µg/mL de cisteamina, la MIC de NP108 se redujo a 31,25 µg/mL y se redujo a 15,625 µg/mL cuando se agregaron 320 µg/mL de cisteamina.

La determinación de la FIC para esta combinación indica que los agentes antimicrobianos tienen al menos efectos aditivos (FIC <1). Además, se obtuvo actividad bactericida en presencia de 31,25 µg/mL de NP108 y ≥ 160 µg/mL de cisteamina, así como 62,5 µg/mL de NP108 y ≥ 80 µg/mL de cisteamina (datos no mostrados), lo que confirma el efecto aditivo de estos agentes

5 El apéndice 1 muestra la actividad en el transcurso del tiempo de los péptidos de arginina lineales cortos (NP339, NP340, NP341 y NP352) contra células planctónicas de *S. aureus* DSM 11729.

10 El Apéndice 2 proporciona un resumen de la actividad de NP108, cisteamina, ambos compuestos en combinación, así como la actividad de NP339 y NP341 contra células planctónicas de *S. aureus* DSM 11729 y *P. aeruginosa* BAA-47.

2.2 Destrucción de biopelículas formadas

15 La evaluación de la actividad de NP108 y cisteamina frente a biopelículas bacterianas se llevó a cabo con biopelículas de 24 h y también se determinó la actividad de ambos compuestos en combinación. La actividad de los agentes antimicrobianos contra las biopelículas bacterianas se determinó por su actividad contra las células de biopelículas y contra las células persistentes.

2.2.1 Actividad del NP339 contra las biopelículas bacterianas

20 La Figura 5 muestra la alta actividad de NP339 contra las biopelículas de 3 especies de *Staphylococcus*, resultando en MBEC de 156 a 625 µg/mL. El aumento de la densidad óptica a la dosis más alta de NP339 contra *S. aureus* 25923 probablemente sea un artefacto debido a la naturaleza compleja y heterogénea de las biopelículas microbianas. En contraste, NP339 redujo el crecimiento de *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1), pero incluso la dosis más alta probada (es decir, 5 mg/mL) no fue suficiente para inhibir el 100% de las células de biopelícula.

30 La Figura 6 proporciona evidencia de que NP339 es activo contra células persistentes. En contraste con la actividad de NP339 contra las células de biopelícula de las 4 cepas analizadas, fue menos activa contra las células persistentes de las especies de *Staphylococcus* que las de *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1). NP339 fue capaz de inhibir la viabilidad de las células persistentes de *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1) a 625 µg/mL.

2.2.2 Actividad de NP341 contra biopelículas bacterianas

35 De manera similar a NP339 (Figura 5), NP341 mostró una reducción significativa en la viabilidad de las células de biopelículas. La MBEC para MRSA 11729 y *S. epidermidis* 12228 fue de 625 µg/mL. NP341 redujo la viabilidad de las células de biopelículas de MRSA 11729 y de *P. aeruginosa* BAA-47 (PAO1) en un factor de 2 a 3 veces.

40 Como se observa con NP339, la viabilidad de las células persistentes de *P. aeruginosa* se inhibió totalmente a 625 µg/mL de NP341. La viabilidad de las células persistentes de las 3 especies de *Staphylococcus* se redujo en un 25 a 50%.

2.2.3 Actividad de la cisteamina contra biopelículas bacterianas

45 La Figura 9 proporciona evidencia de que la cisteamina tiene actividad antimicrobiana contra las células de biopelículas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas analizadas.

La Figura 10 muestra la actividad de la cisteamina contra células persistentes de las bacterias Gram negativas y Gram positivas analizadas.

50 Los resultados presentados aquí muestran la actividad antimicrobiana de los péptidos catiónicos cortos lineales NP339 y NP341 contra las biopelículas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos compuestos parecen ser más efectivos contra las células de biopelículas de las bacterias Gram positivas que las bacterias Gram negativas, mientras que es lo contrario contra las células persistentes. La cisteamina mostró actividad contra las células de biopelículas a altas concentraciones, sin embargo, suprimió la viabilidad de las células persistentes Gram positivas y Gram negativas a la concentración más baja probada (es decir, 6,25 mg/mL).

2.2.4 Actividad de NP108 y cisteamina en combinación contra *P. aeruginosa* ATCC BAA-47

60 La combinación de estos dos agentes antimicrobianos mostró una inhibición completa del crecimiento bacteriano en presencia de 250 µg/mL de NP108 y 62,5 a 500 µg/mL de cisteamina. La adición de 31,25 µg/mL de cisteamina a 500 µg/mL de NP108 tuvo un efecto similar, mientras que 31,25 µg/mL de cisteamina más 250 µg/mL de NP108 mostró solo una inhibición parcial del crecimiento bacteriano.

65 La FIC obtenida con esos valores de MBEC ($MBEC_{NP108 [sola]} > 500 \mu\text{g/mL}$, $MBEC_{NP108 [combinación]} = 250 \mu\text{g/mL}$, $MBEC_{cisteamina [combinación]} = 62,5 \mu\text{g/mL}$, $MBEC_{cisteamina [sola]} = > 100,00 \mu\text{g/mL}$) fue de ~0,5, lo que indica un efecto

sinérgico entre estos dos agentes antimicrobianos. Esto es consistente con las observaciones realizadas a partir de la actividad de la combinación de NP108/cisteamina contra las células planctónicas (Figura 2).

La actividad de NP108 y cisteamina contra las células persistentes se evaluó utilizando un método de tinción de fluorescencia para determinar la viabilidad relativa de las células. Las moléculas fluorescentes de unión a ácido nucleico utilizadas fueron SYTO9 y PI, que penetran en todas las células bacterianas (fluorescencia verde) y en células con rotura de membrana (fluorescencia roja), respectivamente. Por lo tanto, la relación de fluorescencia verde (vivas)/roja (muertas) emitida da una indicación de la viabilidad relativa de la población bacteriana y se usa para estimar la presencia de células vivas residuales correspondientes a células persistentes dentro de la biopelícula.

La Figura 12 muestra que la viabilidad relativa de las biopelículas tratadas con NP108 o con cisteamina sigue siendo significativa, lo que indica la falta de actividad de estos compuestos contra las células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47.

La Figura 13 proporciona evidencia de que la combinación de NP108 y cisteamina mostró una mayor actividad contra las células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 que cualquiera de los compuestos solos (Figura 12). Las combinaciones más eficientes contra esas células fueron 250-500 µg/mL de NP108 y 62,5-500 µg/mL de cisteamina. Estas combinaciones mostraron la viabilidad relativa más baja dentro de las biopelículas. Se obtuvieron resultados similares con 31,25 µg/mL de NP108 y 500 µg/mL de cisteamina, observándose solo una inhibición parcial con 250 µg/mL de cisteamina.

La actividad de estos compuestos contra células persistentes muestra similitudes con el perfil de combinaciones óptimas obtenidas contra las células de biopelícula (Figura 11). Además, las observaciones microscópicas directas de las biopelículas teñidas con fluorescencia confirmaron la actividad de estas combinaciones contra las células persistentes ya que no se pudieron observar células vivas en presencia de 250-500 µg/mL de NP108 y 62,5-500 µg/mL de cisteamina (datos no mostrados).

2.2.5 Actividad de NP339 y cisteamina en combinación contra *P. aeruginosa*

La Figura 14 (a)-(d) muestra la actividad de 3 concentraciones de NP339: 1 µg/mL, 10 µg/mL y 100 µg/mL en combinación con concentraciones crecientes de cisteamina hasta 10 mg/mL contra 4 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Estos datos demuestran claramente el aumento de la actividad antimicrobiana contra las células de biopelículas de *P. aeruginosa* de NP339 en combinación con cisteamina. Las siguientes figuras muestran ejemplos de la actividad de estas combinaciones contra células persistentes de 2 de estas cepas.

La Figura 16 muestra la actividad de NP108 y cisteamina contra células de biopelícula de *S. aureus* DSM 11729. La MBEC para la cisteamina fue de 250 µg/mL, mientras que NP108 inhibió el crecimiento de esas células a 125 µg/mL.

La combinación de NP108 y cisteamina mostró una inhibición completa del crecimiento bacteriano en presencia de 31,25 µg/mL de NP108 y 62,5 µg/mL de cisteamina y una inhibición parcial con concentraciones más bajas de cualquiera de los compuestos (Figura 17). Por lo tanto, la FIC obtenida con esas MBEC (MBEC_{NP108 [sola]} 125 µg/mL, MBEC_{NP108 [combinación]} = 31,25 µg/mL, MBEC_{cisteamina [sola]} = 250 µg/mL, MBEC_{cisteamina [combinación]} = 62,5 µg/mL) fue 0,5 lo que indica un efecto sinérgico entre estos dos agentes antimicrobianos contra la biopelícula de estas bacterias Gram positivas. Se observaron resultados similares para biopelículas bacterianas Gram negativas (Figura 11). Esto también es consistente con las observaciones realizadas a partir de la actividad de la combinación de NP108/cisteamina contra las células planctónicas de *S. aureus* DSM 11729 (Figura 4).

De manera similar a la falta de actividad observada contra las células persistentes de *P. aeruginosa* ATCC BAA-47 (Figura 12), la viabilidad relativa de las biopelículas de *S. aureus* DSM 11729 tratadas con NP108 o cisteamina sigue siendo significativa, lo que indica la falta de actividad de estos compuestos en bajas concentraciones contra las células persistentes de estas bacterias Gram positivas (Figura 18).

La combinación de NP108 y cisteamina mostró una mayor actividad contra las células persistentes de *S. aureus* DSM 11729 que cualquiera de los compuestos solos (Figura 19). Las combinaciones más eficaces contra esas células fueron de 250-500 µg/mL de NP108 y 125-250 µg/mL de cisteamina. Estas combinaciones mostraron la viabilidad relativa más baja dentro de las biopelículas. Se obtuvieron resultados similares con 62,5 µg/mL de NP108 y 500 µg/mL de cisteamina. Las combinaciones con concentraciones más bajas de cualquiera de los compuestos mostraron una alta viabilidad relativa dentro de las biopelículas.

A diferencia de las células persistentes Gram negativas, las observaciones microscópicas directas de las biopelículas de *S. aureus* DSM 11729 teñidas con fluorescencia indicaron la presencia de células vivas residuales en las concentraciones combinadas más altas de NP108 y cisteamina (datos no mostrados).

La Tabla 1 proporciona un resumen de la actividad de los péptidos de arginina cortos NP339, NP341, la poli-L-lisina NP108, la cisteamina y la combinación de NP108 con cisteamina contra una bacteria Gram positiva y Gram negativa.

5 Tabla 1: resumen de la actividad de los agentes antimicrobianos probados contra las cepas de *P. aeruginosa* Gram negativa y la *Staphylococcus* spp Gram positiva. El número entre paréntesis indica el número máximo de cepas probadas. MIC: concentración de inhibición mínima; MBEC: concentración mínima de erradicación de biopelículas; FIC: concentración inhibitoria fraccional.

