

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 557**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/435** (2006.01)  
**A61K 31/4525** (2006.01)  
**A61K 31/496** (2006.01)  
**A61K 31/7072** (2006.01)  
**A61K 38/12** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 31/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2015 PCT/GB2015/050209**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114340**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2015 E 15704827 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3099298**

54 Título: **Tratamientos combinados de zidovudina para tratar infecciones microbianas**

30 Prioridad:

**30.01.2014 GB 201401617**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.07.2019**

73 Titular/es:

**HELPERBY THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)  
66 Lincoln's Inn Fields  
London WC2A 3LH, GB**

72 Inventor/es:

**COATES, ANTHONY y  
HU, YANMIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 719 557 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

Tratamientos combinados de zidovudina para tratar infecciones microbianas

5 La presente invención se refiere al uso de un agente antirretrovírico para destruir los microorganismos clínicamente latentes asociados con infecciones microbianas en combinación con un agente antimicrobiano.

10 Antes de la introducción de los antibióticos, los pacientes que padecían infecciones microbianas agudas (por ejemplo, tuberculosos o neumonía) tenían una baja probabilidad de supervivencia. Por ejemplo, la mortalidad producida por la tuberculosis era de aproximadamente el 50 %. Aunque la introducción de agentes antimicrobianos en los años 40 y 50 del siglo XX cambió rápidamente este escenario, las bacterias han respondido obteniendo progresivamente resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados. Ahora, todos los países del planeta tienen bacterias resistentes a antibióticos. De hecho, más del 70 % de las bacterias que producen infecciones adquiridas en hospitales estadounidenses resisten a uno de los principales agentes antimicrobianos que se usan normalmente para combatir la infección (Nature Reviews, Drug Discovery, 1, 895-910 (2002)).

20 Una manera de abordar el problema creciente de las bacterias resistentes es el desarrollo de nuevas clases de agentes antimicrobianos. Sin embargo, hasta la introducción del linezolid en 2000, no se había comercializado ninguna nueva clase de antibiótico durante 37 años. Por otra parte, incluso el desarrollo de nuevas clases de antibióticos proporciona solo una solución temporal y de hecho, existen ya informes de resistencia de determinadas bacterias a linezolid (Lancet, 357, 1179 (2001) y Lancet, 358, 207-208 (2001)).

25 A fin de desarrollar soluciones a más largo plazo al problema de resistencia bacteriana, resulta claro que se requieren estrategias alternativas. Una de dichas estrategias alternativas es minimizar, tanto como sea posible, las oportunidades que se proporcionan a las bacterias para desarrollar resistencia a importantes antibióticos. Por tanto, las estrategias que se pueden adoptar incluyen limitar el uso de antibióticos para el tratamiento de las infecciones no agudas, así como controlar qué antibióticos se proporcionan a los animales para estimular el crecimiento.

30 Sin embargo, a fin de abordar el problema más eficazmente, es necesario comprender los mecanismos reales por los cuales las bacterias generan resistencia a los agentes antibióticos. Pero hacer esto requiere primero una consideración de cómo los agentes antibióticos actuales trabajan para destruir las bacterias.

35 Los agentes antimicrobianos se dirigen a componentes esenciales del metabolismo bacteriano. Por ejemplo, las  $\beta$ -lactamas (por ejemplo, penicilinas y cefalosporinas) inhiben la síntesis de la pared celular, mientras que otros agentes inhiben una gama diversa de dianas, tales como la ADN girasa (quinolonas) y la síntesis de proteínas (por ejemplo, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas y oxazolidinonas). El espectro de organismos contra los cuales son eficaces los agentes antimicrobianos varía, dependiendo de cuales organismos dependen en gran medida de la(s) etapa(s) metabólica(s) que está(n) inhibida(s). Además, el efecto tras las bacterias puede variar desde una mera inhibición del crecimiento (es decir, un efecto bacteriostático) como se observa con agentes tales como las tetraciclinas) a la destrucción completa (es decir, un efecto bactericida, como se observa, por ejemplo, con la penicilina).

45 Las bacterias llevan proliferando en la Tierra más de 3 mil millones de años y, en este tiempo, han tenido que responder a un vasto número de estreses ambientales. Quizá por tanto no sea sorprendente que las bacterias hayan desarrollado una variedad aparentemente inagotable de mecanismos por los cuales pueden responder a los estreses metabólicos impuestos sobre ellas por los agentes antibióticos. De hecho, los mecanismos por los cuales las bacterias pueden generar resistencia incluyen estrategias tan diversas como la inactivación del fármaco, modificación del sitio de acción, modificación de la permeabilidad de la pared celular, producción en exceso de las enzimas diana y derivación de las etapas inhibidas. No obstante, se ha observado que la tasa de resistencia que surge de un agente concreto varía ampliamente, dependiendo de factores tales como el mecanismo de acción del agente, de si el modo de destruir del agente depende del o de la concentración, la potencia contra la población de bacterias y la magnitud y duración de la concentración disponible en suero.

50 Se ha propuesto (Science, 264, 388-393 (1994)) que los agentes que se dirigen a enzimas únicas (por ejemplo, rifampicina) son los más propensos al desarrollo de resistencia. Además, cuánto más tiempo estén en contacto las bacterias con niveles subóptimos del agente microbiano, es más probable que surja la resistencia.

55 Por otra parte, se sabe que muchas infecciones microbianas incluyen subpoblaciones que son *fenotípicamente* resistentes a agentes antimicrobianos (J. Antimicrob. Chemother., 4, 395-404 (1988); J. Med. Microbiol., 38, 197-202 (1993); J. Bacteriol., 182, 1794-1801 (2000); *ibid.* 182, 6358-6365 (2000); *ibid.* 183, 6746-6751 (2001); FEMS Microbiol. Lett., 202, 59-65 (2001); y Trends in Microbiology, 13, 34-40 (2005)). Parece haber varios tipos de dichas bacterias fenotípicamente resistentes, incluyendo bacterias persistentes, bacterias en fase estacionaria, así como aquellas en las profundidades de biopelículas. Sin embargo, cada uno de estos tipos se caracteriza por su bajo índice de crecimiento en comparación con las bacterias en fase logarítmica en las mismas condiciones. La privación nutricional y las altas densidades de células son también características comunes de dichas bacterias.

65

Aunque resistentes a los agentes antimicrobianos en su estado de crecimiento lento, las bacterias fenotípicamente resistentes difieren de las que son *genotípicamente* resistentes en que recuperan su susceptibilidad a los antimicrobianos cuando vuelven a un estado de crecimiento rápido (por ejemplo, cuando los nutrientes vuelven a estar fácilmente disponibles para ellas).

5 La presencia de bacterias fenotípicamente resistentes en una infección conduce a la necesidad de ciclos prolongados de agentes antimicrobianos, que comprenden dosis múltiples. Esto se debe a que las bacterias resistentes que se multiplican lentamente proporcionan un combinado de organismos "latentes" que pueden pasar a un estado de crecimiento rápido cuando las condiciones lo permiten (reiniciando eficazmente por tanto la infección). Las dosis múltiples a lo largo del tiempo tratan este problema destruyendo gradualmente a las bacterias "latentes" que pasan a la forma "activa".

15 Sin embargo, tratar las bacterias "latentes" administrando ciclos prolongados de agentes antimicrobianos tiene sus propios problemas. Es decir, la exposición prolongada de las bacterias a concentraciones subóptimas del agente antimicrobiano puede conducir al surgimiento de bacterias genotípicamente resistentes, que pueden entonces multiplicarse rápidamente en presencia incluso de altas concentraciones del agente antimicrobiano.

20 Es más probable que ciclos largos de agentes antimicrobianos estimulen la aparición de resistencia genotípica que ciclos más cortos sobre la base de que las bacterias que no se multiplican tenderán a sobrevivir y, de forma interesante, tienen probablemente una capacidad mejorada de mutar a una forma resistente (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 11736-11740 (1995); J. Bacteriol., 179, 6688-6691 (1997); y Antimicrob. Agents Chemother., 44, 1771-1777 (2000)).

25 A la luz de lo anterior, puede seleccionarse una nueva estrategia para combatir el problema de la resistencia bacteriana para seleccionar y desarrollar agentes antimicrobianos sobre la base de su capacidad de destruir microorganismos "latentes". La producción de dichos agentes permitiría, entre otras cosas, el acortamiento de los regímenes quimioterapéuticos en el tratamiento de infecciones microbianas, reduciendo por tanto la frecuencia con la que la resistencia genotípica surge en los microorganismos.

30 Los siguientes artículos divulgan el uso de colistina, una polimixina, y rifampicina como tratamiento combinado para infecciones bacterianas tales como *Acinetobacter baumannii*, con resistencia multifármaco (MDR), (Motaouakkil S et al J Infect (2006) 53 274-278, Bassetti M et al J Antimicrob Chemo (2008) 61 417-420, Zhou A et al La AAPS J publicada en línea el 16 de octubre de 2013 DOI:10.1208/s12248-013-9537-8). Lee JJ et al (Antimicrob Agents & Chemo (2013) 57(8) 3738-3745) divulgan los resultados de usar una combinación de colistina y rifampicina en un modelo *in vitro* de MDR de *A. baumannii*. Se observó sinergia en las concentraciones propuestas durante algunos periodos de tiempo. Se propuso un mecanismo por el cual la colistina no solo autofomenta su propia entrada en las bacterias, sino que también aumenta la penetración de rifampicina.

40 Pantopoulou et al., International Journal of Antimicrobial Agents 29 (2007) 51-55 divulgan la administración simultánea de colistina y rifampicina y notifican la significancia de dicha combinación contra el *Acinetobacter baumannii* con resistencia multifármaco.

45 Informando de un ensayo clínico multicentro aleatorizado, Durante-Mangoni E et al Clin Infec Dis (2013) 57(3) 349-58 concluyen que, puesto que no existe reducción en la mortalidad a 30 días en el grupo de combinación, "*Estos resultados indican que, actualmente, la rifampicina no debe combinarse de forma rutinaria con colistina en la práctica clínica. El aumento en la tasa de erradicación de A baumannii con tratamiento combinado podría seguir implicando un beneficio clínico.*"

50 Tascini C et al (Antimicrob Agents & Chemo (2013) 57(8) 3990-3993) divulgan el uso de la misma combinación en *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemo. Sobre la base del efecto sinérgico favorable, se propuso que el uso de la combinación en la neumonía MDR-K por tener un papel clínico.

55 Recientemente, se ha notificado un fármaco antirretrovírico, zidovudina, que es activo como agente antimicrobiano cuando se combina con gentamicina. Por tanto, Doléans-Jordheim A. et al., divulgaron (Eur J Clin Microbiol Infect Dis. oct 2011;30(10):1249-56) que zidovudina (AZT) tenía un efecto bactericida sobre algunas enterobacterias, podría inducir además resistencia en *Escherichia coli*. Estas resistencias se asociaron con diversas modificaciones en el gen de la timidina quinasa. Además, se observó una actividad aditiva o sinérgica entre AZT y los dos antibióticos aminoglucósidos amikacina y gentamicina frente a las enterobacterias.

60 Por consiguiente, en una realización de la presente invención se proporciona una combinación que comprende zidovudina, una polimixina seleccionada entre colistina o polimixina B, un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina, y opcionalmente piperina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana.

65 En una realización adicional, la invención se refiere a un producto que comprende zidovudina en combinación con; una polimixina seleccionada entre colistina y polimixina B; un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina; y opcionalmente piperina; y las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables

de los mismos; como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en la destrucción de microorganismos clínicamente latentes asociados con una infección microbiana.

Una realización adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende zidovudina en combinación con; una polimixina seleccionada entre colistina y polimixina B; un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina; y opcionalmente piperina; y las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un transportador farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición es para su uso en el tratamiento de una infección microbiana, más preferentemente para su uso en la destrucción de microorganismos clínicamente latentes asociados con una infección microbiana.

En cada realización descrita, el antibiótico antituberculosis preferido es rifampicina.

La presente invención se refiere por tanto además a una composición que comprende zidovudina, colistina y rifampicina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una infección microbiana.

La presente invención incluye también por tanto;

El uso de zidovudina, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para el tratamiento de una infección microbiana en combinación con colistina y rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos,

El uso de colistina, o una sal y/o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para el tratamiento de una infección microbiana en combinación con zidovudina y rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

y,

El uso de rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, para el tratamiento de una infección microbiana en combinación con colistina y zidovudina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En cada realización de la presente invención, la adición de piperina es opcional. Sobre la base de los datos relativos a la piperina como inhibidor de la glucoproteína P humana y CYP3A4 descritos entre otros en J Pharmacol Exp Ther (2002) 302(2) 645-650, se cree que la actividad de la piperina es beneficiosa para las combinaciones definidas en el presente documento. Por tanto, en una realización preferida, piperina se incluye en las combinaciones de la presente invención.

La presente invención se basa también en el hallazgo inesperado de que la actividad de las combinaciones de una polimixina seleccionada entre colistina y polimixina B; y un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina, está sustancialmente mejorada cuando se administra con zidovudina. Por otra parte, las combinaciones han mostrado de forma sorprendente presentar actividad antimicrobiana sinérgica frente a microorganismos en fase logarítmica (es decir, multiplicación) y/o clínicamente latentes. La sorprendente actividad biológica de las combinaciones de la presente invención ofrece la oportunidad de acortar los regímenes quimioterapéuticos y puede dar como resultado una reducción en el surgimiento de la resistencia microbiana.