		Cepas de <i>P. aeruginosa</i> (7)	<i>Staphylococcus</i> spp (4)
MIC (µg/mL)			
	NP108	31,25 - 500	16 - 125
	NP339	62,5	4 - 128
	NP341	31,25	250
	Cisteamina	300 - 2.500	300 - 625
	NP108/ Cisteamina	31,25/160	31,25/40
FIC	NP108/ Cisteamina	1	0,6
MBEC (µg/mL)			
	NP108	250 - >500	125 - 250
	NP339	> 5.000	156 - 625
	NP341	> 5.000	625 - > 5.000
	Cisteamina	> 5.000	> 25.000
	NP108/ Cisteamina	125/125 - 250/62,5	31,25/62,5 - 125/125
FIC	NP108/ Cisteamina	≤0,75	0,5 - 1
Persistentes (µg/mL)			
	NP108	250 - > 500	> 500
	NP339	625	625 - > 5.000
	NP341	625	625 - > 5.000
	Cisteamina	500 - 6.250	6.250 - 12.500
	NP108/ Cisteamina	62,5/250 - 250/62,5	> 250/> 250
FIC	NP108/ Cisteamina	0,75 - 1	≤ 0,5

10 Notas:

1- el apéndice 1 muestra la MIC de los antimicrobianos de arginina cortos probados contra *Staphylococcus aureus* DSM 11729.

15 2- el apéndice 2 muestra la actividad de los agentes mucolíticos cisteamina y N-acetilcisteína en combinación con NP341 contra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

20 Apéndice 1: Los datos (no mostrados) demuestran la actividad de péptidos de arginina lineales cortos durante un período de 48 h contra células planctónicas *S. aureus* DSM 11729 resistentes a la metilina (MRSA). El intervalo de concentraciones analizadas como se muestra en las leyendas están en mg/mL. Los datos (no mostrados) demuestran la actividad de los péptidos de arginina lineales cortos durante un período de 48 h contra las células planctónicas *S. aureus* DSM 11729 resistentes a la metilina (MRSA). El transcurso del tiempo demuestra que la inhibición del crecimiento bacteriano está asociada con la dosis de antimicrobianos y al momento de la exposición a las células. Se observó actividad bactericida completa para NP339, NP 340 y NP352 a concentraciones superiores a 0,5 mg/mL durante el período de 48 h; 0,125 y 0,25 mg/mL mostraron una inhibición completa durante al menos 24 h, y concentraciones más bajas, tales como 0,06 y 0,03 mg/mL, mostraron una inhibición completa durante al menos 20 h y 15 h, respectivamente. Se obtuvieron resultados similares con NP341, excepto que 0,25 mg/mL mostraron una inhibición completa durante el período de 48 h.

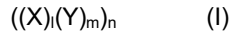
30 Apéndice 2: en combinación con 3-6 mg/mL de N-acetilcisteína, sin embargo, solo se necesitan 205 µg/mL de NP341 para alcanzar la MBEC (Figura 20a). Se observó una actividad similar para la combinación de estos 2 compuestos contra células persistentes: 1.024 µg/mL de NP341 + 3128 µg/mL de N-acetilcisteína inhibió aproximadamente el 75% de las células persistentes, que es una inhibición mucho más alta que la obtenida con cualquiera de los dos compuestos solos (Figura 20b).

35 La combinación de cisteamina o N-acetilcisteína con NP341 muestra un aumento de la actividad antibacteriana en comparación con la actividad de cualquiera de los compuestos solo. La MBEC de NP341 solo contra *P. aeruginosa* ATCC 27853 fue más de 2 mg/mL y más de 100 mg/mL para cisteamina (Figura 21a). Esto indica que no hay un efecto cooperativo entre los dos compuestos contra las células de biopelícula de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Sin embargo, dicha cooperación se observó contra las células persistentes: 205 µg/mL de NP341 + 3 mg/mL de cisteamina inhiben aproximadamente el 75% de las células persistentes, que es mucho más alta que cualquiera de los dos compuestos solos (Figura 21b).

5 Cuando se utiliza en combinación con NP339, se observó que la adición de cisteamina incluso en pequeñas cantidades ayuda a reducir los valores de MBEC de NP339 (Figura 14a-d). De manera más interesante, la combinación de NP339 y cisteamina también mostró una mayor actividad contra las células persistentes de *P. aeruginosa* DSM1128 y de *P. aeruginosa* BAA-47 (Figura 15a-b).

REIVINDICACIONES

5 1. Un producto que comprende al menos dos agentes antibiopelícula en el que al menos uno de los agentes antibiopelícula es un péptido antimicrobiano y el al menos otro agente antibiopelícula es cisteamina en el que el péptido antimicrobiano comprende aminoácidos de acuerdo con la fórmula I:



10 en la que 1 y m son números enteros de 1 a 10, por ejemplo 1 a 5; n es un número entero de 1 a 10; X y Y, que pueden ser iguales o diferentes, son independientemente un aminoácido hidrófobo o catiónico.

2. Un producto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido antimicrobiano es un péptido antibacteriano.

15 3. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido antimicrobiano comprende entre 2 y 200 aminoácidos.

4. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X y/o Y son aminoácidos catiónicos.

20 5. Un producto de acuerdo con la reivindicación 4, en el que X y/o Y se seleccionan del grupo que consiste en histidina, arginina y lisina.

6. Un producto de acuerdo con la reivindicación 5, en el que X y/o Y se seleccionan de arginina y lisina.

25 7. Un producto como el reivindicado en cualquier reivindicación precedente que comprende una cantidad sinérgicamente eficaz de (i) un primer agente antibiopelícula que es un péptido antibacteriano, y (ii) un segundo agente antibiopelícula que es un agente mucolítico, que es cisteamina.

30 8. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como desinfectante o biocida.

9. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para uso como un medicamento.

10. Un sustrato al que se aplica o se une un producto como se reivindica en cualquier reivindicación precedente.

35 11. Una composición farmacéutica que comprende un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y uno o más diluyentes, excipientes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 12. Un producto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento de una infección o enfermedad o afección microbiana asociada con él.

45 13. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la infección, o enfermedad o afección asociada con el mismo, se selecciona del grupo que consiste en infecciones de piel y heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urogenital, infecciones de tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares, endocarditis, infecciones en fibrosis quística e infecciones de dispositivos médicos permanentes.

14. Cisteamina para uso en el tratamiento de una infección bacteriana.

Figura 1

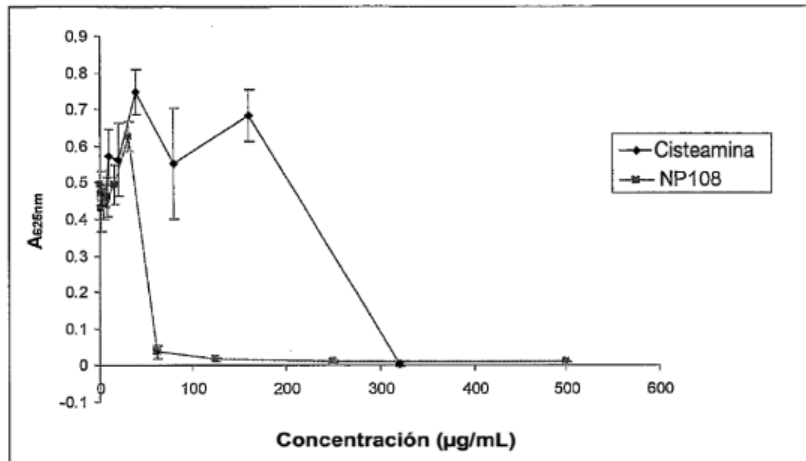


Figura 2

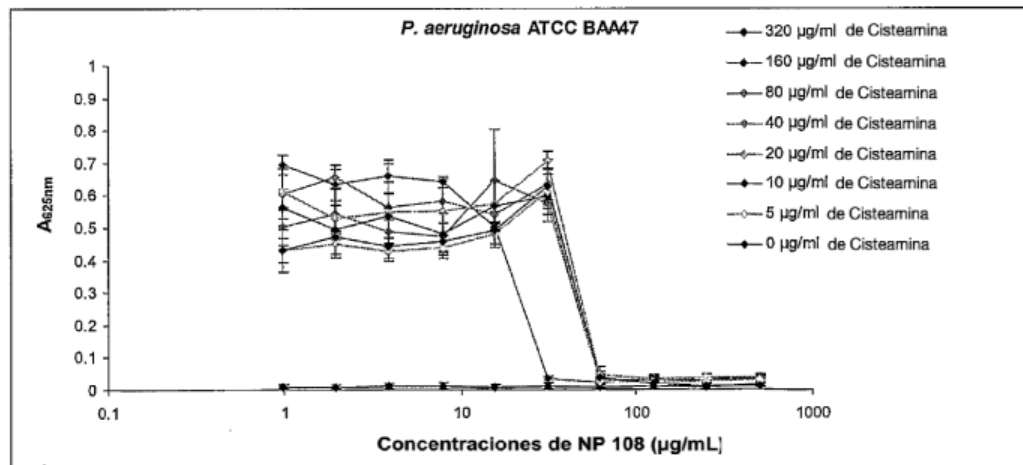


Figura 3

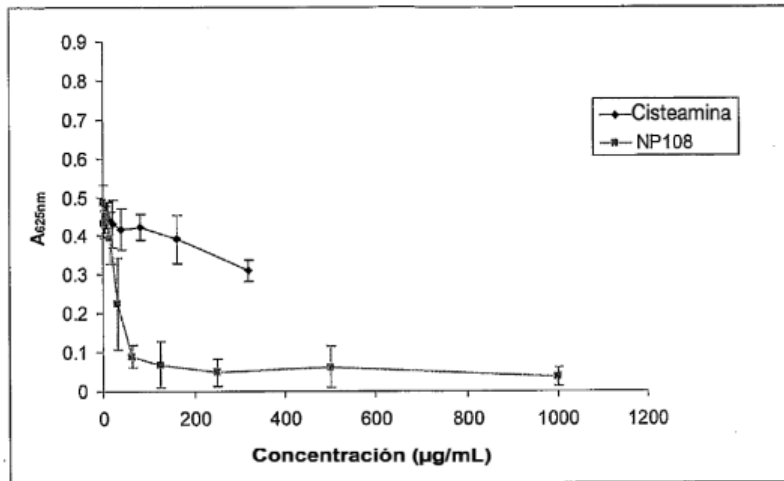


Figura 4

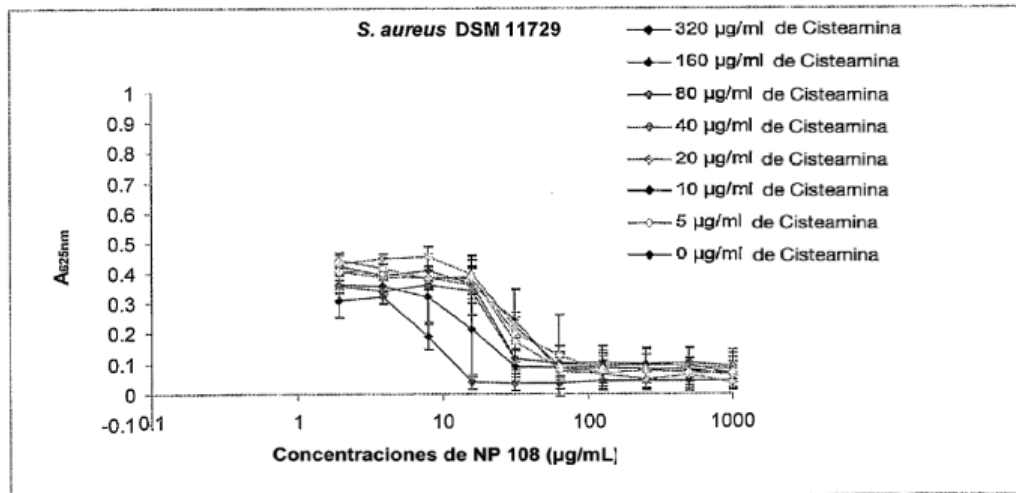


Figura 5

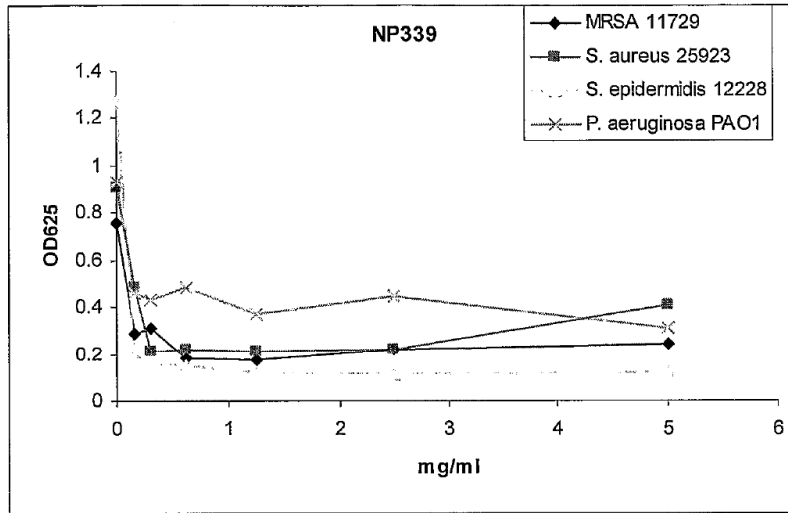


Figura 6

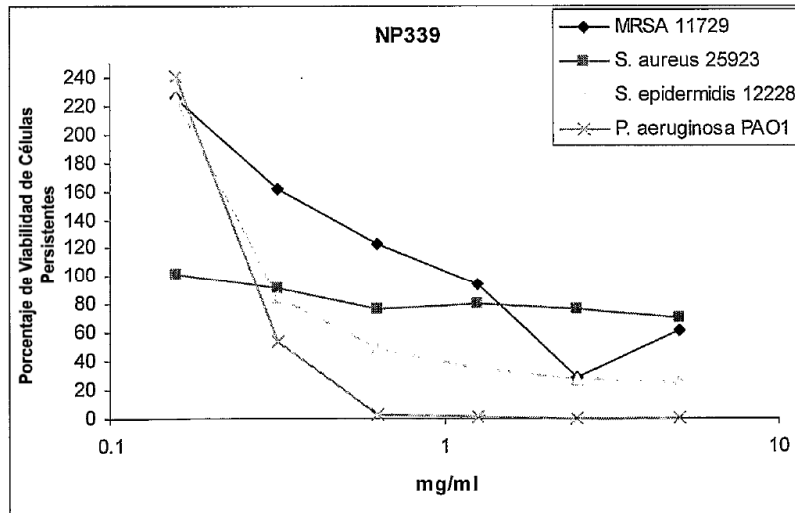


Figura 7

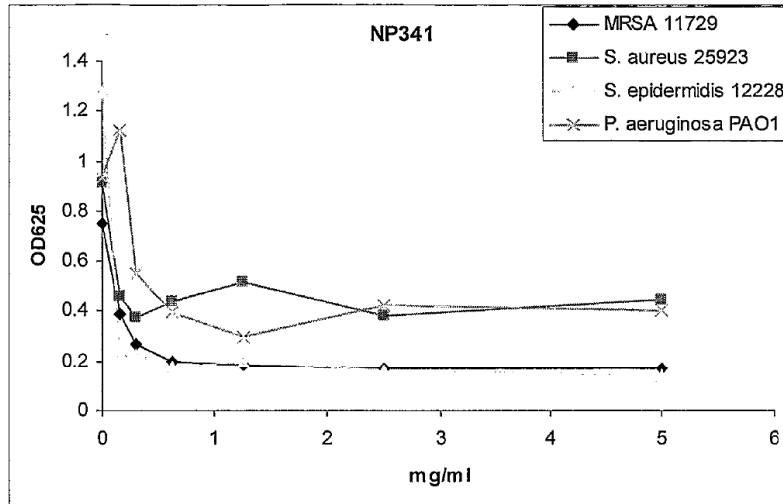


Figura 8

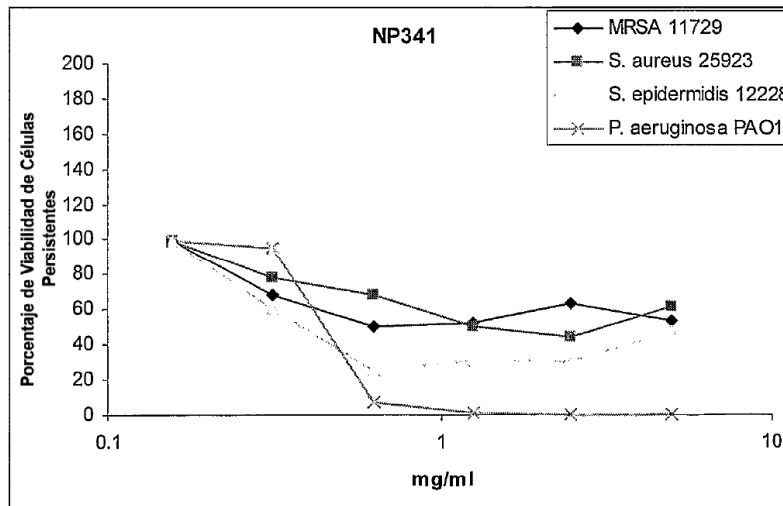


Figura 9