Como se describe a continuación, se ha demostrado que la combinación de la presente invención es particularmente eficaz contra las bacterias resistentes a fármacos, lo que abre el camino para que se administren dichas combinaciones a las cepas resistentes a fármacos y a dichas cepas antes de que se desarrolle resistencia a los fármacos, es decir, como primera línea de tratamiento.

Se ha demostrado en concreto que las combinaciones de la presente invención son eficaces contra las bacterias Gram negativas, específicamente las bacterias Gram negativas resistentes a fármacos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "*junto con*" cubre la administración separada y secuencial de los agentes. Cuando los agentes se administran secuencialmente, cualquier agente puede administrarse en primer lugar. Cuando la administración es simultánea, los agentes pueden administrarse tanto en la misma composición como en una composición farmacéutica diferente. La terapia auxiliar, es decir, cuando se usa un agente como un tratamiento primario y se usa el otro agente para ayudar a este tratamiento primario, es también una realización de la presente invención.

Las combinaciones de la presente invención son para su uso en el tratamiento de infecciones microbianas. En concreto, se pueden usar para destruir los microorganismos que se multiplican y/o clínicamente latentes asociados con infecciones microbianas. Las referencias hechas en el presente documento al tratamiento de una infección microbiana incluyen por tanto la destrucción de los microorganismos que se multiplican y/o clínicamente latentes asociadas con dichas infecciones. Preferentemente, las combinaciones en la presente invención se usan para destruir microorganismos clínicamente latentes asociados con las infecciones microbianas.

Como se usa en el presente documento, "*destruir*" significa una pérdida de viabilidad según se evalúa por la ausencia de actividad metabólica.

Como se usa en el presente documento, "*microorganismo clínicamente latente*" significa un microorganismo que está metabólicamente activo pero que tiene un índice de crecimiento que está por debajo del umbral de expresión de la enfermedad infecciosa. El umbral de expresión de la enfermedad infecciosa se refiere al umbral del índice de crecimiento por debajo del cual los síntomas de la enfermedad infecciosa en un hospedador están ausentes.

La actividad metabólica de los microorganismos clínicamente latentes puede determinarse mediante algunos métodos conocidos por los expertos en la materia; por ejemplo, medición de niveles de ARNm en los microorganismos o determinación de su índice de captación de uridina. A este respecto, los microorganismos clínicamente latentes, cuando se comparan con microorganismos en condiciones de crecimiento logarítmicas (*in vitro* o *in vivo*), poseen niveles reducidos pero todavía significativos de:

- (I) ARNm (por ejemplo, de 0,0001 al 50 %, tales como de 1 a 30, 5 o a 25 o 10 al 20 %, del nivel del ARNm); y/o
- (II) uridina (por ejemplo, captación de [<sup>3</sup>H]uridina) (por ejemplo de 0,0005 al 50 %, tal como de 1 al 40, 15 al 35 o 20 al 30 % del nivel de [captación <sup>3</sup>H]uridina).

Los microorganismos clínicamente latentes poseen normalmente numerosas características identificables. Por ejemplo, pueden ser viables pero no cultivables; es decir, no se pueden detectar normalmente mediante técnicas de cultivo normalizadas, pero se pueden detectar y cuantificar mediante técnicas tales como recuento por dilución en caldo, microscopía, o técnicas moleculares tales como reacción en cadena de la polimerasa. Además, los microorganismos clínicamente latentes son fenotípicamente tolerantes y, de esta forma, son sensibles (en fase logarítmica) a los efectos bioestáticos de los agentes antimicrobianos convencionales (es decir, microorganismos cuya concentración inhibitoria mínima (MIC) de un agente antimicrobiano convencional está sustancialmente inalterada); pero posee una susceptibilidad drásticamente disminuida a la destrucción inducida por fármacos (por ejemplo, microorganismos para los cuales, con cualquier agente antimicrobiano convencional dado, la relación de concentración microbiocida mínima (por ejemplo, concentración bactericida mínima, MBC) a MIC es de 10 o más).

Como se usa en el presente documento, el término "*microorganismos*" significa hongos y bacterias. Las referencias en el presente documento a "*microbiano*", "*antimicrobiano*" y "*antimicrobianamente*" deben interpretarse de acuerdo con ello. Por ejemplo, el término "*microbiano*" significa fúngico o bacteriano, e "*infección microbiana*" significa cualquier infección fúngica o bacteriana.

Como se ha resumido anteriormente, Doléans-Jordheim A. et al., divulgaron (Eur J Clin Microbiol Infect Dis. oct 2011;30(10):1249-56) que zidovudina (AZT) tenía un efecto bactericida sobre algunas enterobacterias, en particular en combinación con amikacina y gentamicina.

Como se usa en el presente documento, el término "*bacteria*" (y los derivados del mismo, tales como "*infección microbiana*") incluye, aunque no de forma limitativa, referencias a organismos (o infecciones debidas a organismos) de las siguientes clases y tipos específicos:

- Cocos Gram-positivos, tales como Estafilococos (por ejemplo, *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Staph. saprophyticus*, *Staph. auricularis*, *Staph. capitis capitis*, *Staph. c. ureolyticus*, *Staph. caprae*, *Staph. cohnii cohnii*, *Staph. c. urealyticus*, *Staph. equorum*, *Staph. gallinarum*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. hominis hominis*, *Staph. h. novobiosepticus*, *Staph. hyicus*, *Staph. intermedius*, *Staph. lugdunensis*, *Staph. pasteurii*, *Staph. saccharolyticus*, *Staph. schleiferi schleiferi*, *Staph. s. coagulans*, *Staph. sciuri*, *Staph. simulans*, *Staph. warneri* y *Staph. xylosus*);
- Estreptococos (por ejemplo, beta-hemolíticos, estreptococos piógenos (tales como *Strept. agalactiae*, *Strept. canis*, *Strept. dysgalactiae dysgalactiae*, *Strept. dysgalactiae equisimilis*, *Strept. equi equi*, *Strept. equi zooepidemicus*, *Strept. iniae*, *Strept. porcinus* y *Strept. pyogenes*), microaerófilos, estreptococos piógenos (*Streptococcus "milleri"*, tales como *Strept. anginosus*, *Strept. constellatus constellatus*, *Strept. constellatus pharyngidis* y *Strept. intermedius*), estreptococos orales de los "ácaros" (alfa-hemolíticos - *Streptococcus "viridans"*, tales como *Strept. mitis*, *Strept. oralis*, *Strept. sanguinis*, *Strept. cristatus*, *Strept. gordonii* y *Strept. parasanguinis*), "salivarius" (no hemolítico, tal como *Strept. salivarius* y *Strept. vestibularis*) y "mutans" (estreptococos de la superficie de los dientes, tales como *Strept. criceti*, *Strept. mutans*, grupos de *Strept. rattii* y *Strept. sobrinus*), *Strept. acidominimus*, *Strept. bovis*, *Strept. faecalis*, *Strept. equinus*, *Strept. pneumoniae* y *Strept. suis*, o Estreptococos clasificados alternativamente como Estreptococos de los Grupos A, B, C, D, E, G, L, P, U o V);
- Cocos gram-negativos, tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Neisseria subflava* y *Neisseria weaveri*;
- Bacillaceae, tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus cereus*;
- Enterobacteriaceae, tal como *Escherichia coli*, Enterobacter (e.g. *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter cloaca*), Citrobacter (tal como *Citrob. freundii* y *Citrob. divernis*), Hafnia (por ejemplo, *Hafnia alvei*), Erwinia (por ejemplo, *Erwinia persicinus*), *Morganella morganii*, Salmonella (*Salmonella enterica* y *Salmonella typhi*), Shigella (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), Klebsiella (por ejemplo *Klebs. pneumoniae*, *Klebs. oxytoca*, *Klebs. ornitholytica*, *Klebs. planticola*, *Klebs. ozaenae*, *Klebs. terrigena*, *Klebs. granulomatis* (*Calymmatobacterium granulomatis*) y *Klebs. rhinoscleromatis*), Proteus (por ejemplo *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri* y *Pr. vulgaris*), Providencia (por ejemplo, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia*

*rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Serratia* (por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciens*), y *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* y *Yersinia pseudotuberculosis*);  
 Enterococos (por ejemplo, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus dispar*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus flavescens*,  
 5 *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* y *Enterococcus solitarius*);  
*Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*); *Acinetobacter* (por ejemplo, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii* y *A. radioresistens*);  
 10 *Pseudomonas* (por ejemplo, *Ps. aeruginosa*, *Ps. maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*), *Ps. alcaligenes*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. fluorescens*, *Ps. luteola*, *Ps. mendocina*, *Ps. monteillii*, *Ps. oryzihabitans*, *Ps. pertucinogena*, *Ps. pseudocaligenes*, *Ps. putida* y *Ps. stutzeri*); *Bacteroides fragilis*;  
*Peptococcus* (por ejemplo, *Peptococcus niger*);  
*Peptostreptococcus*;  
 15 *Clostridium* (por ejemplo, *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. absonum*, *C. argentinense*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. cadaveris*, *C. carnis*, *C. celatum*, *C. clostridioforme*, *C. cochlearium*, *C. cocleatum*, *C. fallax*, *C. ghonii*, *C. glycolicum*, *C. haemolyticum*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. indolis*, *C. innocuum*, *C. irregulare*, *C. leptum*, *C. limosum*, *C. malenominatum*, *C. novyi*, *C. oroticum*, *C. paraputrificum*, *C. piliforme*, *C. putrefasciens*, *C. ramosum*, *C. septicum*, *C. sordelii*, *C. sphenoides*, *C. sporogenes*, *C. subterminale*, *C. symbiosum* y *C. tertium*);  
 20 *Mycoplasma* (por ejemplo, *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* y *M. urealyticum*); *Mycobacteria* (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium smegmitis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium alvei*, *Mycobacterium asiaticum*, *Mycobacterium aurum*, *Mycobacterium bohemicum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium branderi*,  
 25 *Mycobacterium brumae*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium chubense*, *Mycobacterium confluentis*, *Mycobacterium conspicuum*, *Mycobacterium cookii*, *Mycobacterium flavescens*, *Mycobacterium gadium*, *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium goodii*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium hassicum*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium interjectum*, *Mycobacterium heidelbergense*, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium malmoense*,  
 30 *Mycobacterium microgenicum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Mycobacterium neoaurum*, *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium peregrinum*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium shimoidei*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium thermoresistabile*, *Mycobacterium triplex*, *Mycobacterium triviale*, *Mycobacterium tusciae*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium wolinskyi* y *Mycobacterium xenopi*);  
 35 *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahemolyticus*);  
*Actinobacillus* (por ejemplo, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus hominis*, *Actinobacillus lignieresii*, *Actinobacillus suis* y *Actinobacillus ureae*);  
*Actinomyces* (por ejemplo, *Actinomyces israelii*);  
 40 *Brucella* (por ejemplo, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melintensis* y *Brucella suis*); *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter fetus*);  
*Listeria monocytogenes*;  
*Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio carchariae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus* y *Vibrio vulnificus*);  
 45 *Erysipelothrix rhusopathiae*;  
*Corynebacteriaceae* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium urealyticum*);  
*Spirochaetaceae*, tales como *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia recurrentis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia bissettii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia japonica*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia caucasica*, *Borrelia crocidurae*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia graingeri*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia hispanica*, *Borrelia latyschewii*, *Borrelia mazzottii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia persica*, *Borrelia turicatae* y *Borrelia venezuelensis*) y *Treponema* (*Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, *Treponema pallidum* ssp. *endemicum*, *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* y *Treponema carateum*); *Pasteurella* (por ejemplo, *Pasteurella aerogenes*, *Pasteurella bettyae*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida multocida*, *Pasteurella multocida gallicida*, *Pasteurella multocida septica*,  
 55 *Pasteurella pneumotropica* y *Pasteurella stomatis*);  
*Bordetella* (por ejemplo, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella hinzii*, *Bordetella holmseii*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis* y *Bordetella trematum*);  
*Nocardiaceae*, tal como *Nocardia* (por ejemplo, *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*); *Rickettsia* (por ejemplo *Rickettsia* o *Coxiella burnetii*);  
 60 *Legionella* (por ejemplo *Legionella anisa*, *Legionella birminghamensis*, *Legionella bozemanii*, *Legionella cincinnatiensis*, *Legionella dumoffii*, *Legionella feeleeii*, *Legionella gormanii*, *Legionella hackeliae*, *Legionella israelensis*, *Legionella jordani*, *Legionella lansingensis*, *Legionella longbeachae*, *Legionella maceachernii*, *Legionella micdadei*, *Legionella oakridgensis*, *Legionella pneumophila*, *Legionella sainthelensi*, *Legionella tucsonensis* y *Legionella wadsworthii*);  
 65 *Moraxella catarrhalis*;