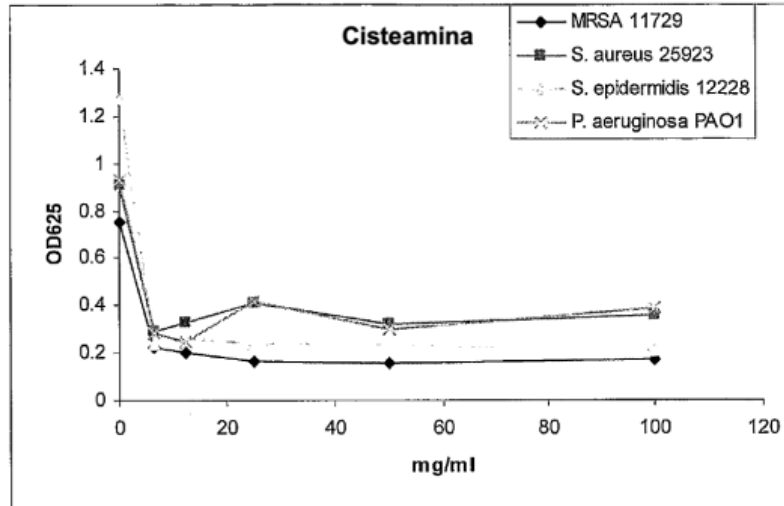


Figura 10

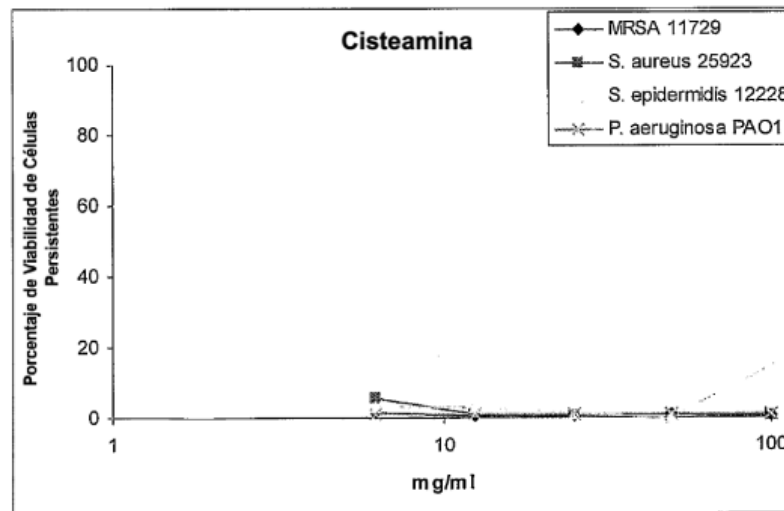


Figura 11

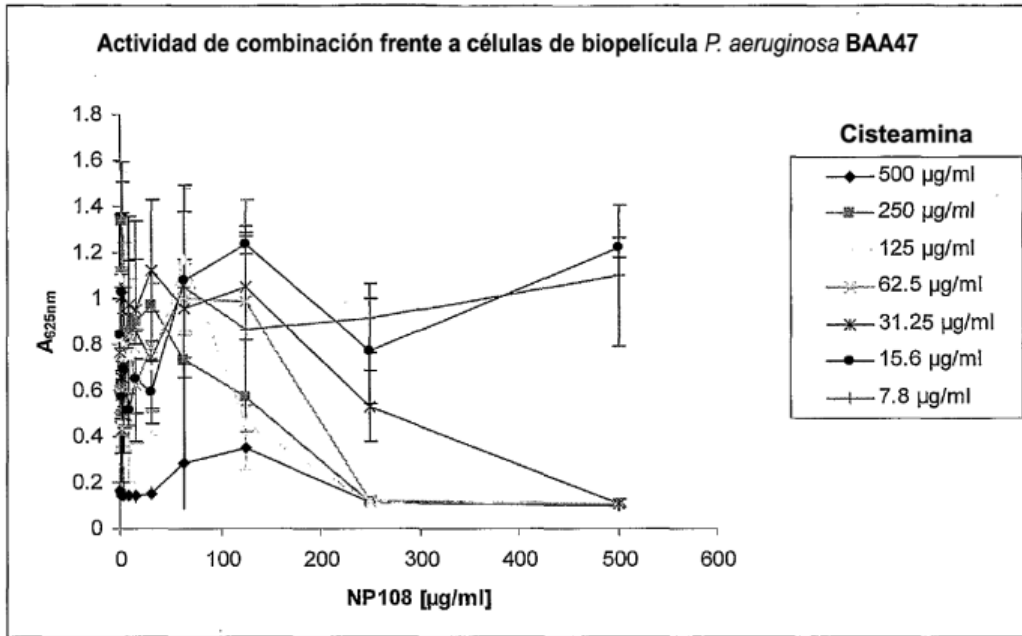


Figura 12

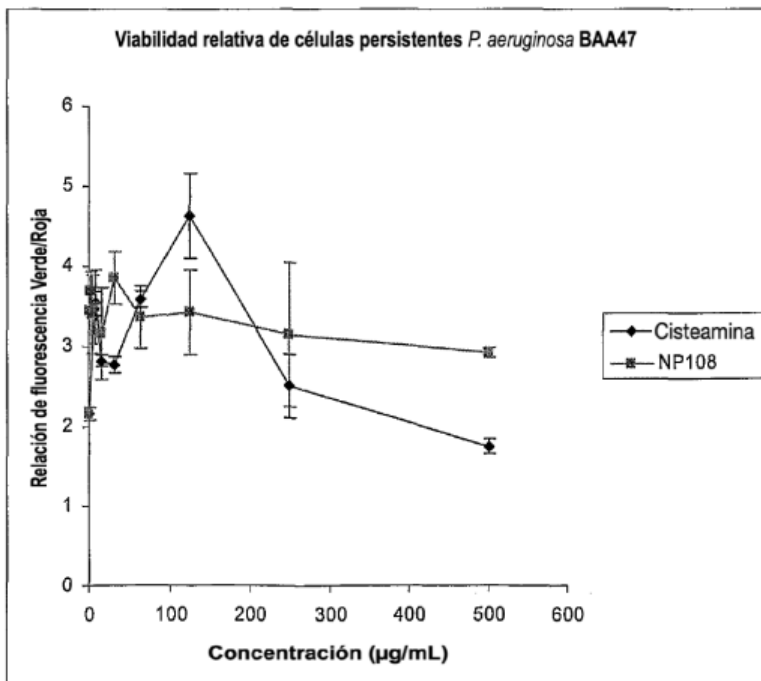


Figura 13

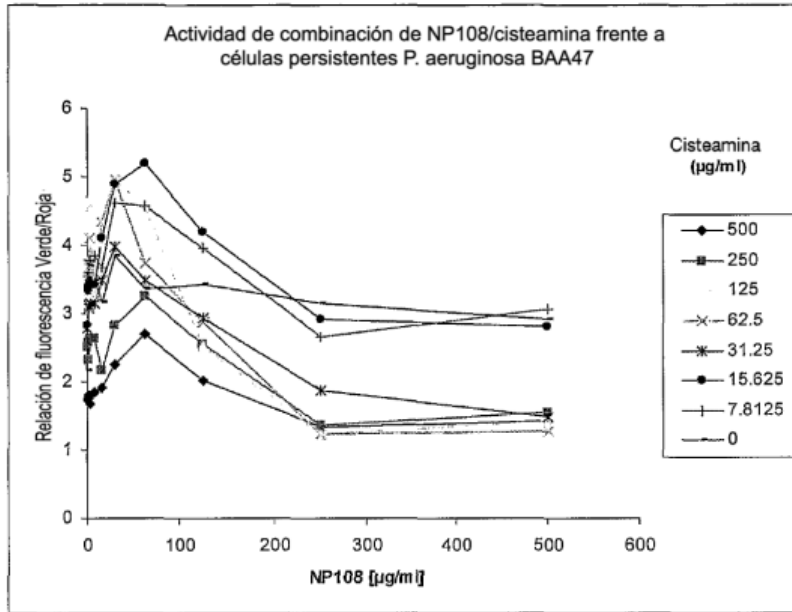
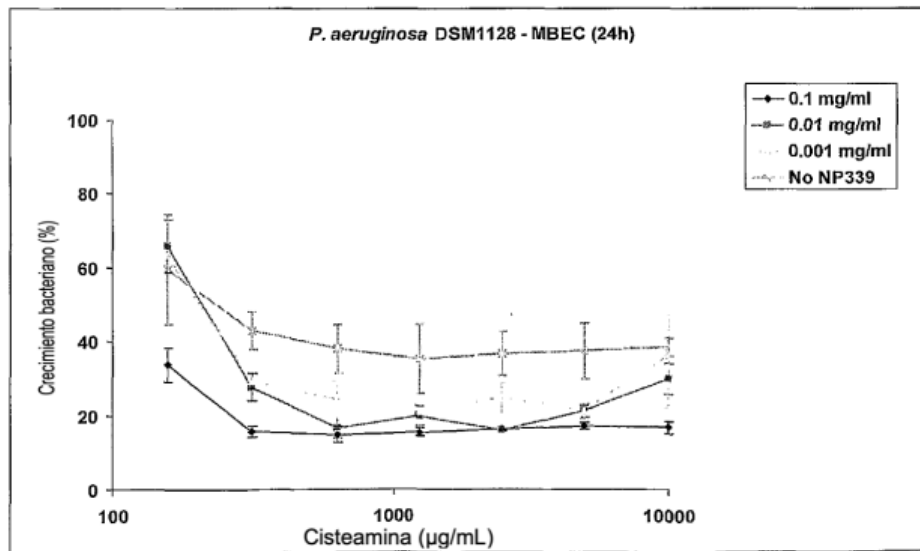
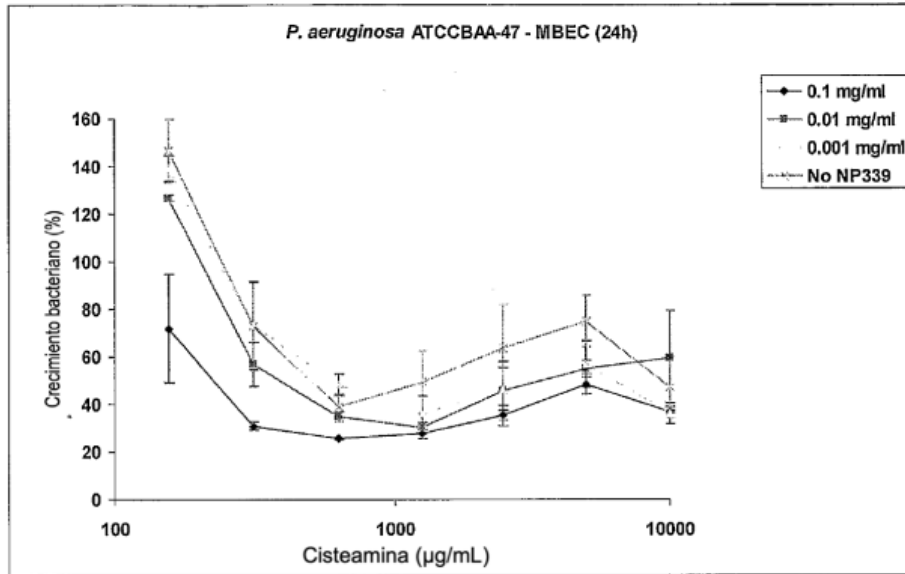


Figura 14

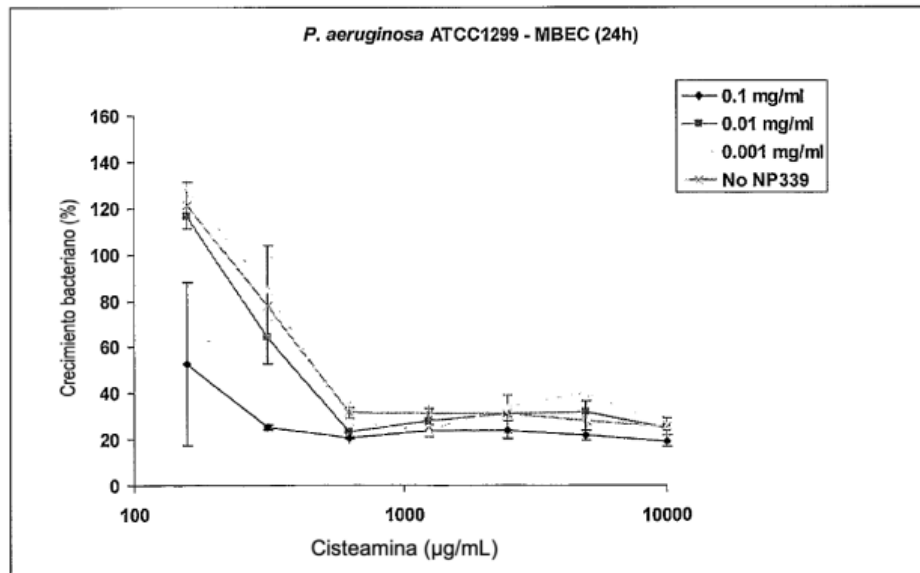
(a)



(b)



(c)



(d)

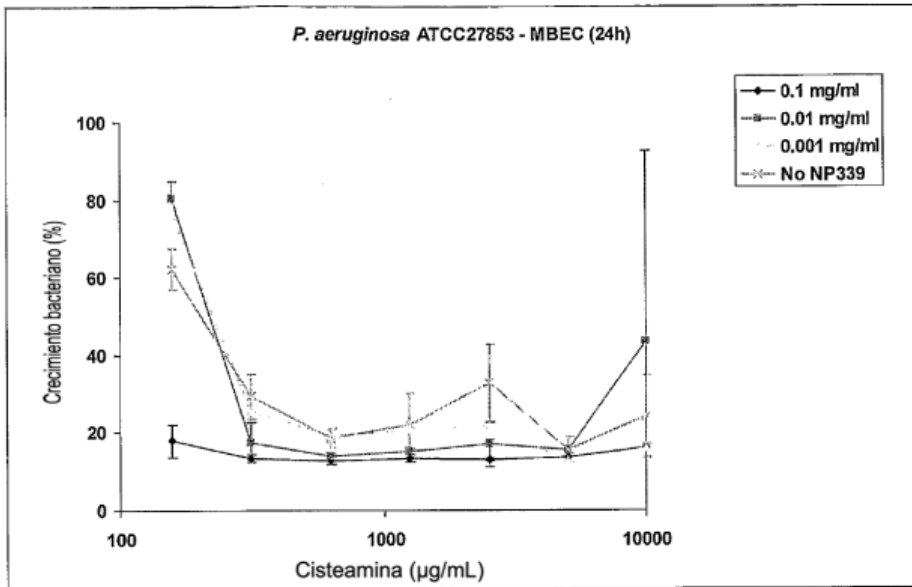
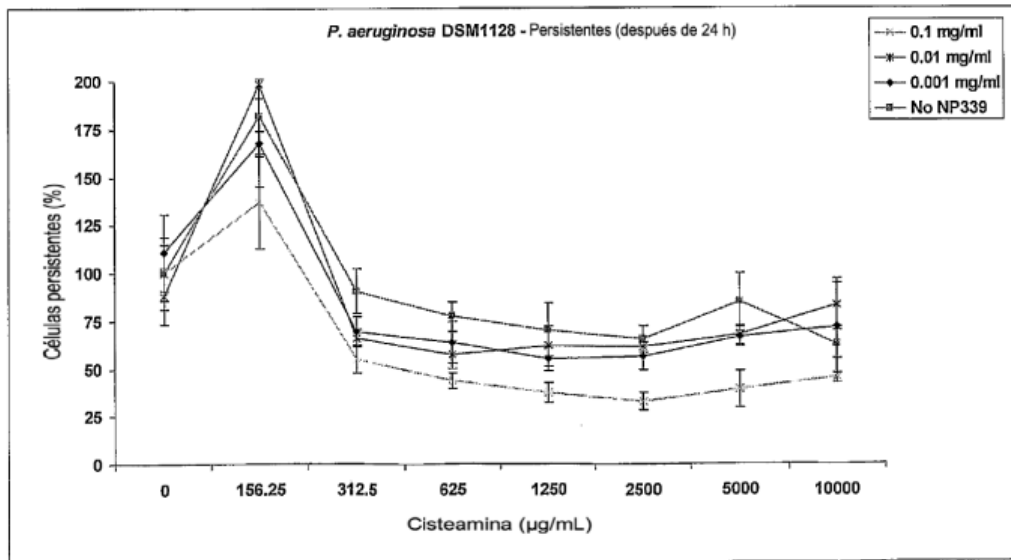


Figura 15

(a)



(b)

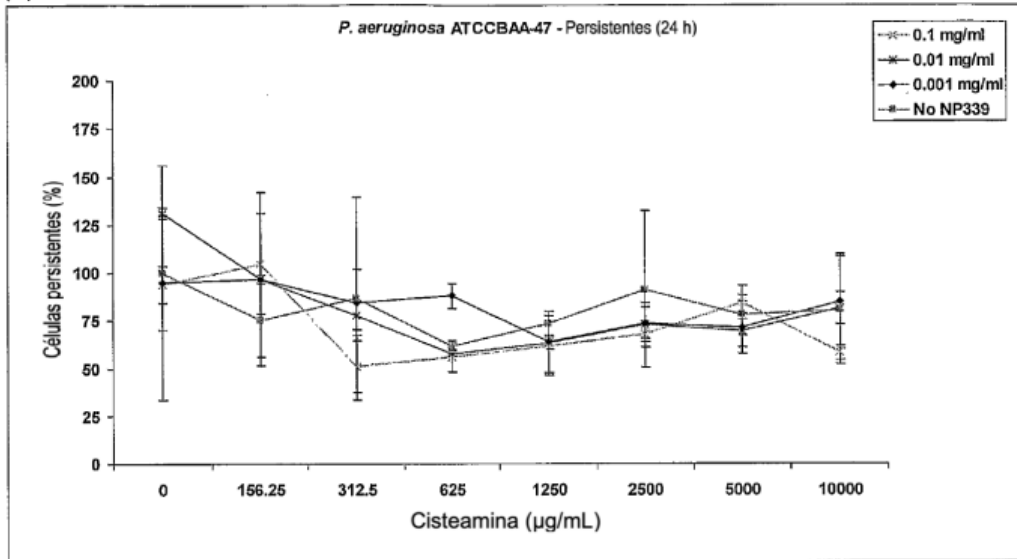


Figura 16

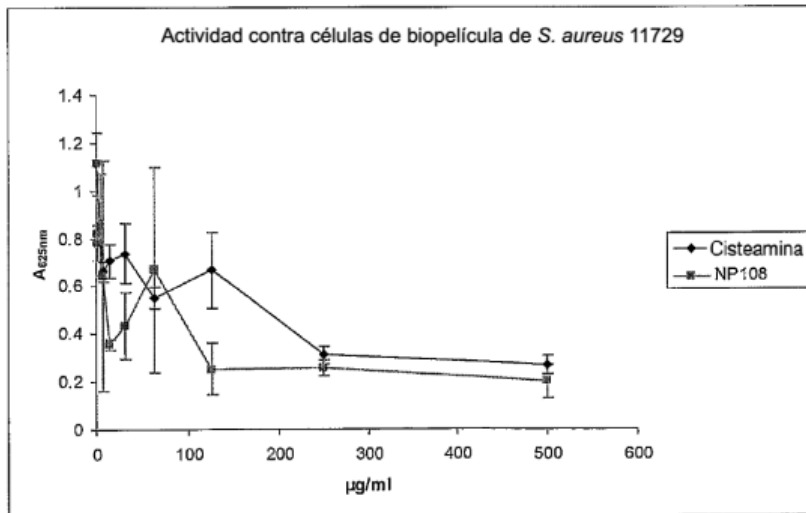


Figura 17

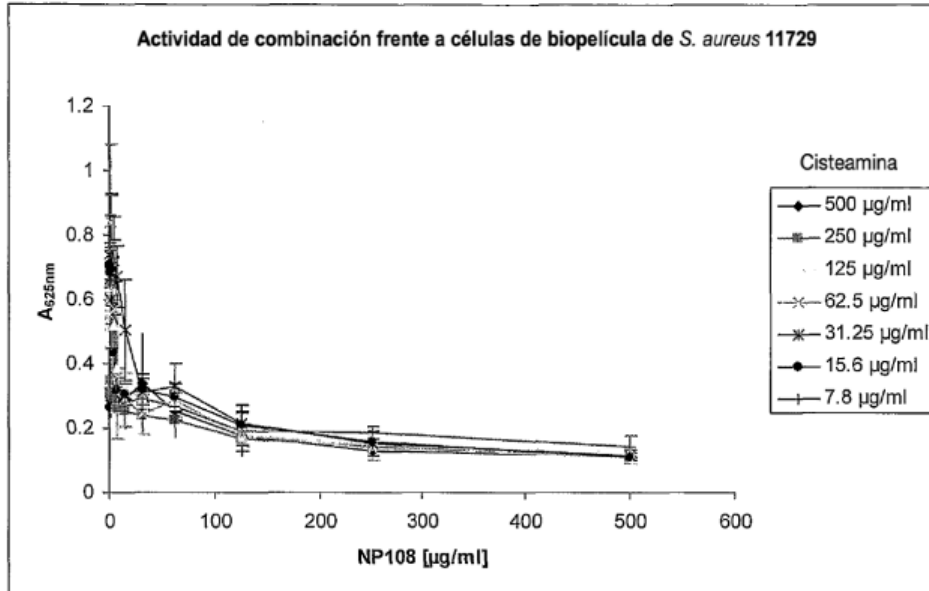


Figura 18

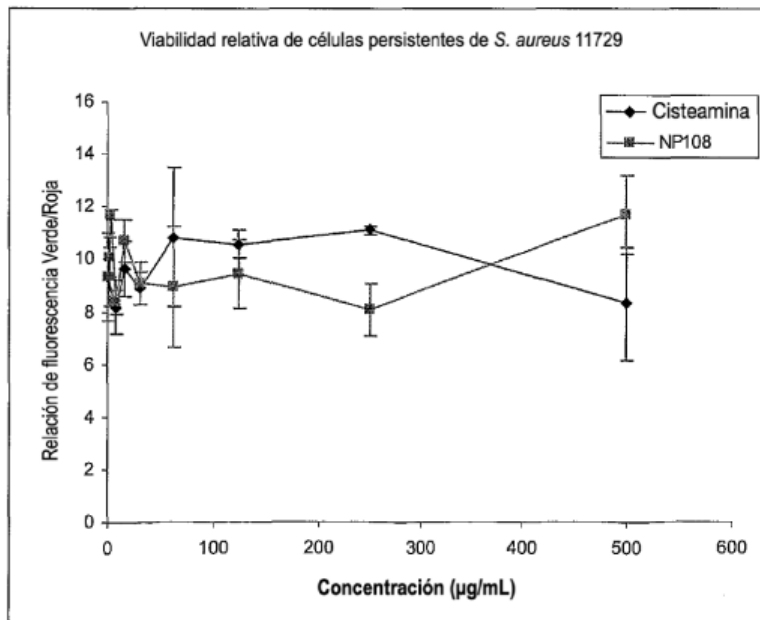


Figura 19

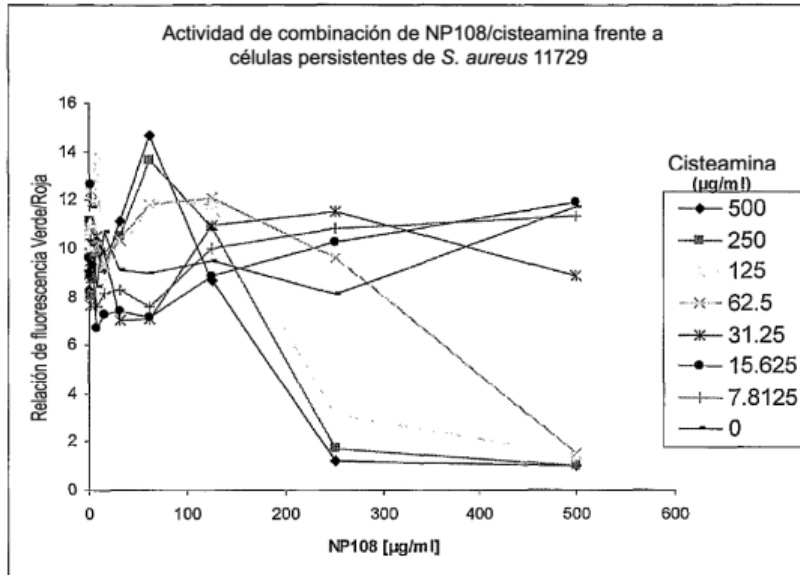
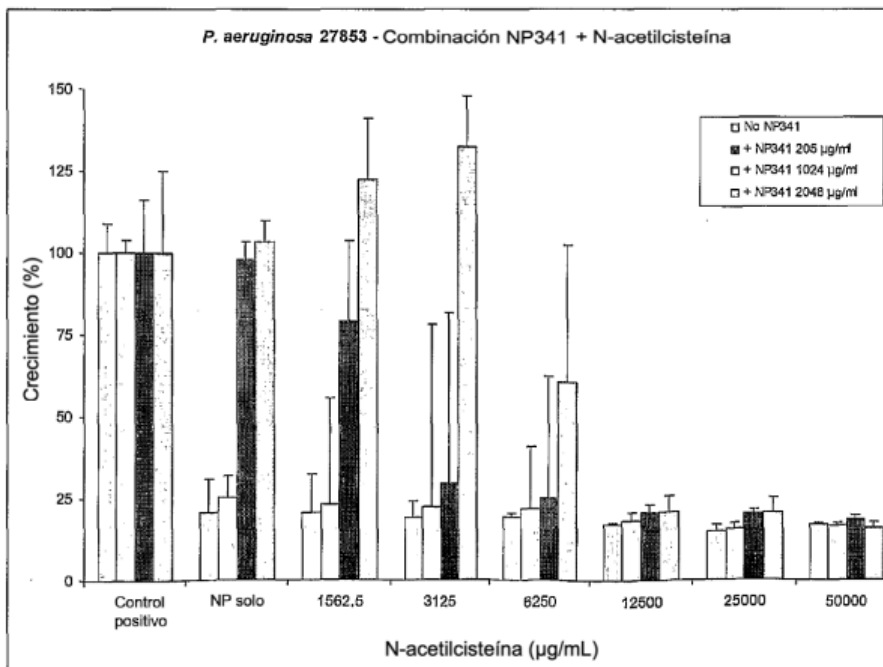


Figura 20

(a)



(b)