- Cyclospora cayetanensis*;  
*Entamoeba histolytica*;  
*Giardia lamblia*;  
*Trichomonas vaginalis*;  
 5 *Toxoplasma gondii*;  
*Stenotrophomonas maltophilia*;  
*Burkholderia cepacia*; *Burkholderia mallei* y *Burkholderia pseudomallei*;  
*Francisella tularensis*;  
 10 *Gardnerella* (por ejemplo, *Gardnerella vaginalis* y *Gardnerella mobiluncus*);  
*Streptobacillus moniliformis*;  
 Flavobacteriaceae, tales como *Capnocytophaga* (por ejemplo, *Capnocytophaga canimorsus*, *Capnocytophaga cynodegmi*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga granulosa*, *Capnocytophaga haemolytica*, *Capnocytophaga ochracea* y *Capnocytophaga sputigena*); *Bartonella* (*Bartonella bacilliformis*, *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella elizabethae*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* y *Bartonella vinsonii arupensis*);  
 15 *Leptospira* (por ejemplo, *Leptospira biflexa*, *Leptospira borgpetersenii*, *Leptospira inadai*, *Leptospira interrogans*, *Leptospira kirschneri*, *Leptospira noguchii*, *Leptospira santarosai* y *Leptospira weilii*);  
*Spirillum* (por ejemplo, *Spirillum minus*);  
*Bacteroides* (por ejemplo, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides capillosus*, *Bacteroides coagulans*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides forsythus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides pyogenes*, *Bacteroides splanchinicus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides tectus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ureolyticus* y *Bacteroides vulgatus*); *Prevotella* (por ejemplo, *Prevotella bivia*, *Prevotella buccae*, *Prevotella corporis*, *Prevotella dentalis* (*Mitsuokella dentalis*), *Prevotella denticola*, *Prevotella disiens*, *Prevotella enoeca*, *Prevotella heparinolytica*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loeschii*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Prevotella oris*, *Prevotella oulora*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella venoralis* y *Prevotella zoogloeiformans*);  
 20 *Porphyromonas* (por ejemplo, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas cangingivalis*, *Porphyromonas canoris*, *Porphyromonas cansulci*, *Porphyromonas catoniae*, *Porphyromonas circumdentaria*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas gingivicanis*, *Porphyromonas levii* y *Porphyromonas de macacos*);  
 30 *Fusobacterium* (por ejemplo, *F. gonadiaformans*, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum necrophorum*, *F. necrophorum fundiliforme*, *F. nucleatum nucleatum*, *F. nucleatum fusiforme*, *F. nucleatum polymorphum*, *F. nucleatum vincentii*, *F. periodonticum*, *F. russii*, *F. ulcerans* y *F. varium*);  
*Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*);  
*Cryptosporidium* (por ejemplo, *C. parvum*, *C. hominis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. meleagridis* y *C. muris*); *Chlamydophila* (por ejemplo, *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci*), *Chlamydophila pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) y *Chlamydophila psittaci* (*Chlamydia psittaci*)); *Leuconostoc* (por ejemplo, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudomesenteroides*);  
 35 *Gemella* (por ejemplo, *Gemella bergeri*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum* y *Gemella sanguinis*); y  
 40 *Ureaplasma* (por ejemplo, *Ureaplasma parvum* y *Ureaplasma urealyticum*).

Preferentemente, las infecciones microbianas tratadas mediante las combinaciones descritas en el presente documento son infecciones gram-negativas. Las bacterias concretas que se pueden tratar usando una combinación de la invención incluyen:

- 45 *Bacterias Gram positivas*;  
*Estafilococos*, tales como *Staph. aureus* (tanto sensible a meticilina (es decir, MASA) como resistente a meticilina (es decir MRSA)) y *Staph. epidermidis*;  
*Streptococos*, tales como *Strept. agalactiae* y *Strept. pyogenes*;  
 50 *Bacillaceae*, tal *Bacillus anthracis*;  
*Enterococos*, tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*; y *bacterias Gram negativas*;  
*Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella* (por ejemplo, *Klebs. pneumoniae* y *Klebs. oxytoca*) y *Proteus* (por ejemplo, *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri* y *Pr. vulgaris*);  
*Haemophilus influenzae*;  
 55 *Micobacterias*, tales como *Mycobacterium tuberculosis*.

60 Preferentemente, la bacteria es una *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia coli*, *Klebsiella* (por ejemplo, *Klebs. pneumoniae* y *Klebs. oxytoca*) y *Proteus* (por ejemplo, *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri* y *Pr. vulgaris*). La combinación de la presente invención es particularmente beneficiosa en el tratamiento de bacterias con resistencia a (multi) fármacos ((M)DR). Con respecto a las *Enterobacteriaceae*, la resistencia a los fármacos se desarrolla a menudo frente a la carbapenemasa, es decir, cepas resistentes a la carbapenemasa y cepas de "β-lactamasa de espectro extendido" (ESBL) por ejemplo, neumonía por *Klebs.* resistente a metalo-beta-lactamasa-1 (NDM-1).

65 Debe tenerse presente que aunque una combinación tal como la reivindicada puede demostrarse inicialmente como funcional en el tratamiento de las cepas (M)DR, puede a continuación utilizarse en el tratamiento de cepas no resistentes. Esto es especialmente valioso en el contexto de la combinación actualmente reivindicada donde el

tratamiento primario para las Enterobacteriaceae, tal como *Escherichia coli*, Klebsiella (por ejemplo, *Klebs. pneumoniae* y *Klebs. oxytoca*) y Proteus (por ejemplo, *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri* y *Pr. vulgaris*) son fármacos antimicrobianos, que son caros debido a la protección prevalente de la patente. Se cree que la sustitución de dichos fármacos "éticos" por una combinación de antibióticos "genéricos" es beneficiosa desde una perspectiva terapéutica así como desde una perspectiva financiera/económica cuando los gobiernos están buscando reducir el coste de la sanidad pública.

Las combinaciones de la presente invención se pueden usar para tratar infecciones asociadas con cualquiera de los organismos bacterianos anteriormente mencionados, y en particular, se pueden utilizar para destruir microorganismos que se multiplican y/o clínicamente latentes asociados con dicha infección.

Las dolencias concretas que se pueden tratar usando la combinación de la presente invención incluyen la tuberculosis (por ejemplo, tuberculosis pulmonar, tuberculosis no pulmonar (tal como tuberculosis de los ganglios linfáticos, tuberculosis genitourinaria, tuberculosis de huesos y articulaciones, meningitis por tuberculosis) y tuberculosis miliar), ántrax, abscesos, acné común, actinomicosis, asma, disentería bacilar, conjuntivitis bacteriana, queratitis bacteriana, vaginosis bacteriana, botulismo, úlcera de Buruli, infecciones óseas y articulares, bronquitis (aguda o crónica), brucelosis, heridas por quemaduras, fiebre por arañazo de gato, celulitis, chancroide, colangitis, colecistitis, difteria cutánea, fibrosis quística, cistitis, nefritis, panbronquiolitis difusa, difteria, caries dental, enfermedades del tracto respiratorio superior, eczema, empiema, endocarditis, endometritis, fiebre entérica, enteritis, epididimitis, epiglotitis, erisipela, erisipela, erisipeloide, eritrasma, infecciones oculares, forúnculos, vaginitis por Gardnerella, infecciones gastrointestinales (gastroenteritis), infecciones genitales, gingivitis, gonorrea, granuloma inguinal, fiebre de Haverhill, quemaduras infectadas, infecciones tras operaciones dentales, infecciones en la región oral, infecciones asociadas con prótesis, abscesos intraabdominales, enfermedad del legionario, lepra, leptospirosis, listeriosis, abscesos en el hígado, enfermedad de Lyme, linfogranuloma venéreo, mastitis, mastoiditis, meningitis e infecciones del sistema nervioso, micetoma, nocardiosis (por ejemplo, pie de Madura), uretritis no específica, oftalmia (por ejemplo, oftalmia neonatal), osteomielitis, otitis (por ejemplo, otitis externa y otitis media), orquitis, pancreatitis, paroniquia, pelviperitonitis, peritonitis, peritonitis con apendicitis, faringitis, flemones, enfermedad azul, peste, derrame pleural, neumonía, infecciones de heridas tras cirugías, gangrena gaseosa postoperatoria, prostatitis, colitis pseudomembranosa, psitacosis, enfisema pulmonar, pielonefritis, pioderma (por ejemplo, impétigo), fiebre Q, fiebre por mordedura de rata, reticulosis, envenenamiento por ricina, enfermedad de Ritter, salmonelosis, salpingitis, artritis séptica, infecciones sépticas, septicemia, sinusitis, infecciones de la piel (por ejemplo, granulomas de la piel, impétigo, foliculitis y furunculosis), sífilis, infecciones sistémicas, tonsilitis, síndrome de choque tóxico, tracoma, tularemia, tifoideo, tifus (por ejemplo, tifus epidémico, tifus de murino, tifus de Bush y fiebre maculosa), uretritis, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas, pián, aspergilosis, candidiasis (por ejemplo, candidiasis orofaríngea, candidiasis vaginal o balanitis), criptococosis, favo, histoplasmosis, interatómico, mucolíticos, tiña (por ejemplo, tiña corporal), tiña del cuero cabelludo, tiña inguinal, pie de atleta y tiña de las uñas), monoatómicos, pitiriasis versacuerpos, tiña y estequiométricos; o infecciones con MASA, MRSA, *Staph. epidermidis*, *Strept. agalactiae*, *Strept. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebs. pneumoniae*, *Klebs. oxytoca*, *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri*, *Pr. vulgaris*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. En particular, la combinación de infecciones asociadas a piedras en el riñón e infecciones asociadas a catéteres surge de cualquiera de las bacterias descritas.

En una realización particular, la infección se selecciona entre infecciones del tracto urinario (cistitis, nefritis, infecciones asociadas a piedras en el riñón e infecciones asociadas a catéteres).

Se apreciará que las referencias en el presente documento a "tratamiento" se extienden a la profilaxis así como al tratamiento de las enfermedades o síntomas establecidos.

Los compuestos antimicrobianos adicionales preferidos para su uso en la presente invención son aquellos capaces de destruir clínicamente los microorganismos latentes. Los métodos para determinar la actividad contra las bacterias clínicamente latentes incluyen una determinación, en condiciones conocidas para las personas expertas en la materia (tales como las descritas en Nature Reviews, Drug Discovery, 1, 895-910 (2002)), de la Concentración mínima estacionaria ("MNCL") o la Concentración mínima duocarmicina ("MDR") de un compuesto de ensayo. Se describe un método de cribado de un compuesto adecuado contra microorganismos clínicamente latentes en el documento WO2000028074.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado farmacéuticamente aceptable" significa:

- (a) sales farmacéuticamente aceptables tanto con ácidos como con bases (por ejemplo, sales de adición de ácido); y/o
- (b) solvatos (incluyendo hidratos).

Las sales de adición de ácido que se pueden mencionar incluyen sales de carboxilato (por ejemplo, formiato, acetato, trifluoroacetato, propionato, isobutirato, heptanoato, decanoato, caprato, tricaprillato, estearato, acrilato, caproato, propiolato, ascorbato, citrato, glucuronato, glutamato, glicolato,  $\alpha$ -hidroxibutirato, lactato, tartrato, fenilacetato, mandelato, fenilpropionato, fenilbutirato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, dinitrobenzoato, o-acetoxibenzoato, salicilato, nicotinato, isonicotinato, cinamato, oxalato, malonato, succinato,

5 suberato, sebacato, fumarato, malato, maleato, hidroximaleato, hipurato, sales de ftalato o tereftalato), sales de haluro (por ejemplo, sales de cloruro, bromuro o yoduro), sales de sulfonato (por ejemplo, bencenosulfonato, metil-bromo-bencenosulfonato o clorobencenosulfonato, xilenosulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, propanosulfonato, hidroxietanosulfonato, o sales de 1- o 2-naftaleno-sulfonato o 1,5-naftalenodisulfonato) o sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato o sales de nitrato.

Los compuestos para su uso de acuerdo con la invención pueden administrarse como la materia prima, pero los principios activos se proporcionan preferentemente en la forma de composiciones farmacéuticas.

10 Los principios activos pueden utilizarse tanto como formulaciones separadas o como una única formulación combinada. Cuando se combinan en la misma formulación se apreciará que los dos compuestos deben ser estables y compatibles entre sí y con el resto de componentes de la formulación.

15 Las formulaciones de la invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, parenteral (incluyendo subcutánea, por ejemplo, mediante inyección o comprimido de depósito, intradérmica, intratecal, intramuscular, por ejemplo, mediante depósito e intravenosa), rectal y tópica (incluyendo dérmica, bucal y sublingual) o en una forma adecuada para la administración mediante inhalación o administración mediante insuflación. La ruta de administración más adecuada puede depender de la dolencia y el trastorno del paciente. En una realización preferida, la composición (administrada sola o por separado) se administra sistémicamente, por ejemplo, de forma intravenosa, intramuscular, 20 mediante un catéter o inhalada.

Preferentemente, las composiciones de la invención se formulan para administración oral o tópica. En una realización preferida, la composición es una crema o una pomada adaptada para la administración nasal, en particular para la administración a las narinas anteriores.

25 Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en una forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams y Wilkins, 21ª Edición, (2005). Los métodos adecuados incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con un transportador que constituye uno o más excipientes. En general, las formulaciones se preparan mediante asociación uniforme e íntima de los principios 30 activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, si es necesario, conformar el producto en la formulación deseada. Se apreciará que cuando los dos principios activos se administran de forma independiente, cada uno puede administrarse por medios diferentes.

35 Cuando se formula con excipientes, Los principios activos pueden estar presentes en una concentración de 0,1 a 99,5 % (tal como de 0,5 a 95 %) en peso de la mezcla total; convenientemente de 30 a 95 % para los comprimidos y cápsulas y de 0,01 a 50 % (tal como de 3 a 50 %) para las preparaciones líquidas.