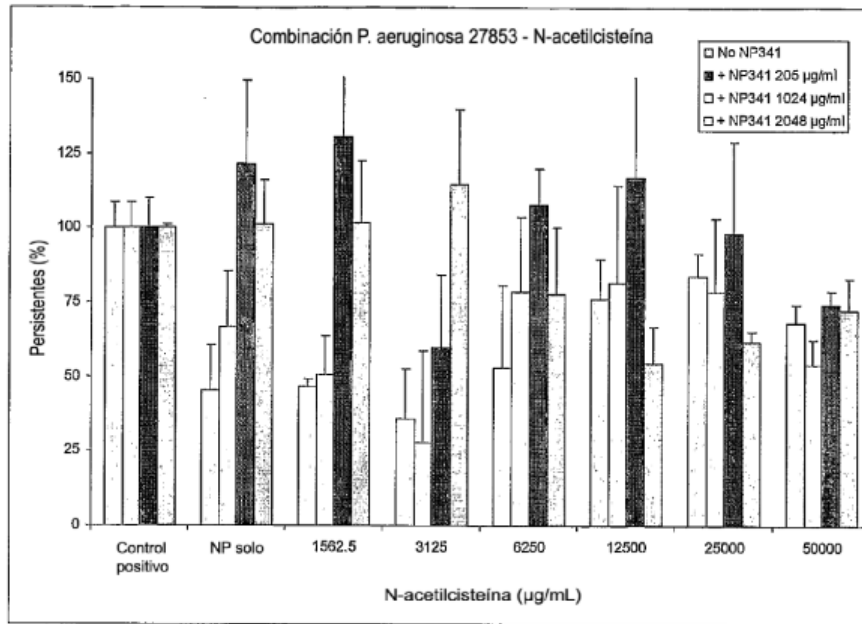
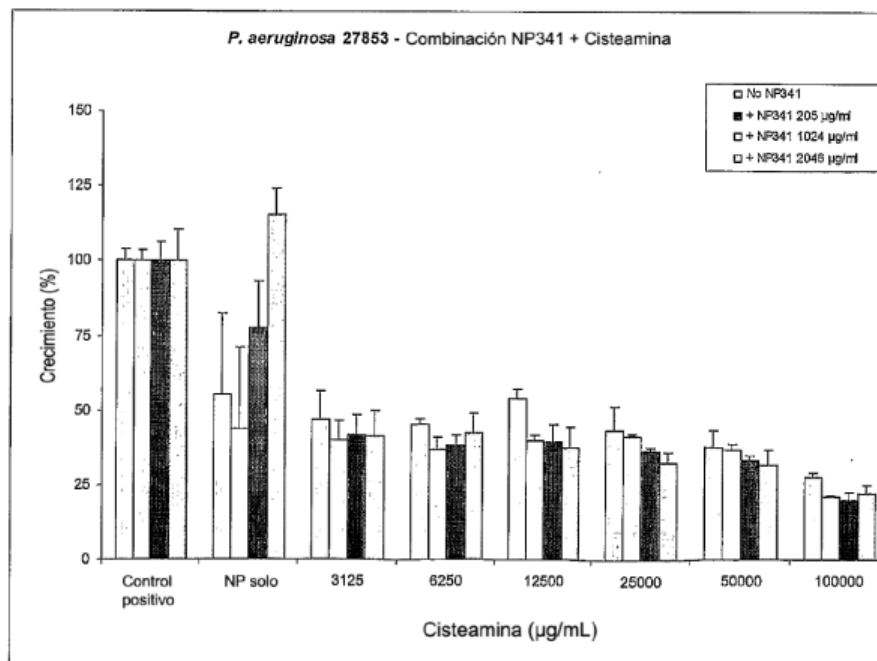
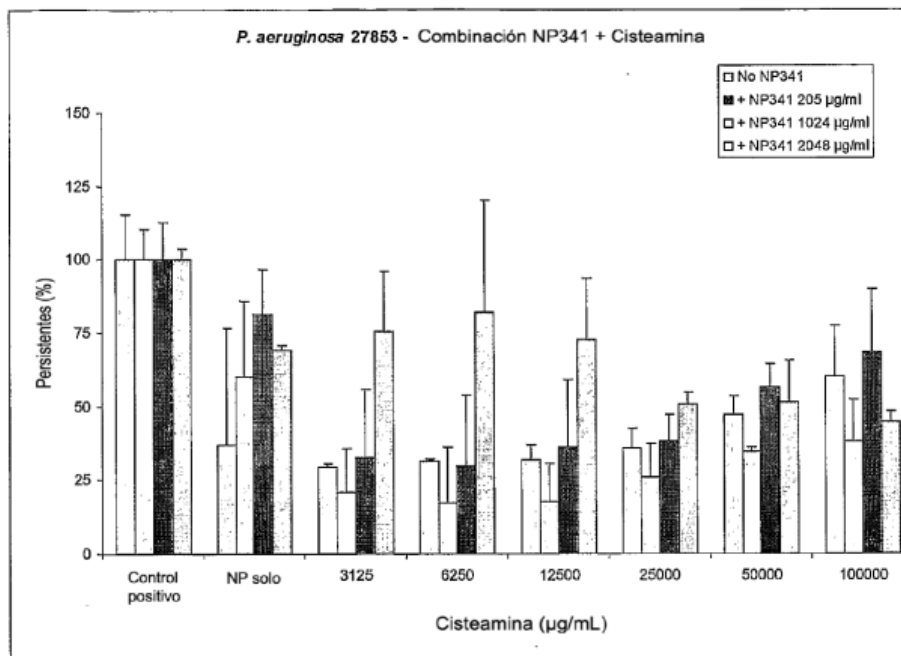


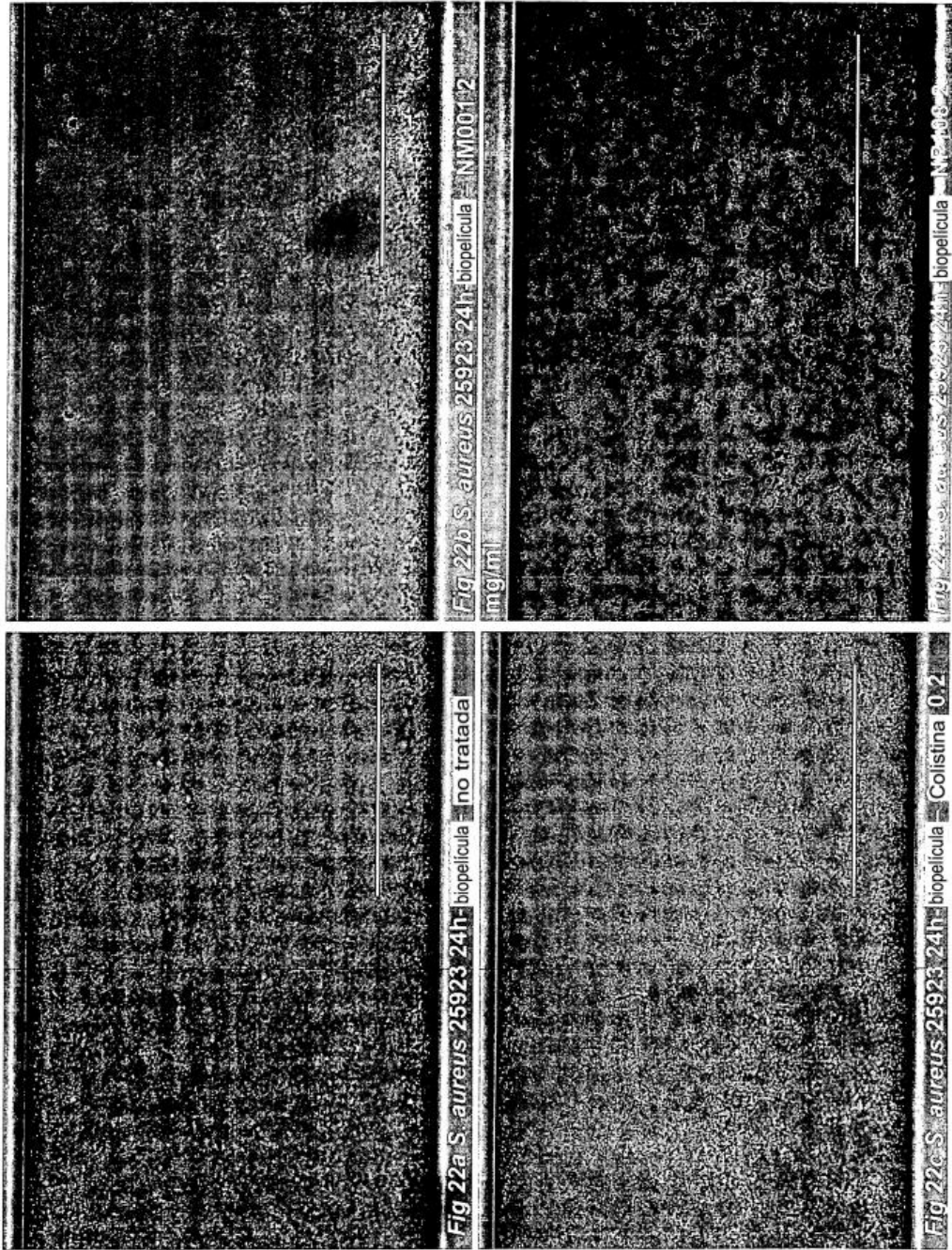
Figura 21

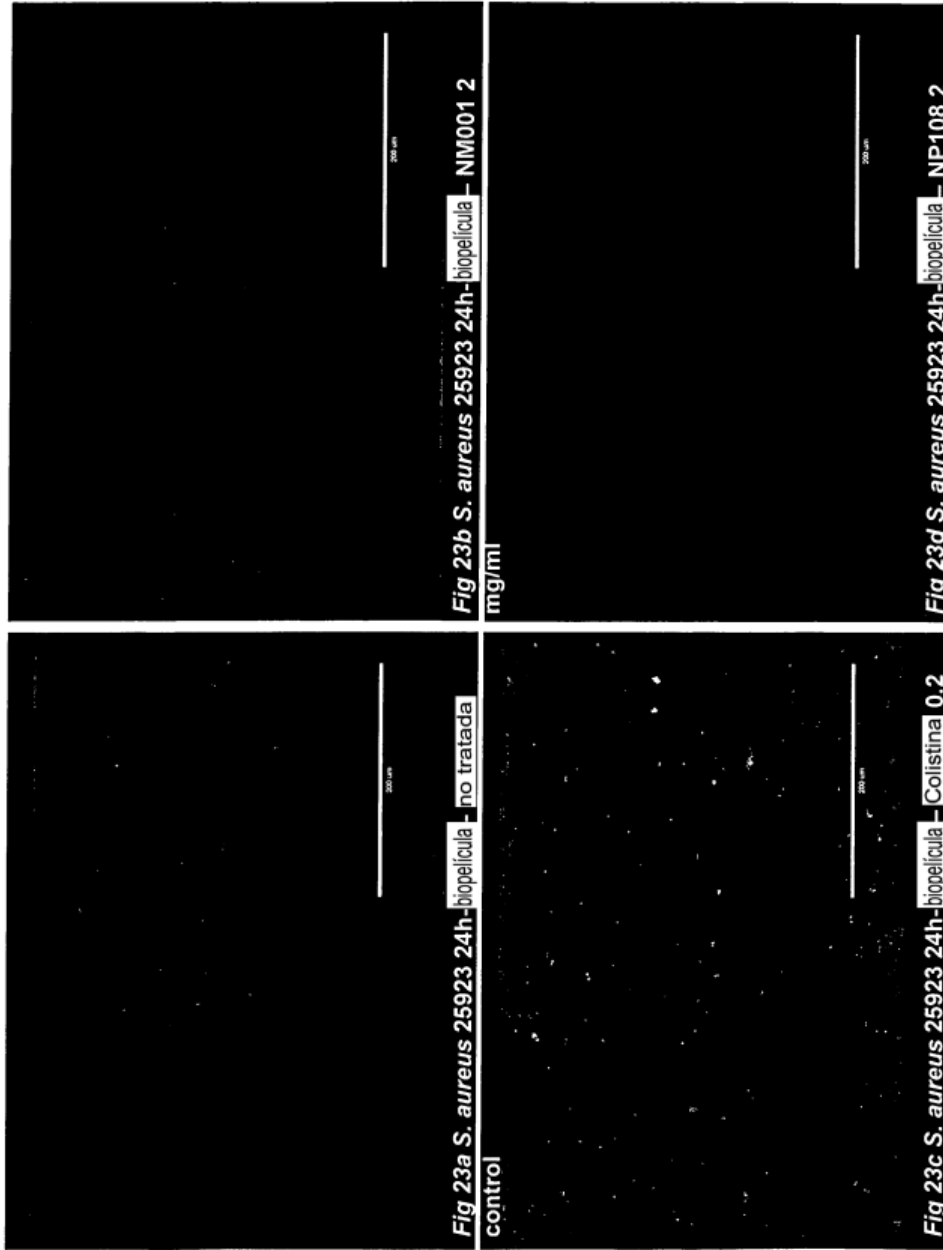
(a)

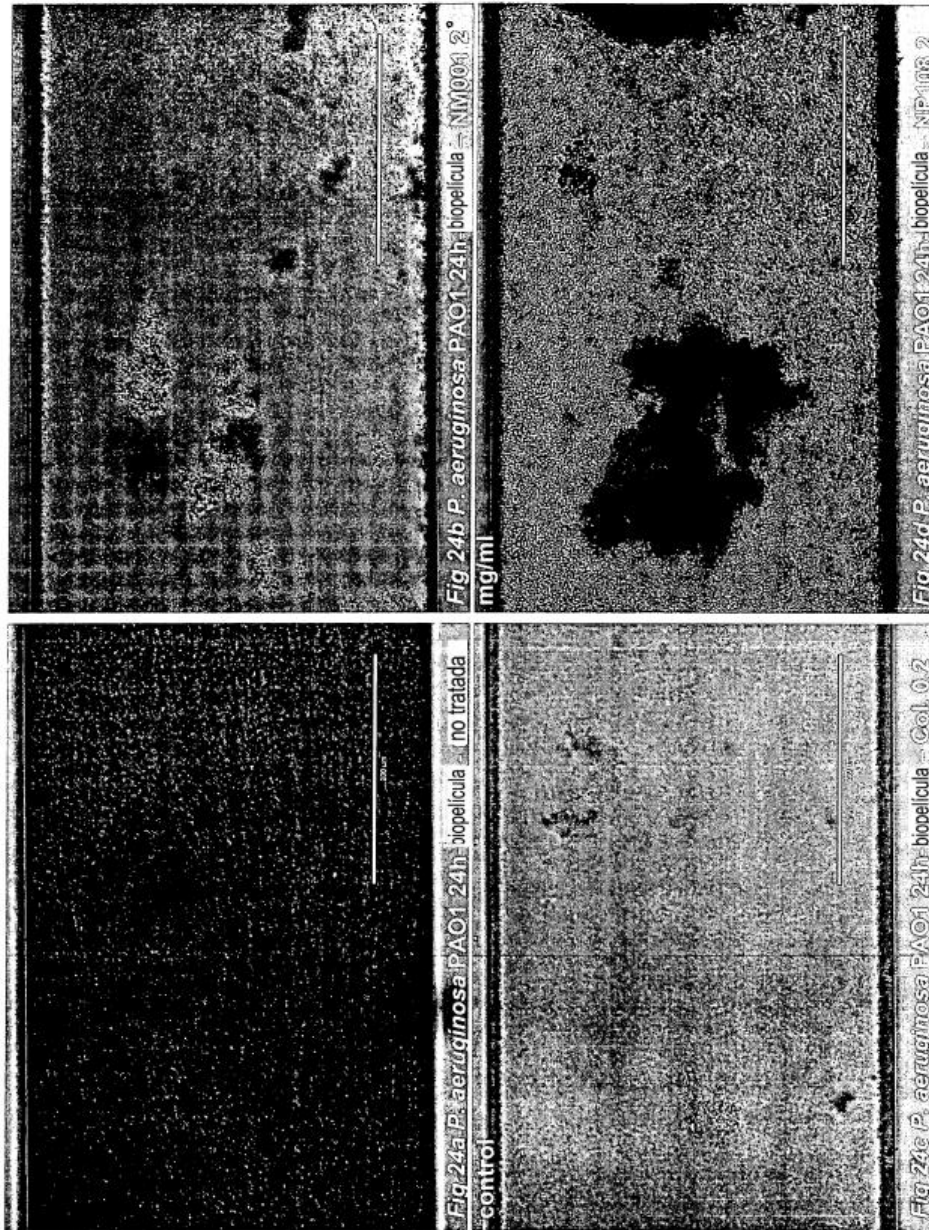


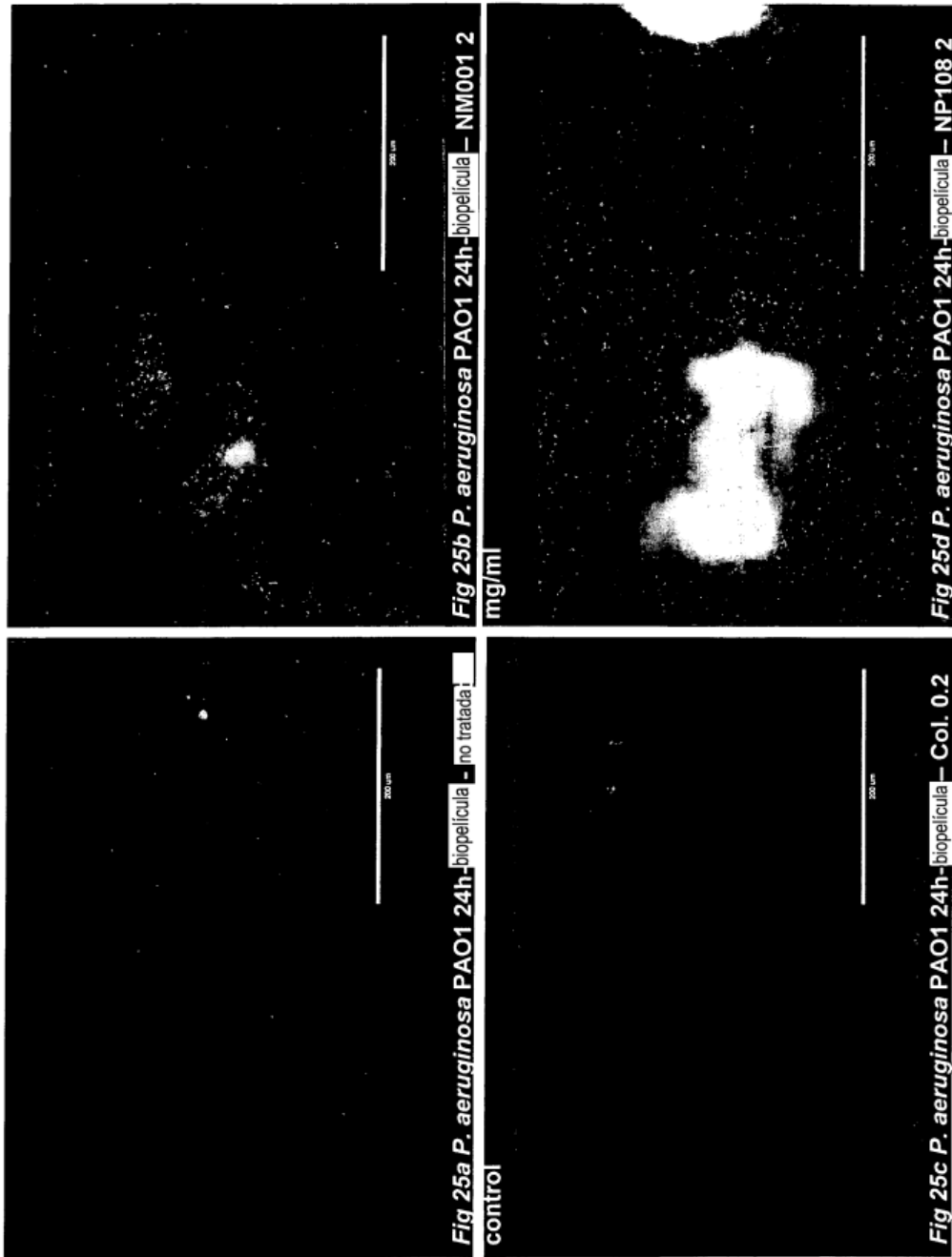
(b)