40 Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, bolsitas o comprimidos (por ejemplo, comprimidos masticables, en particular para la administración pediátrica), conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de principio activo; como polvo o gránulos; como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

45 Un comprimido se puede crear por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más excipientes. Los comprimidos de compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida como polvo o gránulos, mezclado opcionalmente con otros excipientes convencionales tales como agentes de unión (por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón, polivinilpirrolidona y/o hidroximetilcelulosa), cargas (por ejemplo, lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato de calcio y/o sorbitol), 50 lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y/o sílice), disgregantes (por ejemplo, almidón de patata, croscarmelosa de sodio y/o almidón glicolato de sodio), y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Pueden prepararse comprimidos moldeados moldeando en una máquina adecuada una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden opcionalmente revestirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación controlada (por ejemplo, retardada, sostenida, o sometida a pulsos, o una combinación de liberación inmediata y liberación controlada) de los 55 principios activos.

60 Como alternativa, los principios activos pueden incorporarse en preparaciones líquidas orales tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes o elixires. Las formulaciones que contienen los principios activos pueden presentarse también como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroximetilcelulosa, carboximetilcelulosa, estearato de aluminio gel y/o grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina, monooleato de sorbitán y/o goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, 65 aceites comestibles, tales como aceite de almendra, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y/u otro alcohol etílico), y conservantes (por ejemplo, metil o propil p-hidroxibenzoatos y/o ácido sórbico).

Las composiciones típicas, que son útiles para tratar trastornos de la piel o de las membranas accesibles mediante digitación (tales como la membrana de la boca, vagina, cuello del útero, ano y recto), incluyen cremas, pomadas, lociones, pulverizadores, geles y soluciones o suspensiones acuosas estériles. como tales, las composiciones tópicas incluyen aquellas en las que los principios activos se disuelven o dispersan en un vehículo dermatológico conocido en la técnica (por ejemplo, geles acuosos o no acuosos, pomadas, emulsiones de agua en aceite en agua o aceite en agua). Los constituyentes de dichos vehículos pueden comprender agua, soluciones tamponantes acuosas, disolventes no acuosos (tales como etanol, isopropanol, alcohol bencílico, 2-(2-etoxietoxi)etanol, propilenglicol, monolaurato de propilenglicol, glicofurol o glicerol), aceites (por ejemplo, un aceite mineral tal como una parafina líquida, triglicéridos naturales o sintéticos tales como Miglyol™, o aceites de silicona tales como dimeticona). Dependiendo, entre otros, de la naturaleza de la formulación así como su uso y sitio de aplicación previstos, el vehículo dermatológico empleado puede contener uno o más componentes seleccionados entre la siguiente lista: un agente solubilizante o disolvente (por ejemplo, a  $\beta$ -ciclodextrina, tal como hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina, o un alcohol o poliol tal como etanol, propilenglicol o glicerol); un agente espesante (por ejemplo, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa o carbómero); un agente gelificante (por ejemplo, un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno); un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, clorhexidina, clorbutol, un benzoato, sorbato de potasio o ERDTA o una sal del mismo; y o agentes tamponante(s) del pH (por ejemplo, una mezcla de dihidrógeno fosfato y sales de hidrógeno fosfato, o una mezcla de ácido cítrico y una sal de hidrógeno fosfato). Las formulaciones tópicas pueden formularse también como parche transdérmico.

Los métodos de producir composiciones farmacéuticas tópicas tales como cremas, pomadas, lociones, pulverizaciones y soluciones o suspensiones acuosas estériles son bien conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para preparar composiciones farmacéuticas tópicas se describen, por ejemplo en los documentos WO9510999, US 6974585, WO2006048747, así como en los documentos citados en cualquiera de estas referencias.

Las composiciones farmacéuticas tópicas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para tratar una variedad de trastornos de la piel o membranas, tales como infecciones de la piel o membranas (por ejemplo, infecciones de membranas nasales, axilas, ingle, perineo, recto, piel dermatítica, úlceras de la piel, y sitios de inserción de equipo médico tales con agujas i.v., catéteres y traqueotomía o sondas de alimentación) con cualquiera de las bacterias, hongos descritos anteriormente, (por ejemplo, cualquiera de los organismos *Staphylococci*, *Streptococci*, *Mycobacteria* o *Pseudomonas* mencionados anteriormente en el presente documento, tales como *S. aureus* (por ejemplo, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA))).

Las dolencias bacterianas concretas que se pueden tratar mediante composiciones farmacéuticas tópicas de la presente invención incluyen también las dolencias relacionadas con la piel y membranas divulgadas anteriormente en el presente documento, así como: acné común; rosácea (incluyendo rosácea eritematotelangiectática, rosácea papulopustular, rosácea fimatosa y rosácea ocular); erisipelas; eritrasma; ectima; ectima gangrenosa; impétigo; paroniquia; celulitis; foliculitis (incluyendo foliculitis del jacuzzi); furunculosis; carbunculosis; síndrome estafilocócico de la piel escaldada; fiebre escarlata quirúrgica; enfermedad perianal estreptocócica; síndrome estreptocócico de choque tóxico; queratolisis excavada; tricomicosis axilar; pioderma; infecciones del canal del oído externo; síndrome de la uña verde; espiroquetas; fasciitis necrotizante; infecciones micobacterianas de la piel (tal como lupus vulgar, escrofuloderma, tuberculosis verrucosa, tuberculide, eritema nudoso, eritema indurado, manifestaciones cutáneas de la lepra tuberculoide o la lepra lepromatosa, eritema nudoso leproso, infecciones cutáneas por *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. chelonae* (incluyendo *M. abscessus*) o *M. fortuitum*, granuloma de piscina (o de acuario), linfadenitis y úlcera de Buruli (úlcera de Bairnsdale, úlcera de Searles, úlcera de Kakerifu o úlcera de Toro)); así como eczema infectado, quemaduras, abrasiones y heridas de la piel.

Las composiciones para su uso de acuerdo con la invención pueden presentarse en un envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen los principios activos. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase de tipo blíster. Cuando las composiciones están previstas para su administración como dos composiciones separadas, estas pueden presentarse en la forma de un envase doble.

Las composiciones farmacéuticas pueden también recetarse al paciente en "envases para el paciente" que contienen el ciclo completo de tratamiento en un único envase, usualmente un envase de tipo blíster. Los envases para pacientes tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales, en las que un farmacéutico divide el suministro para los pacientes de un medicamento procedente de un suministro a granel, en que el paciente tiene siempre el acceso al prospecto contenido en el envase para el paciente, que normalmente falta en las recetas tradicionales. La inclusión del prospecto ha mostrado mejorar el cumplimiento del paciente de las instrucciones del médico.

Las dosificaciones y formulaciones adecuadas para la administración de colistina se describen en la etiqueta del producto Colomycin® que se puede encontrar en <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/6301/SPC/Colomycin+Tablets/>

Las dosificaciones y formulaciones adecuadas para la administración de rifampicina se describen en la etiqueta del producto de las cápsulas de Rifadin® que se pueden encontrar en <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/21223/SPC/Rifadin+300 mg+Capsules/> o Rifadin® para Infusión que se puede encontrar en <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/6435/SPC/Rifadin+For+Infusion+600 mg/>

5 Las dosificaciones y formulaciones adecuadas para la administración de rifapentina se describen en la etiqueta del producto de Priftin®. El régimen de dosificación preferido para el tratamiento de la tuberculosis producida por organismos susceptibles a fármacos como parte de regímenes consiste en una fase inicial de 2 meses seguida por una fase de continuación de 4 meses. La fase inicial (2 meses) implica la administración de 600 mg dos veces a la semana durante dos meses mediante observación directa del tratamiento, con un intervalo de no menos de 3 días consecutivos (72 horas) entre dosis, en combinación con otros fármacos antituberculosos. La fase de continuación (4 meses) implica la administración de 600 mg una vez a la semana durante 4 meses mediante tratamiento de observación directa con isoniazid u otro agente antituberculoso adecuados.

15 Las dosificaciones y formulaciones adecuadas para la administración de zidovudina se describen en la etiqueta del producto Retrovir® solución oral o cápsulas que se puede encontrar en <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/12444/SPC/Retrovir+250 mg+Capsules/>

20 La administración de la combinación de la invención por medio de un único envase para el paciente, o envases para el paciente de cada composición, incluyendo un prospecto dirigido al paciente para el uso correcto de la invención es característica deseable de la presente invención.

25 Los componentes individuales de la combinación de la invención pueden administrarse simultáneamente, por separado o mediante uso secuencial. El médico a cargo del tratamiento será capaz de decidir si utilizar el régimen de dosificación conocido y si mantener la administración simultánea. Por ejemplo, la administración diaria de zidovudina y colistina cada 8 horas puede estar superpuesta sobre el régimen para administrar rifapentina o rifampicina, particularmente rifampicina.

30 Se describe en el presente documento un envase para un paciente que comprende al menos un principio activo de la combinación de acuerdo con la invención y una información inserta que contiene indicaciones sobre el uso de la combinación de la invención.

35 La cantidad de principios activos requerida para el uso en el tratamiento variará con la naturaleza de la dolencia que se está tratando y la edad y la dolencia del paciente, y será en última instancia a la discreción del médico o veterinario a cargo del tratamiento. En general, sin embargo, las dosis empleadas para el tratamiento de adultos humanos estarán normalmente en el intervalo de 0,02 a 5000 mg al día, preferentemente de 1 a 1500 mg al día. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una única dosis o como dosis divididas administradas en intervalos adecuados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día.

#### 40 Ensayos biológicos

Los procedimientos de ensayo que se pueden emplear para determinar la actividad biológica (por ejemplo, bactericida o antimicrobiana) de los principios activos incluyen aquellos conocidos para las personas expertas en la materia para la determinación:

- 45
- (a) actividad bactericida contra bacterias clínicamente latentes; y
  - (b) actividad antimicrobiana contra bacterias en fase logarítmica.

50 En relación con (a) lo anterior, los métodos para determinar la actividad contra las bacterias clínicamente latentes incluyen una determinación, en condiciones conocidas para las personas expertas en la materia (tales como las descritas en Nature Reviews, Drug Discovery 1, 895-910 (2002)), de la Concentración mínima estacionaria ("MNCL") o la Concentración mínima duocarmicina ("MDR") de un compuesto de ensayo.

55 A modo de ejemplo, el documento WO2000028074 describe un método adecuado de cribado de compuestos para determinar su capacidad de destruir microorganismos clínicamente latentes. Un método puede incluir las siguientes etapas:

- 60
- (1) hacer crecer un cultivo bacteriano hasta la fase estacionaria;
  - (2) tratar el cultivo en la fase estacionaria con uno o más agentes antimicrobianos a una concentración y/o tiempo suficiente para destruir las bacterias en crecimiento, seleccionando por tanto una subpoblación fenotípicamente resistente;
  - (3) incubar una muestra de la subpoblación fenotípicamente resistente con uno o más compuestos o agentes de ensayo; y
  - (4) evaluar cualquier efecto antimicrobiano contra la subpoblación fenotípicamente resistente.
- 65

De acuerdo con este método, la subpoblación fenotípicamente resistente puede observarse como representativa de bacterias clínicamente latentes que permanecen metabólicamente activas *in vivo* y que pueden dar como resultado una recidiva o el inicio de la enfermedad.

5 En relación con (b) anterior, los métodos para determinar la actividad contra las bacterias en fase logarítmica incluyen una determinación, en condiciones normalizadas (es decir, condiciones conocidas por los expertos en la materia, tales como las descritas en el documento WO 2005014585), de la concentración inhibitoria mínima ("MIC") o la concentración bactericida mínima ("MBC") de un compuesto de ensayo. Se describen a continuación los ejemplos específicos de dichos métodos.

10

**Ejemplos**

Se describen a continuación los experimentos del tablero y de destrucción del tiempo en Antimicrob Chemo (2013) 68, 374-384.

15

Ejemplo 1; Efecto de sinergia *in vitro* de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra la *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 BAA2471 en fase logarítmica mediante el método del tablero tridimensional

**Objetivos**

20

Para evaluar el efecto de sinergia de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra la *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 BAA2472 en fase logarítmica mediante el método del tablero

**Materiales y métodos**

25

1. Cepa bacteriana utilizada: NDM-1 BAA-2472TM, Se obtuvo la *Klebsiella pneumoniae* de la American Type Culture Collection.
2. Crecimiento de las bacterias: Se llevó a cabo el crecimiento en fase logarítmica de BA2472 de acuerdo con el Crecimiento de bacterias en fase logarítmica SOP R-005-00
3. Antibióticos y preparación.

30

Se obtuvo RMP de Sigma y se disolvió en DMSO a la concentración madre de 10 mg/ml.

Se obtuvo la colistina de Sigma (10 mg/ml).

35

Se obtuvo HT0120663 de Sigma y se disolvió en DMSO para preparar una solución madre (10 mg/ml).

**4. Método del tablero**

40 Se combinaron rifampicina y colistina usando un tablero bidimensional con diluciones de dos veces de cada concentración de partida del fármaco de 8 µg/ml para la rifampicina y 4 µg/ml para la colistina. Se ensayaron las combinaciones triples (Colistina/rifampicina/HT0120663) mediante un método de tablero tridimensional donde se añadió HT0120663 a una única concentración de cada placa a 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml, respectivamente.

45

El cultivo durante la noche se diluyó con caldo nutriente (Oxoid) a 10<sup>5</sup> UFC/ml y se añadieron 280 µl de la suspensión del cultivo a cada pocillo para preparar el volumen final de 300 µl.

50

5. La incubación de los compuestos con la suspensión bacteriana se llevó a cabo durante 24 horas.
6. Se examinaron los efectos de la combinación calculando el índice de la concentración inhibitoria fraccionada (FICI) de doble combinación, del siguiente modo: (MIC del fármaco A, ensayado en combinación)/(MIC del fármaco A, ensayado solo) + (MIC del fármaco B ensayado en combinación)/(MIC del fármaco B, ensayado solo). La interacción de la combinación se definió como mostrando sinergia si el FICI era <0,5, sin interacción si el FICI era > 0,5 pero <4,0 y antagonismo si el FICI era >4,0.

55

**Resultados**

Combinación de rifampicina y colistina sin adición de HT0120663. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	doble combinación														HT0120663 (µg/ml)
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
	4	0,34	0,32	0,31	0,29	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0	
	2	0,33	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27		
	1	0,31	0,30	0,28	0,27	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27		
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,28	0,28	0,27	0,27	0,76	0,86	0,90	0,89	0,85	0,72		
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,28	0,92	0,93	0,98	0,97	0,98	0,94	0,95	0,80		

## ES 2 719 557 T3

doble combinación		Rifampicina												HT0120663 (µg/ml)
µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
0,125	0,32	0,29	0,28	0,91	0,97	0,92	0,93	1,02	0,93	0,93	0,96	0,87		
0,0625	0,31	0,38	0,62	0,82	0,84	0,86	0,85	0,85	0,92	0,87	0,98	0,80		
0	0,32	0,37	0,56	0,73	0,78	0,75	0,77	0,75	0,81	0,78	0,78	0,80		

La MIC de rifampicina era de 4 µg/ml. En combinación con 0,5 µg/ml de colistina, La MIC se redujo a 0,25 µg/ml. La MIC de la colistina era de 1 µg/ml. En combinación con 2 µg/ml de rifampicina, La MIC se redujo a 0,125 µg/ml. El índice de FIC es 0,188.

- 5 combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

triple combinación		Rifampicina												HT0120663 (µg/ml)
µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,27	0,5	
2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,27		
1	0,32	0,29	0,28	0,30	0,31	0,31	0,30	0,30	0,28	0,27	0,28	0,27		
Colistina 0,5	0,31	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,35	0,34	0,35	0,39	0,44	0,43		
0,25	0,32	0,29	0,30	0,33	0,34	0,76	0,41	0,52	0,58	0,47	0,59	0,43		
0,125	0,32	0,29	0,29	0,33	0,43	0,48	0,49	0,57	0,61	0,56	0,46	0,42		
0,0625	0,32	0,29	0,28	0,30	0,49	0,46	0,48	0,48	0,48	0,47	0,48	0,50		
0	0,32	0,31	0,34	0,31	0,52	0,47	0,48	0,60	0,42	0,41	0,47	0,40		

- 10 La adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml en la combinación de rifampicina y colistina redujo la MIC de rifampicina de 4 a 1 µg/ml lo que aumento la inhibición del crecimiento.

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 1 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

15

triple combinación		Rifampicina												HT0120663 (µg/ml)
µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,31	0,29	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	1	
2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27		
1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,27	0,31	0,28		
Colistina 0,5	0,31	0,29	0,28	0,27	0,28	0,31	0,31	0,35	0,28	0,38	0,38	0,34		
0,25	0,31	0,29	0,28	0,28	0,28	0,31	0,31	0,35	0,28	0,36	0,38	0,36		
0,125	0,31	0,29	0,28	0,28	0,29	0,31	0,31	0,35	0,28	0,37	0,38	0,36		
0,0625	0,31	0,29	0,30	0,28	0,29	0,31	0,31	0,38	0,29	0,39	0,33	0,35		
0	0,31	0,29	0,50	0,28	0,29	0,31	0,31	0,36	0,36	0,36	0,35	0,50		

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 2 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

triple combinación		Rifampicina												HT0120663 (µg/ml)
µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,32	0,29	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	2	
2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,24	
1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,29	0,29	0,29	0,29	0,27	0,27	0,27	0,26		
Colistina 0,5	0,31	0,29	0,28	0,31	0,33	0,34	0,34	0,32	0,27	0,28	0,27	0,30		
0,25	0,31	0,29	0,28	0,27	0,34	0,35	0,37	0,36	0,27	0,28	0,28	0,30		
0,125	0,31	0,29	0,28	0,29	0,34	0,32	0,39	0,35	0,27	0,28	0,28	0,30		
0,0625	0,31	0,29	0,28	0,28	0,34	0,30	0,32	0,32	0,27	0,28	0,28	0,30		
0	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,28	0,33	0,33	0,27	0,28	0,29	0,53		

- 20 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 4 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

triple combinación		Rifampicina												HT0120663 (µg/ml)
µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	4	
2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26		
1	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,32	0,32	0,31	0,28	0,27	0,27	0,27		
Colistina 0,5	0,31	0,29	0,29	0,31	0,33	0,34	0,34	0,32	0,30	0,28	0,75	0,27		

## ES 2 719 557 T3

	triple combinación						Rifampicina							
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)
	0,25	0,31	0,29	0,30	0,32	0,36	0,36	0,34	0,36	0,35	0,28	0,27	0,27	
	0,125	0,31	0,29	0,56	0,31	0,34	0,35	0,36	0,35	0,32	0,28	0,27	0,27	
	0,0625	0,32	0,29	0,28	0,29	0,30	0,31	0,34	0,30	0,29	0,29	0,27	0,28	
	0	0,32	0,29	0,28	0,57	0,31	0,30	0,35	0,30	0,27	0,29	0,28	0,66	

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 1, 2 y 4 µg/ml inhibió todo el crecimiento excepto el último pocillo donde no estuvieron presentes fármacos mostrando un efecto sinérgico de triple combinación.

- 5 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 8 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple combinación						Rifampicina							
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)
	4	0,33	0,30	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	8
	2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26
	1	0,31	0,29	0,28	0,28	0,29	0,29	0,30	0,30	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,28	0,30	0,32	0,31	0,32	0,31	0,30	0,27	0,27	0,28	0,28
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,33	0,35	0,33	0,31	0,29	0,28	0,28	0,28
	0,125	0,31	0,29	0,28	0,30	0,31	0,33	0,32	0,34	0,32	0,28	0,29	0,27	0,27
	0,0625	0,32	0,29	0,28	0,30	0,36	0,28	0,28	0,29	0,28	0,27	0,29	0,28	0,28
	0	0,32	0,29	0,28	0,28	0,29	0,23	0,29	0,29	0,31	0,28	0,28	0,28	0,28

- 10 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 16 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple combinación						Rifampicina							
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)
	4	0,32	0,29	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,26	0,27	16
	2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,26	0,27	0,26	0,26	0,26
	1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
Colistina	0,5	0,30	0,29	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28
	0,25	0,31	0,29	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28	0,28
	0,125	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
	0,0625	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,42	0,28	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28
	0	0,31	0,28	0,29	0,43	0,28	0,28	0,28	0,29	0,30	0,28	0,28	0,28	0,28

- 15 Cuando se aumentó HT0120663 a 8 µg/ml o por encima, Se observó una inhibición completa del crecimiento. Esto fue debido a la MIC de HT0120663 (8 µg/ml) que inhibió por sí misma el crecimiento bacteriano.

### Resumen y conclusiones

- 20 Estos datos muestran que la combinación de tres fármacos aumentó la potencia de cada fármaco debido a la reducción de la MIC. Se observó una inhibición completa cuando se añadió HT0120663 a 8 µg/ml o por encima.

Ejemplo 2: Efecto de sinergia *in vitro* de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra la *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 BAA2473 en fase logarítmica mediante el método del tablero.

- 25 **Objetivos**

Para evaluar el efecto de sinergia de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra la *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 BAA2473 en fase logarítmica mediante el método del tablero.

- 30 **Materiales y métodos**

1. Cepa bacteriana utilizada: NDM-1 BAA-2473TM, Se obtuvo la *Klebsiella pneumoniae* de la American Type Culture Collection.
2. Crecimiento de las bacterias: Se llevó a cabo el crecimiento en fase logarítmica de BA2473 de acuerdo con el Crecimiento de bacterias en fase logarítmica SOP R-005-00
3. Antibióticos y preparación. Se obtuvo RMP de Sigma y se disolvió en DMSO a la concentración madre de 10 mg/ml. Se obtuvo la colistina de Sigma (10 mg/ml). Se obtuvo HT0120663 de Sigma y se disolvió en DMSO para preparar una solución madre (10 mg/ml).

## ES 2 719 557 T3

4. Método del tablero - como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se ensayaron las (Colistina/rifampicina/HT0120663) mediante un método de tablero tridimensional donde se añadió HT0120663 a una única concentración de cada placa.

5 El cultivo durante la noche se diluyó con caldo nutriente (Oxoid) a  $10^5$  UFC/ml y se añadieron 280 µl de la suspensión del cultivo a cada pocillo para preparar el volumen final de 300 µl.

5. La incubación de los compuestos con la suspensión bacteriana se llevó a cabo durante 24 horas.

6. Se examinaron los efectos de la combinación calculando el índice de la concentración inhibidora fraccionada (FICI) de cada combinación, del siguiente modo: (MIC del fármaco A, ensayado en combinación)/(MIC del fármaco A, ensayado solo) + (MIC del fármaco B ensayado en combinación)/(MIC del fármaco B, ensayado solo). La interacción de la combinación se definió como mostrando sinergia si el FICI era  $<0,5$ , sin interacción si el FICI era  $>0,5$  pero  $<4,0$  y antagonismo si el FICI era  $>4,0$ .

### 15 Resultados

Combinación de rifampicina y colistina sin adición de HT0120663. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	µg/ml	Rifampicina												HT0120663
		1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,36	0,18	0,15	0,13	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0
	16	0,23	0,16	0,14	0,13	0,12	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
	8	0,19	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,12	
Colistina	4	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,39	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,46	
	1	0,17	0,14	0,14	0,14	0,11	0,09	0,23	0,30	0,28	0,42	0,43	0,61	
	0,5	0,17	0,15	0,29	0,41	0,40	0,45	0,51	0,46	0,49	0,55	0,52	0,68	
	0	0,18	0,40	0,43	0,65	0,70	0,73	0,73	0,73	0,74	0,59	0,66	0,72	

20 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 0,125 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos					Rifampicina								KT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,34	0,18	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,125
	16	0,21	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,16	
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,13	
Colistina	4	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,06	0,05	0,05	0,04	0,16	
	2	0,17	0,14	0,13	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,19	
	1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,13	0,22	0,23	0,22	0,24	0,31	
	0,5	0,17	0,15	0,17	0,22	0,26	0,24	0,29	0,32	0,24	0,24	0,30	0,34	
	0	0,18	0,28	0,28	0,42	0,44	0,41	0,36	0,38	0,37	0,36	0,39	0,43	

25 La adición de HT0120663 a 0,125 µg/ml en la combinación de rifampicina y colistina no mostró diferencia en la inhibición del crecimiento.

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 0,25 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

30

	Triple combinación de fármacos					Rifampicina								HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,33	0,18	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	
	16	0,22	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,09	0,25
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	
Colistina	4	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,13	
	1	0,16	0,15	0,14	0,13	0,10	0,18	0,19	0,15	0,12	0,14	0,17	0,28	
	0,5	0,17	0,15	0,17	0,17	0,17	0,16	0,20	0,15	0,15	0,17	0,15	0,23	
	0	0,18	0,26	0,23	0,34	0,31	0,28	0,32	0,34	C 33	0,33	0,31	0,38	

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina solo, la adición de HT0120663 a 0,25 µg/ml redujo 4 veces la MIC de la colistina.

35 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

ES 2 719 557 T3

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,37	0,22	0,17	0,16	0,13	0,10	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,5
	16	0,28	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
Colistina	4	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,08	
	1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,11	0,09	0,12	0,10	0,12	0,09	0,32	
	0,5	0,17	0,15	0,16	0,13	0,12	0,12	0,10	0,10	0,10	0,12	0,16	0,17	
	0	0,17	0,21	0,20	0,26	0,21	0,20	0,27	0,30	0,22	0,34	0,27	0,37	

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml redujo 8 veces la MIC de la colistina.

- 5 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 1 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,32	0,18	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	1
	16	0,21	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
Colistina	4	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	1	0,17	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,10	0,15	0,13	0,11	0,12	
	0,5	0,17	0,15	0,14	0,16	0,12	0,11	0,09	0,13	0,21	0,09	0,27	0,39	
	0	0,17	0,16	0,20	0,18	0,17	0,36	0,14	0,13	0,35	0,35	0,37	0,13	

- 10 En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 1 µg/ml aumentó el efecto de sinergia mediante la reducción de la MIC de rifampicina.

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 2 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

15

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,35	0,18	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	2
	16	0,23	0,16	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	
	8	0,19	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
Colistina	4	0,17	0,14	0,13	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,24	0,24	0,24	
	0,5	0,17	0,15	0,15	0,13	0,15	0,12	0,10	0,23	0,26	0,28	0,24	0,24	
	0	0,18	0,16	0,29	0,18	0,20	0,13	0,14	0,46	0,47	0,49	0,15	0,41	

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 2 µg/ml aumentó el efecto de sinergia mediante la reducción de la MIC de rifampicina.

- 20 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 4 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,36	0,19	0,15	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	4
	16	0,23	0,16	0,14	0,14	0,12	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	
	8	0,19	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	
Colistina	4	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
	2	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
	1	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,07	0,45	
	0,5	0,18	0,15	0,15	0,14	0,15	0,30	0,11	0,32	0,25	0,36	0,38	0,52	
	0	0,19	0,16	0,22	0,46	0,45	0,51	0,43	0,10	0,14	0,36	0,38	0,56	

## ES 2 719 557 T3

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 4 µg/ml aumentó el efecto de sinergia mediante la reducción de la MIC de rifampicina.