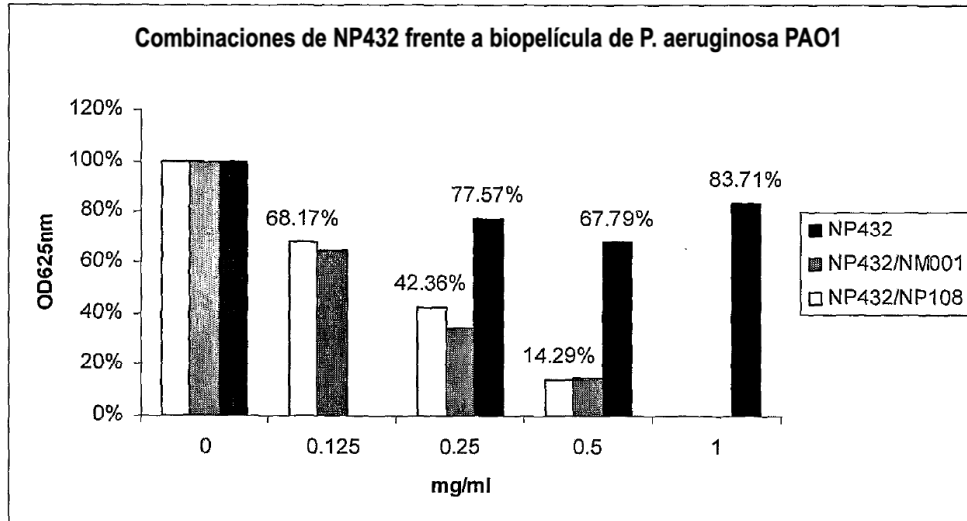


Figura 26

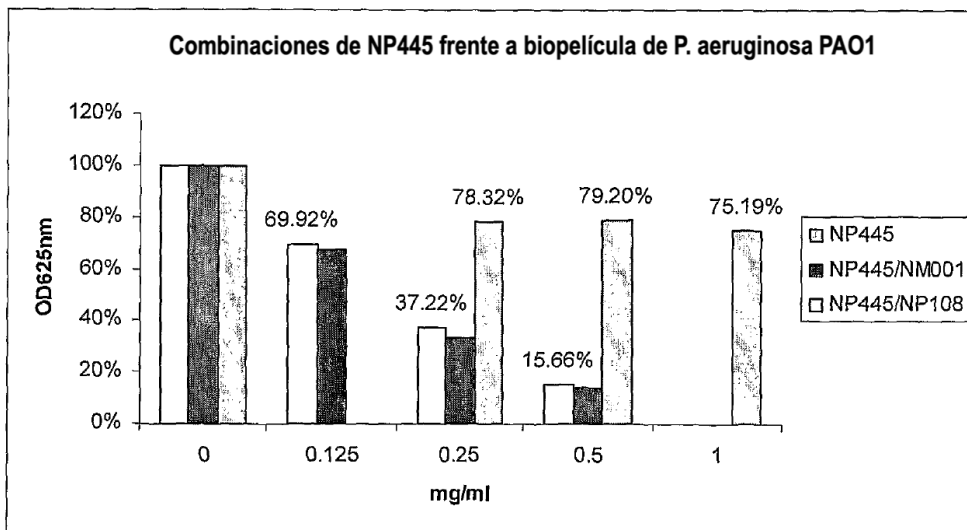


Figura 27

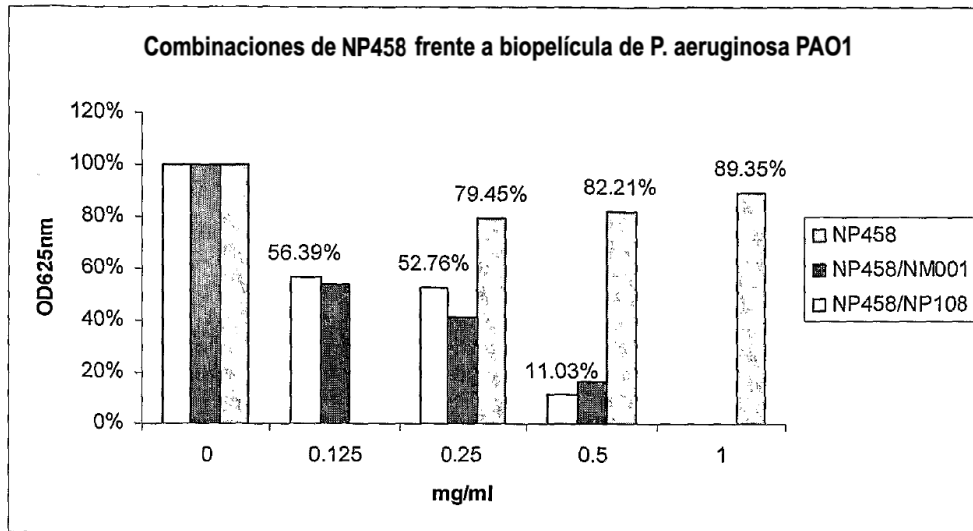


Figura 28

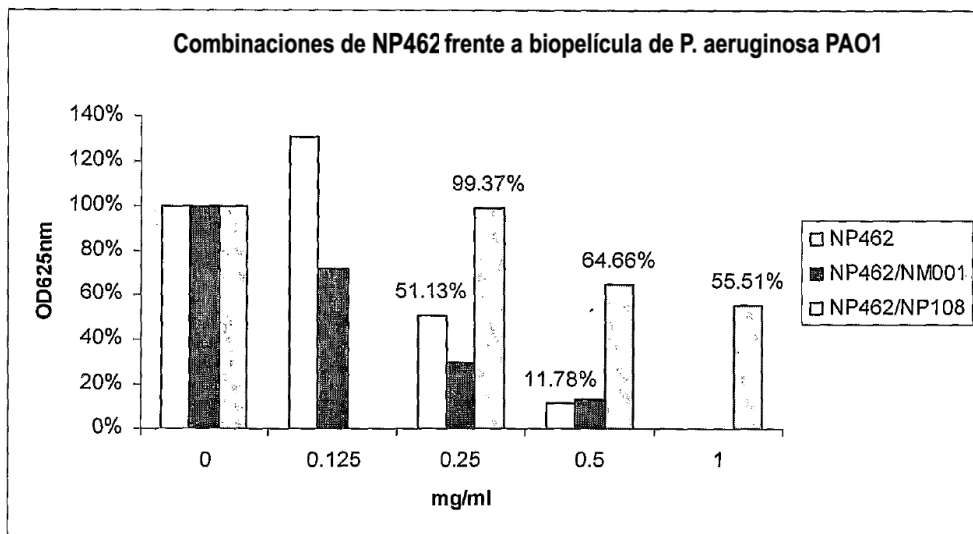


Figura 29

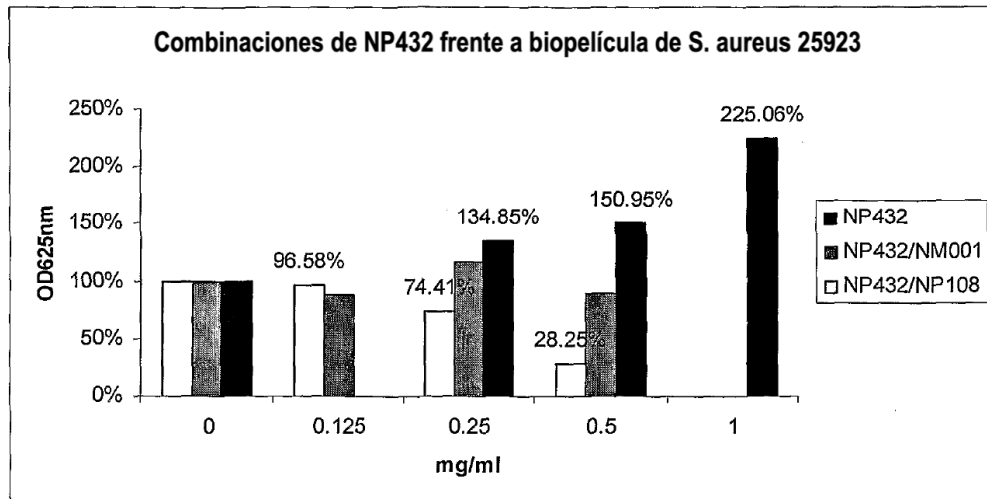


Figura 30

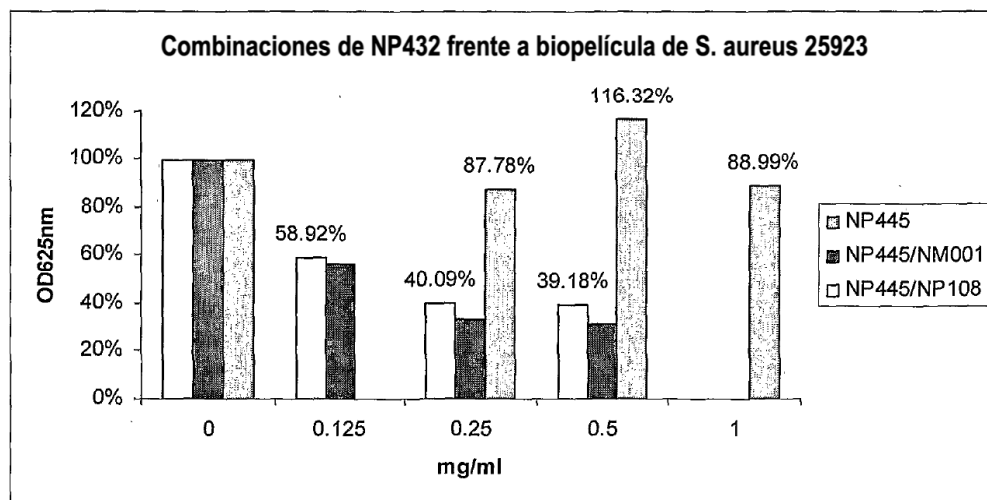


Figura 31

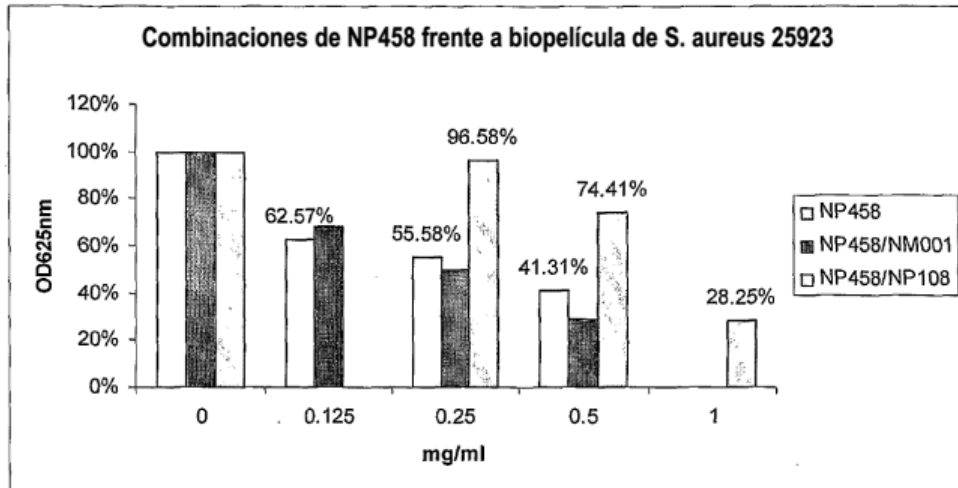


Figura 32

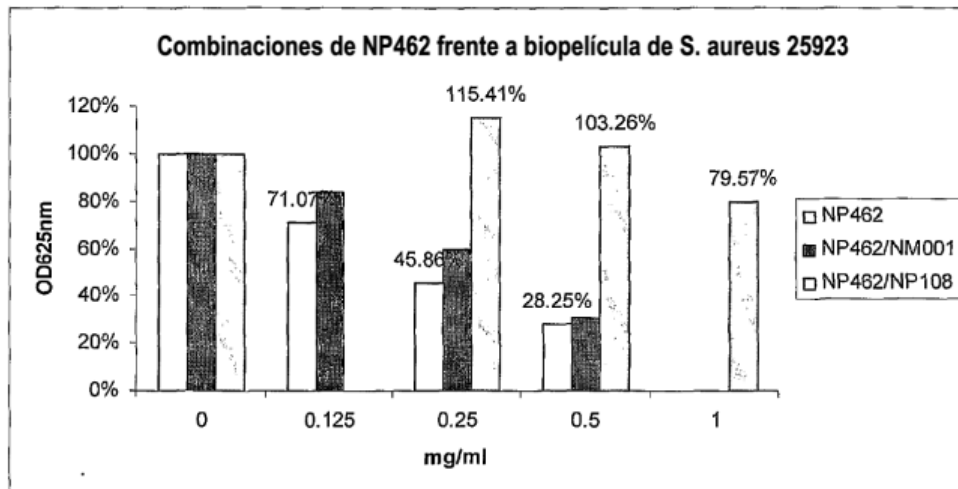


Figura 33