5 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 8 µg/ml. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,17	0,18	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	8
	16	0,17	0,16	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
	8	0,19	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	
Colistina	4	0,17	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
	2	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
	1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
	0,5	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,09	0,08	0,07	0,05	
	0	0,19	0,16	0,15	0,13	0,12	0,09	0,09	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	

10 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 16 µg/ml. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,34	0,19	0,14	0,14	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	16
	16	0,23	0,16	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	
	8	0,20	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
Colistina	4	0,18	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
	2	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	
	1	0,17	0,16	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
	0,5	0,18	0,16	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	
	0	0,18	0,16	0,16	0,15	0,12	0,09	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,06	

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 32 µg/ml. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	Triple combinación de fármacos						Rifampicina							HT0120663
	µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
	32	0,32	0,19	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	32,00
	16	0,23	0,16	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	
	8	0,19	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
Colistina	4	0,17	0,15	0,14	0,14	0,11	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
	2	0,18	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	
	1	0,17	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
	0,5	0,18	0,15	0,15	0,14	0,12	0,09	0,37	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
	0	0,18	0,16	0,16	0,14	0,12	0,09	0,50	0,07	0,06	0,05	0,05	0,06	

15 Cuando se aumentó HT0120663 a 8 µg/ml, se observó una inhibición completa del crecimiento. Esto fue debido a la MIC de HT0120663 (8 µg/ml) que inhibió por sí misma el crecimiento bacteriano.

### Resumen y conclusiones

20 Estos datos muestran que la combinación de tres fármacos aumentó la potencia de cada fármaco debido a la reducción de la MIC. Se observó una inhibición completa cuando se añadió HT0120663 a 8 µg/ml o por encima.

25 Ejemplo 3; Efecto de sinergia *in vitro* de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra *Escherichia coli* NDM-1 BAA2471 en fase logarítmica mediante el método del tablero tridimensional

### Objetivos

Para evaluar el efecto de sinergia de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) contra *E. coli* NDM-1 BAA2471 en fase logarítmica mediante el método del tablero.

30

### Materiales y métodos

## ES 2 719 557 T3

1. Cepa bacteriana utilizada: NDM-1 BAA-2471TM, de *E. coli* de la American Type Culture Collection.
2. Crecimiento de las bacterias: Se llevó a cabo el crecimiento en fase logarítmica de BA2471 de acuerdo con el Crecimiento de bacterias en fase logarítmica SOP R-005-00
3. Antibióticos y preparación.
- 5 Se obtuvo RMP de Sigma y se disolvió en DMSO a la concentración madre de 10 mg/ml.  
Se obtuvo la colistina de Sigma (10 mg/ml).  
Se obtuvo HT0120663 de Sigma y se disolvió en DMSO para preparar una solución madre (10 mg/ml).
4. Método del tablero - como se ha descrito en el Ejemplo 1.
- 10 Se ensayaron las combinaciones triples (Colistina/rifampicina/HT0120663) mediante un método de tablero tridimensional donde se añadió HT0120663 a una única concentración de cada placa a 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 µg/ml, respectivamente.

El cultivo durante la noche se diluyó con caldo nutriente (Oxoid) a  $10^5$  UFC/ml y se añadieron 280 µl de la suspensión del cultivo a cada pocillo para preparar el volumen final de 300 µl.

5. La incubación de los compuestos con la suspensión bacteriana se llevó a cabo durante 24 horas.
6. Se examinaron los efectos de la combinación calculando el índice de la concentración inhibidora fraccionada (FICI) de doble combinación, del siguiente modo: (MIC del fármaco A, ensayado en combinación)/(MIC del fármaco A, ensayado solo) + (MIC del fármaco B ensayado en combinación)/(MIC del fármaco B, ensayado solo). La interacción de la combinación se definió como mostrando sinergia si el FICI era <0,5, sin interacción si el FICI era > 0,5 pero <4,0 y antagonismo si el FICI era >4,0.

### Resultados

- 25 Combinación de rifampicina y colistina sin adición de HT0120663 contra *E. coli* NDM-1 2471. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	doble tratamiento						Rifampicina								HT0120663 (µg/ml)
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,34	0,32	0,31	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0	
2	0,33	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	
1	0,31	0,30	0,28	0,27	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,28	0,28	0,27	0,27	0,76	0,86	0,90	0,89	0,85	0,72		
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,28	0,92	0,93	0,98	0,97	0,98	0,94	0,95	0,80		
	0,125	0,32	0,29	0,28	0,91	0,97	0,92	0,93	1,02	0,93	0,93	0,96	0,87		
	0,0625	0,31	0,38	0,62	0,82	0,84	0,86	0,85	0,85	0,92	0,87	0,98	0,80		
	0	0,32	0,37	0,56	0,73	0,78	0,75	0,77	0,75	0,81	0,78	0,78	0,80		

- 30 La MIC de rifampicina era de 4 µg/ml. En combinación con 0,5 µg/ml de colistina, La MIC se redujo a 0,25 µg/ml. La MIC de la colistina era de 1 µg/ml. En combinación con 2 µg/ml de rifampicina, La MIC se redujo a 0,125 µg/ml. El índice de FIC es 0,188.

- 35 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml contra *E. coli* NDM-1 2471. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple tratamiento						Rifampicina								HT0120663 (µg/ml)
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0		
4	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,27	0,5	
2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,27		
1	0,32	0,29	0,28	0,30	0,31	0,31	0,31	0,27	0,30	0,28	0,27	0,28	0,27		
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,27	0,34	0,35	0,39	0,44	0,43		
	0,25	0,32	0,29	0,30	0,33	0,34	0,46	0,41	0,52	0,58	0,47	0,59	0,53		
	0,125	0,32	0,29	0,29	0,33	0,43	0,56	0,49	0,57	0,61	0,56	0,59	0,53		
	0,0625	0,32	0,29	0,28	0,30	0,49	0,56	0,48	0,57	0,61	0,56	0,59	0,50		
	0	0,32	0,31	0,34	0,31	0,52	0,58	0,48	0,60	0,61	0,56	0,59	0,50		

- 40 La adición de HT0120663 a 0,5 µg/ml en la combinación de rifampicina y colistina redujo la MIC de rifampicina de 4 a 1 µg/ml lo que aumento la inhibición del crecimiento.

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 1 µg/ml contra *E. coli* NDM-1 2471. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

ES 2 719 557 T3

	triple tratamiento					Rifampicina									
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)	
	4	0,31	0,29	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	1	
	2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27		
	1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,27	0,31	0,28		
Colistina	05	0,31	0,29	0,28	0,30	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,38	0,31	0,28		
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,30	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,36	0,31	0,28		
	0,125	0,31	0,29	0,28	0,30	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,37	0,31	0,28		
	0,0625	0,31	0,29	0,30	0,30	0,27	0,31	0,31	0,31	0,27	0,37	0,31	0,50		
	0	0,31	0,29	0,30	0,30	0,27	0,37	0,31	0,36	0,36	0,36	0,31	0,53		

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 2 µg/ml contra *E. coli* NDM-1 2471. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

5

	triple tratamiento					Rifampicina									
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)	
	4	0,32	0,29	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	2	
	2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,24		
	1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,29	0,29	0,29	0,29	0,27	0,27	0,27	0,26		
Colistina	05	0,31	0,29	0,28	0,31	0,33	0,29	0,29	0,29	0,27	0,28	0,27	0,30		
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,27	0,33	0,29	0,29	0,29	0,27	0,28	0,28	0,42		
	0,125	0,31	0,29	0,28	0,29	0,33	0,29	0,29	0,29	0,27	0,28	0,28	0,28		
	0,0625	0,31	0,29	0,28	0,28	0,33	0,29	0,29	0,29	0,27	0,28	0,28	0,56		
	0	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,29	0,33	0,33	0,27	0,28	0,29	0,53		

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 1 y 2 µg/ml inhibió todo el crecimiento excepto los últimos dos pocillos donde mostrando un efecto sinérgico de triple combinación.

10 Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 4 µg/ml contra *E. coli* NDM-1 2471. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple tratamiento					Rifampicina									
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)	
	4	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	4	
	2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,27	0,27	0,27	0,26		
	1	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,32	0,32	0,31	0,28	0,27	0,27	0,27		
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,29	0,31	0,33	0,34	0,32	0,32	0,30	0,28	0,27	0,27		
	0,25	0,31	0,29	0,30	0,32	0,36	0,36	0,32	0,36	0,30	0,28	0,27	0,27		
	0,125	0,31	0,29	0,30	0,31	0,34	0,35	0,32	0,35	0,30	0,28	0,27	0,27		
	0,0625	0,32	0,29	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,30	0,30	0,28	0,27	0,28		
	0	0,32	0,29	0,28	0,29	0,31	0,30	0,32	0,30	0,30	0,28	0,27	0,69		

En comparación con la combinación de rifampicina y colistina, la adición de HT0120663 a 4 µg/ml inhibió todo el crecimiento excepto el último pocillo donde no estuvieron presentes fármacos mostrando un efecto sinérgico de triple combinación.

15

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 8 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple tratamiento					Rifampicina									
	µg/ml	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,015625	0,007813	0	HT0120663 (µg/ml)	
	4	0,33	0,30	0,29	0,28	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	8	
	2	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26		
	1	0,31	0,29	0,28	0,28	0,29	0,29	0,30	0,30	0,27	0,27	0,27	0,27		
Colistina	0,5	0,31	0,29	0,28	0,30	0,32	0,31	0,32	0,31	0,30	0,27	0,27	0,28		
	0,25	0,31	0,29	0,28	0,30	0,33	0,33	0,35	0,31	0,31	0,29	0,27	0,28		
	0,125	0,31	0,29	0,28	0,30	0,31	0,33	0,32	0,31	0,31	0,28	0,27	0,28		
	0,0625	0,32	0,29	0,28	0,30	0,36	0,28	0,28	0,29	0,28	0,28	0,27	0,28		
	0	0,32	0,29	0,28	0,28	0,29	0,28	0,29	0,29	0,31	0,28	0,28	0,28		

20

## ES 2 719 557 T3

Combinación de rifampicina y colistina con la adición de HT0120663 a 16 µg/ml. Los pocillos marcados en amarillo demuestran crecimiento. Los pocillos claros indican inhibición del crecimiento o sin crecimiento.

	triple tratamiento		8	4	2	1	0,5	Rifampicina		0,0625	0,03125	0015625	0007813	0	HT0120663 (µg/ml)
	µg/ml														
	4	0,32	0,29	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,26	0,27	16
	2	0,32	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26	0,26	0,27	0,26	0,26	
	1	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	
Colistina	0,5	0,30	0,29	0,27	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	
	0,25	0,31	0,29	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28	
	0,1.25	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,28	0,27	0,27	0,28	0,28	
	0,0,625	0,31	0,29	0,28	0,27	0,27	0,27	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	0,28	
	0	0,31	0,28	0,29	0,43	0,28	0,28	0,28	0,29	0,30	0,28	0,28	0,28	0,28	

- 5 Cuando se aumentó HT0120663 a 8 µg/ml o por encima, se observó una inhibición completa del crecimiento. Esto fue debido a la MIC de HT0120663 (8 µg/ml) que inhibió por sí misma el crecimiento bacteriano.

### Resumen y conclusiones

- 10 Estos datos muestran que la combinación de tres fármacos aumentó la potencia de cada fármaco debido a la reducción de la MIC. Se observó una inhibición completa cuando se añadió HT0120663 a 8 µg/ml o por encima.

### Ejemplo 4

- 15 Ejemplo 4,1: Colistina y rifampicina contra *Klebsiella pneumoniae*NDM-1

1.1 Tablero que muestra sinergia entre colistina y rifampicina contra *Klebsiella pneumoniae*NDM-1

		Rifampicina												Índice FIC 0,0175781
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	
Colistina	128	0,15	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
	64	0,13	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,16	0,26	
	32	0,13	0,12	0,10	0,08	0,09	0,06	0,05	0,05	0,04	0,08	0,21	0,34	
	16	0,12	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,10	0,13	0,32	
	8	0,12	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,24	0,28	0,17	
	4	0,12	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,14	0,26	0,27	0,27	0,32	
	2	0,13	0,21	0,20	0,26	0,22	0,24	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,48	
	0	0,56	0,54	0,53	0,52	0,49	0,50	0,52	0,51	0,51	0,51	0,50	0,57	

- 20 1.2 La Figura 1 contiene las curvas de destrucción en el tiempo (a), (b) y (c) muestran el efecto de la combinación de colistina y rifampicina contra *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 en comparación colistina y rifampicina únicamente.

- 25 Ejemplo 4,2: Colistina y rifampicina contra *Escherichia coli*NDM-1

2.1 Tablero que muestra la sinergia entre colistina y rifampicina contra *E. coli*NDM-1

		Rifampicina												Índice FIC 0,0644531
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0	
Colistina	32	0,60	0,50	0,45	0,42	0,41	0,40	0,40	0,39	0,39	0,40	0,39	0,38	
	16	0,58	0,50	0,45	0,43	0,41	0,41	0,40	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40	
	8	0,59	0,51	0,45	0,43	0,42	0,41	0,41	0,41	0,40	0,42	0,40	1,26	
	4	0,59	0,51	0,45	0,43	0,42	0,42	0,41	0,41	0,40	0,40	0,40	1,27	
	2	0,60	0,50	0,46	0,44	0,43	0,59	0,41	0,41	0,41	0,41	0,92	1,35	
	1	0,59	0,52	0,47	0,44	0,43	0,42	0,42	1,35	0,41	1,42	1,33	1,47	
	0	0,59	0,52	0,47	0,44	0,43	0,42	0,42	1,35	0,41	1,42	1,33	1,47	

## ES 2 719 557 T3

0,5	0,60	0,50	1,29	1,33	1,31	1,29	1,32	1,29	1,32	1,39	1,45	1,57
0	0,71	0,82	0,88	1,28	1,40	1,46	1,40	1,45	1,51	1,48	1,48	1,57

2.2. La Figura 2 contiene las curvas de destrucción en el tiempo (a), (b), (b) y (c) muestran el efecto de la combinación de colistina y rifampicina contra *E. coli* NDM-1 en comparación con colistina y rifampicina únicamente.

5 Ejemplo 4.3: Triple combinación (Rifampicina + Colistina + HT0120663 (zidovudina))

HT0130001 = Rifampicina

HT0130002 = Colistina

HT0120663 = Zidovudina

10 3. 1. Tablero que muestra la sinergia entre colistina, rifampicina y HT0120663 contra *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 como se describe en el Ejemplo 1

		HT0130001													
		$\mu\text{g/ml}$	1024	612	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	HT01206630
HT0130002	32	0,19	0,18	0,15	0,13	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
	16	0,18	0,16	0,14	0,13	0,12	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
	8	0,19	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,12	
	4	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,39	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,46	
	1	0,17	0,14	0,14	0,14	0,11	0,09	0,23	0,30	0,28	0,42	0,43	0,61		
	0,5	0,17	0,15	0,29	0,41	0,40	0,45	0,51	0,46	0,49	0,55	0,52	0,68		
	0	0,18	0,40	0,43	0,65	0,70	0,73	0,73	0,73	0,74	0,59	0,66	0,72		

Triple combinación de fármacos

		HT0130001													
		$\mu\text{g/ml}$	1024	512	256	128	64	32	18	8	4	2	1	9	HT0120663 0,25
HT0130002	32	0,17	0,18	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	
	16	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,09	
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05		
	4	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05		
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,13		
	21	0,16	0,15	0,14	0,13	0,10	0,18	0,19	0,15	0,12	0,14	0,17	0,28		
	0,5	0,17	0,15	0,17	0,17	0,17	0,16	0,20	0,15	0,15	0,17	0,15	0,23		
	0	0,18	0,26	0,23	0,34	0,31	0,28	0,32	0,34	0,33	0,33	0,31	0,38		

15

Triple combinación de fármacos

		HT0130001													
		$\mu\text{g/ml}$	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	HT0120663 0,5
HT0130002	32	0,17	0,22	0,17	0,16	0,13	0,10	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
	16	0,17	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	
	8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04	
	4	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	
	2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,08	
	1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,11	0,09	0,12	0,10	0,12	0,09	0,32		
	0,6	0,17	0,15	0,16	0,13	0,12	0,12	0,10	0,10	0,10	0,12	0,16	0,17		
	0	0,17	0,21	0,20	0,26	0,21	0,20	0,27	0,30	0,22	0,34	0,27	0,37		

# ES 2 719 557 T3

Triple combinación de fármacos		HT0130001										HT0120663
µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	2	1	0		
32	0,32	0,18	0,14	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	1
16	0,21	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	
8	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	
4	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	
2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	
1	0,17	0,16	0,14	0,13	0,11	0,08	0,06	0,13	0,11	0,12		
0,6	0,17	0,15	0,14	0,16	0,12	0,11	0,09	0,09	0,27	0,39		
0	0,17	0,16	0,20	0,18	0,17	0,36	0,14	0,35	0,37	0,13		

Triple combinación de fármacos		HT0130001										HT0120663	
µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
32	0,35	0,18	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	2
16	0,23	0,16	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	
8	0,19	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
4	0,17	0,14	0,13	0,13	0,11	0,08	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
2	0,17	0,14	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,24	0,24	0,24	
0,5	0,17	0,15	0,15	0,13	0,15	0,12	0,10	0,23	0,26	0,28	0,24	0,24	
0	0,18	0,16	0,29	0,18	0,20	0,13	0,14	0,46	0,47	0,49	0,15	0,41	

Triple combinación de fármacos		HT0130001										HT0120663	
µg/ml	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
32	0,36	0,19	0,15	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	4
16	0,23	0,16	0,14	0,14	0,12	0,08	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	
8	0,19	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	
4	0,18	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
2	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	
1	0,18	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,07	0,45	
0,5	0,18	0,15	0,15	0,14	0,15	0,30	0,11	0,32	0,25	0,36	0,38	0,52	
0	0,19	0,16	0,22	0,46	0,45	0,51	0,43	0,10	0,14	0,36	0,38	0,56	

Triple combinación de fármacos		HT0130001										HT0120663	
µg/ml	1024	512	236	128	64	32	16	8	4	2	1	0	
32	0,17	0,18	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	8
16	0,17	0,16	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	
8	0,19	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	
4	0,17	0,15	0,14	0,14	0,12	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	
2	0,17	0,15	0,14	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
1	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	
0,5	0,17	0,15	0,14	0,13	0,12	0,09	0,07	0,06	0,09	0,08	0,07	0,05	
0	0,19	0,16	0,15	0,13	0,12	0,09	0,09	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07	

5

## Ejemplo 5

10 Habiendo demostrado el efecto de añadir zidovudina a una combinación de colistina y rifampicina, los siguientes ejemplos demuestran la sinergia de la última combinación frente a una variedad de bacterias resistentes a fármacos. Sobre la base de los Ejemplos 1-4, la adición de zidovudina potenciaría de nuevo la doble combinación de colistina y rifampicina.

15 Experimento 5,1: Efecto de sinergia *in vitro* de colistina y rifampicina frente a las bacterias Gram negativas en fase logarítmica mediante el método del tablero

15

### Objetivos

20 Para ensayar el efecto de sinergia de colistina y rifampicina frente a bacterias Gram negativas en fase logarítmica incluyendo *Escherichia coli* y el grupo Klebsiella-Enterobacter-Serratia (grupo KES) mediante el método del tablero.

20

### Materiales y Métodos

1. Cepa bacteriana utilizada: Aislados Gram negativos resistentes a antibióticos clínicos procedentes del St George's Hospital. Se obtuvieron las cepas NDM-1 de la American Type Culture Collection *Enterobacter cloacae* BAA-2468TM. *Escherichia coli* BAA-2469TM. BAA-2470TM, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*. BAA-2471TM, *Escherichia coli*. BAA- 2472TM, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*. BAA-2473TM, *Klebsiella pneumoniae* y NCTC 13443 procedente de la National Collection of Type Cultures, *Klebsiella pneumoniae*

2. Crecimiento de las bacterias: Se llevó a cabo el crecimiento en fase logarítmica de BA2473 de acuerdo con el Crecimiento de bacterias en fase logarítmica SOP R-005-00

3. Antibióticos y preparación.

i. Se obtuvo RMP de Sigma y se disolvió en DMSO a la concentración madre de 10 mg/ml.

ii. Se obtuvo la colistina de Sigma (10 mg/ml).

Se incubó el cultivo bacteriano en fase logarítmica con rifampicina y colistina en combinaciones usando el método del tablero. Se diluyó el cultivo durante la noche con caldo nutriente (Oxoid) a  $10^5$  UFC/ml y 280  $\mu$ l del cultivo se añadieron a cada pocillo para preparar el volumen final de 300  $\mu$ l.

4. La incubación de los compuestos con la suspensión bacteriana se llevó a cabo durante 24 horas.

5. Se examinaron los efectos de la combinación calculando el índice de la concentración inhibidora fraccionada (FICI) de cada combinación, del siguiente modo: (MIC del fármaco A, ensayado en combinación)/(MIC del fármaco A, ensayado solo) + (MIC del fármaco B ensayado en combinación)/(MIC del fármaco B, ensayado solo). La interacción de la combinación se definió como mostrando sinergia si el FICI era  $<0,5$ , sin interacción si el FICI era  $>0,5$  pero  $<4,0$  y antagonismo si el FICI era  $>4,0$ .

#### Resultados

Cepas bacterianas	Número de cepas	Índice FIC			% de cepas (efecto sinérgico)
		$<0,5$	$>0,5 <2$	$>2$	
<i>E. coli</i>	56	55	1	0	98,2
<i>Klebsiella-Enterobacter-Serratia</i> (grupo KES)	32	31	1	0	96,9

#### Resumen y conclusiones

1. La combinación sinérgica de colistina y rifampicina mostró un 98,2 % de *E. coli* con índice FIC menor de 0,5.

2. La combinación sinérgica de colistina y rifampicina mostró en 96,9 % de las bacterias en el grupo KES con un índice FIC menor de 0,5.

3. Las actividades sinérgicas de colistina y rifampicina mostraron en todas cepas NDM-1.

Experimento 5,2: Efecto de sinergia *in vitro* de colistina y rifampicina frente a las cepas NDM-1 en fase logarítmica mediante el método del tablero

#### Objetivos

Para ensayar el efecto de sinergia de colistina y rifampicina frente a cepas NDM-1 en fase logarítmica mediante el método del tablero.

#### Materiales y Métodos

1. Cepa bacteriana utilizada: Se obtuvieron las cepas NDM-1 de la American Type Culture Collection *Enterobacter cloacae* BAA-2468TM. *Escherichia coli* BAA-2469TM. BAA-2470TM, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*. BAA-2471TM, *Escherichia coli*. BAA-2472TM, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*. BAA-2473TM, *Klebsiella pneumoniae* y NCTC 13443 procedente de la National Collection of Type Cultures, *Klebsiella pneumoniae*

2. Crecimiento de las bacterias: Se llevó a cabo el crecimiento en fase logarítmica de BA2473 de acuerdo con el Crecimiento de bacterias en fase logarítmica SOP R-005-00

3. Antibióticos y preparación.

i. Se obtuvo RMP de Sigma y se disolvió en DMSO a la concentración madre de 10 mg/ml.

ii. Se obtuvo la colistina de Sigma (10 mg/ml).

Se incubó el cultivo bacteriano en fase logarítmica con rifampicina y colistina en combinaciones usando el método del tablero. Se diluyó el cultivo durante la noche con caldo nutriente (Oxoid) a  $10^5$  UFC/ml y 280  $\mu$ l del cultivo se añadieron a cada pocillo para preparar el volumen final de 300  $\mu$ l.

4. La incubación de los compuestos con la suspensión bacteriana se llevó a cabo durante 24 horas.

5. Se examinaron los efectos de la combinación calculando el índice de la concentración inhibidora fraccionada (FICI) de cada combinación, del siguiente modo: (MIC del fármaco A, ensayado en combinación)/(MIC del fármaco

## ES 2 719 557 T3

A, ensayado solo) + (MIC del fármaco B ensayado en combinación)/(MIC del fármaco B, ensayado solo). La interacción de la combinación se definió como mostrando sinergia si el FICI era <0,5, sin interacción si el FICI era > 0,5 pero <4,0 y antagonismo si el FICI era >4,0.

### 5 Resultados

NCTC14334	NMD-1						RMP								Índice FIC
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25			
	128	0,15	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,017578
	64	0,13	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,05	0,16	0,26		
	32	0,13	0,12	0,10	0,08	0,09	0,06	0,05	0,05	0,04	0,08	0,21	0,34		
colistina	16	0,12	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,10	0,13	0,32		
	8	0,12	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,24	0,28	0,17		
	4	0,12	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,14	0,26	0,27	0,27	0,32		
	2	0,13	0,21	0,20	0,26	0,22	0,24	0,23	0,23	0,24	0,25	0,26	0,48		
	0	0,56	0,54	0,53	0,52	0,49	0,50	0,52	0,51	0,51	0,51	0,50	0,57		

BAA2468							RMP								Índice FIC
		32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125			
	32	0,60	0,50	0,45	0,42	0,41	0,40	0,40	0,39	0,39	0,40	0,39	0,38	0,0644531	
	16	0,58	0,50	0,45	0,43	0,41	0,41	0,40	0,40	0,40	0,41	0,40	0,40		
	8	0,59	0,51	0,45	0,43	0,42	0,41	0,41	0,41	0,40	0,42	0,40	1,26		
	4	0,59	0,51	0,45	0,43	0,42	0,42	0,41	0,41	0,40	0,40	0,40	1,27		
colistina	2	0,60	0,50	0,46	0,44	0,43	0,59	0,41	0,41	0,41	0,41	0,92	1,35		
	1	0,59	0,52	0,47	0,44	0,43	0,42	0,42	1,35	0,41	1,42	1,33	1,47		
	0,5	0,60	0,50	1,29	1,33	1,31	1,29	1,32	1,29	1,32	1,39	1,45	1,57		
	0	0,71	0,82	0,88	1,28	1,40	1,46	1,40	1,45	1,51	1,48	1,48	1,57		

BAA2470							RMP								Índice FIC
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0		
	16	0,13	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,39	0,05	0,05	0,05	0,04	0,0703125	
	8	0,12	0,11	0,09	0,08	0,07	0,14	0,35	0,29	0,33	0,30	0,05	0,05		
	4	0,12	0,11	0,09	0,08	0,07	0,13	0,05	0,05	0,35	0,40	0,05	0,47		
Colistina	2	0,13	0,11	0,10	0,22	0,07	0,16	0,05	0,35	0,37	0,10	0,37	0,55		
	1	0,14	0,30	0,29	0,08	0,07	0,06	0,39	0,42	0,38	0,37	0,48	0,64		
	0,5	0,16	0,15	0,55	0,39	0,52	0,55	0,49	0,85	0,47	0,54	0,55	0,68		
	0,25	0,55	0,53	0,56	0,61	0,60	0,60	0,62	0,62	0,65	0,73	0,70	0,71		
	0	0,65	0,68	0,72	0,74	0,70	0,72	0,65	0,67	0,64	0,61	0,60	0,74		

BAA2472							RMP								Índice FTC
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5				
	16	0,12	0,10	0,09	0,08	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,34	0,04	0,0390625	
	8	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,26	0,04		
Colistina	4	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,36	0,33	0,38	0,37		
	2	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,10	0,37	0,45		
	1	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,42	0,34	0,41	0,57		
	0,5	0,12	0,12	0,10	0,37	0,45	0,37	0,37	0,41	0,43	0,41	0,55	0,61		
	0,25	0,14	0,40	0,41	0,39	0,40	0,39	0,40	0,45	0,43	0,42	0,47	0,63		
	0	0,52	0,58	0,53	0,51	0,49	0,47	0,42	0,48	0,49	0,57	0,54	0,63		

BAA2473							RMP								Índice FTC
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5				
	64	0,15	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,24	0,04	0,04	0,04	0,0664063	
	32	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04		
	16	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04		
Colistina	8	0,12	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,33	0,36	0,04		
	4	0,12	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,35	0,34	0,39		
	2	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,06	0,19	0,23	0,43		
	1	0,15	0,13	0,11	0,08	0,07	0,06	0,36	0,05	0,37	0,40	0,41	0,63		
	0	0,65	0,65	0,66	0,66	0,61	0,62	0,61	0,62	0,60	0,64	0,57	0,74		

NCTC 13443							RMP								
		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0	Índice FIC	
	64	0,17	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,10	0,0166016	
	32	0,14	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,23		
	16	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,23	0,35	0,04		
Colistina	8	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,30	0,33	0,34	0,04	0,29		
	4	0,13	0,11	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,34	0,34	0,29	0,34	0,29		
	2	0,13	0,12	0,17	0,08	0,07	0,06	0,24	0,17	0,34	0,35	0,36	0,53		
	1	0,14	0,13	0,11	0,36	0,34	0,36	0,34	0,35	0,34	0,27	0,37	0,58		
	0	0,75	0,62	0,58	0,61	0,58	0,56	0,55	0,55	0,57	0,58	0,58	0,69		

Resumen y conclusiones

5 Colistina en combinación con rifampicina mostró un índice FIC menor de 0,5 para las hebras NDM-1 BAA2468, BAA2469, BAA2470, BAA2471, BAA2472, BAA2473 y NCTC13443 que muestran una actividad sinérgica significativa.

Ejemplo 6: Efecto de sinergia *in vivo* de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) frente a *E. coli* NDM-1 en modelo 180314 de infección peritoneal de ratón

Objetivos

Para investigar la actividad de rifampicina, colistina y HT0120663 (zidovudina) frente a *E. coli* NDM-1 en modelo de infección peritoneal de ratón.

Materiales y Métodos

1. Ratones utilizados: se obtuvieron ratones hembra con una Región de Control de la Impresión (ICR) con una edad de 6 a 8 semanas de Harlan UK.

2. Cultivo bacteriano utilizado: Se obtuvo *E. coli* NDM-1 BAA2469 de la American Type Culture Collection.

3. Preparación del fármaco:

Se obtuvo una solución de HT0120663 (zidovudina) de Pharmacy a la concentración de 10 mg/ml. La colistina usada fue Colomycin® (Forest Laboratories UK Ltd) que se disolvió en agua a 20 mg/ml. La rifampicina usada fue Rifadin® (Sanofi-Aventis) 60 mg/ml.

4. Modelo de infección peritoneal de ratón:

El cultivo durante la noche de *E. coli* NDM-1 BAA2469 (200 µl) se inyectó en las cavidades peritoneales de los ratones.

5. Administración del fármaco:

1,5 horas después de la inyección, se ensayó la triple combinación (colistina/rifampicina/HT0120663) mediante la administración intravenosa de rifampicina a 10 mg/kg, colistina a 20 mg/kg y/o HT0120663 a 5 mg/kg individualmente o en combinación a los ratones infectados. Las combinaciones de tratamiento se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

		mg/kg		
		Colistina	Rifampicina	HT0120663
(i)	Colistina	20	0	0
(ii)	Rifampicina	10	0	0
(iii)	HT0120663	0	0	5
(iv)	Colistina + Rifampicina	20	10	0
(v)	Colistina + Rifampicina + HT0120663	20	10	5
(vi)	Control	0	0	0

6. Recuento de unidades formadoras de colonias en el órgano:

A las 0 horas, 2 horas y 6 horas tras la administración de los tratamientos (i) a (vi) anteriores, se inyectó 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en el peritoneo de los ratones seguido por un masaje suave del abdomen. A continuación se muestreó aseptícamente el fluido peritoneal. Se diluyó el fluido muestreado y se llevaron a cabo los recuentos de UFC a fin de determinar el efecto de la triple combinación (colistina/rifampicina/HT0120663).

En la Figura 3 se muestran los resultados.

Resultados

La Figura 3 contiene un gráfico del log de UFC/ml de cada tratamiento (i) a (vi). Se ensayó cada tratamiento a las 0 horas (barra de la izquierda), 2 horas (barra intermedia) y 6 horas (barra de la derecha) tras la administración del tratamiento respectivo.

Resumen y conclusiones

1. La administración de rifampicina, colistina o HT0120663 solos no mostró actividad *in vivo* contra *E. coli*/NDM-1.
2. A las 2 horas después del tratamiento, no hubo diferencias significativas entre rifampicina, colistina o HT0120663 y las combinaciones.
3. A las 6 horas después del tratamiento, la combinación de rifampicina y colistina (RMP/Col) destruyó 4,5 log más de bacterias que de fármacos individuales.
4. A las 6 horas después del tratamiento, la triple combinación de rifampicina/colistina/HT0120663 (RMP/Col/663) destruyó 4,5 log más de bacterias que rifampicina o colistina individualmente y 3 log más que HT0120663. La triple combinación destruyó también más bacterias que la doble combinación de RMP/Col.

Ejemplo 7: Efecto de sinergia *in vivo* de la colistina, rifampicina y HT0120663 (zidovudina) frente a *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 en modelo 180314 de infección peritoneal de ratón

Objetivos

Para investigar la actividad de rifampicina, colistina y HT0120663 (zidovudina) frente a *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 en modelo de infección peritoneal de ratón.

Materiales y Métodos

1. Ratones utilizados: se obtuvieron ratones hembra ICR con una edad de 6 a 8 semanas de Harlan UK.
2. Cepas bacterianas utilizadas: *K. pneumoniae* NDM-1 BAA2470 obtenida de la American Culture Collection.
3. Preparación del fármaco:

Se obtuvo una solución de HT0120663 de Pharmacy a la concentración de 10 mg/ml.  
 La colistina usada fue Colomycin® (Forest Laboratories UK Ltd) que se disolvió en agua a 20 mg/ml.  
 La rifampicina usada fue Rifadin® (Sanofi-Aventis) 60 mg/ml.

4. Modelo de infección peritoneal de ratón: El cultivo durante la noche de *K. pneumoniae* NDM-1 BAA2470 (200 µl) se inyectó en las cavidades peritoneales de los ratones.

5. Administración del fármaco

1,5 horas después de la inyección, se ensayó la triple combinación (colistina/rifampicina/HT0120663) mediante la administración intravenosa de rifampicina a 10 mg/kg, colistina a 20 mg/kg y/o HT0120663 a 5 mg/kg individualmente o en combinación a los ratones infectados como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

		mg/kg		
		Colistina	Rifampicina	HT0120663
(i)	Colistina	20	0	0
(ii)	Rifampicina	10	0	0
(iii)	HT0120663	0	0	5
(iv)	Colistina + Rifampicina	20	10	0
(v)	Colistina + Rifampicina + HT0120663	20	10	5
(vi)	Control	0	0	0

6. Recuento de unidades formadoras de colonias en el órgano:

A las 0 horas, 2 horas y 6 horas después de la administración de los tratamientos (i) a (vi) anteriores, se inyectó 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en el peritoneo de los ratones seguido por un masaje suave del abdomen. A continuación se muestreó asépticamente el fluido peritoneal. Se diluyó el fluido muestreado y se llevaron a cabo los recuentos de UFC a fin de determinar el efecto de la triple combinación (colistina/rifampicina/HT0120663).

En la Figura 4 se muestran los resultados.

Resultados

La Figura 4 contiene un gráfico del log de UFC/ml de cada tratamiento (i) a (vi) a las 0 horas, (barra de la izquierda), 2 horas (barra intermedia) y 6 horas (barra de la derecha) tras la administración del tratamiento respectivo.

5

Resumen y conclusiones

1. La administración de rifampicina, colistina o HT0120663 solos no mostró actividad *in vivo* contra *K. pneumoniae*NDM-1.

10

2. A las 2 horas después del tratamiento, no hubo diferencias significativas entre la combinación de colistina y rifampicina o colistina y HT0120663, individualmente o en combinación. Sin embargo, la triple combinación (rifampicina/colistina/HT0120663) redujo 1 log de inóculo inicial.

3. A las 6 horas después del tratamiento, la combinación de rifampicina y colistina destruyó 3,1 log más de bacterias que los fármacos individuales.

15

4. A las 6 horas después del tratamiento, la combinación de colistina y HT0120663 destruyó 4,1 log más de bacterias que los fármacos individuales.

5. A las 6 horas después del tratamiento, la triple combinación de rifampicina/colistina/HT0120663 destruyó 4,6 log más de bacterias que rifampicina, colistina o HT0120663 individualmente y también más bacterias que las dobles combinaciones de rifampicina/colistina y colistina/HT0120663.

20

Ante el reto de mejorar la terapia antimicrobiana en vista del aumento de las cepas resistentes a multifármacos, los Ejemplos demuestran un efecto significativo de añadir zidovudina a un régimen terapéutico consistente en colistina y antibióticos antituberculosis tales como rifampicina o rifapentina o rifabutina. Por primera vez, la adición de zidovudina ha mostrado tener un efecto sinérgico en este régimen. Esta triple combinación puede por tanto ofrecer una mejora significativa en el tratamiento de las infecciones antimicrobianas que surgen de una gama de bacterias además de aquellas utilizadas en los Ejemplos.

25

## REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende zidovudina, una polimixina seleccionada entre colistina o polimixina B, un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina, y opcionalmente piperina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana.
2. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el uso es para la destrucción de microorganismos clínicamente latentes asociados con una infección microbiana.
3. La combinación para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en la que la combinación comprende zidovudina, colistina y rifampicina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.
4. La combinación para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende piperina o una sal farmacéuticamente de la misma.
5. La combinación para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior en la que la infección microbiana está producida por *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacteria* o *Klebsiella*.
6. La combinación para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la infección está producida por *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* o *Klebsiella*.
7. La combinación para el uso de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en la que la infección está producida por una cepa resistente a fármacos.
8. La combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la infección está producida por una cepa resistente a carbapenemasa o una cepa de "β-lactamasa de amplio espectro" (ESPL), tal como la *Klebs. Pneumoniae* resistente a la metalo-beta-lactamasa-1 de Nueva Delhi (NDM-1).
9. La combinación para el uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que el uso es para el tratamiento de la tuberculosis, ántrax, abscesos, acné común, actinomicosis, asma, disentería bacilar, conjuntivitis bacteriana, queratitis bacteriana, vaginosis bacteriana, botulismo, úlcera de Buruli, infecciones óseas y articulares, bronquitis (aguda o crónica), brucelosis, heridas por quemaduras, fiebre por arañazo de gato, celulitis, chancroide, colangitis, colecistitis, difteria cutánea, fibrosis quística, cistitis, panbronquiolitis difusa, difteria, caries dental, enfermedades del tracto respiratorio superior, eczema, empiema, endocarditis, endometritis, fiebre entérica, enteritis, epididimitis, epiglotitis, erisipela, erisipela, erisipeloide, eritrasma, infecciones oculares, forúnculos, vaginitis por Gardnerella, infecciones gastrointestinales (gastroenteritis), infecciones genitales, gingivitis, gonorrea, granuloma inguinal, fiebre de Haverhill, quemaduras infectadas, infecciones tras operaciones dentales, infecciones en la región oral, infecciones asociadas con prótesis, abscesos intraabdominales, enfermedad del legionario, lepra, leptospirosis, listeriosis, abscesos en el hígado, enfermedad de Lyme, linfogranuloma venéreo, mastitis, mastoiditis, meningitis e infecciones del sistema nervioso, micetoma, nocardiosis, uretritis no específica, oftalmia, osteomielitis, otitis, orquitis, pancreatitis, paroniquia, pelviperitonitis, peritonitis, peritonitis con apendicitis, faringitis, flemones, enfermedad azul, peste, derrame pleural, neumonía, infecciones de heridas tras cirugías, gangrena gaseosa postoperatoria, prostatitis, colitis pseudomembranosa, psitacosis, enfisema pulmonar, pielonefritis, pioderma, fiebre Q, fiebre por mordedura de rata, reticulosis, envenenamiento por ricina, enfermedad de Ritter, salmonelosis, salpingitis, artritis séptica, infecciones sépticas, septicemia, sinusitis, infecciones de la piel, sífilis, infecciones sistémicas, tonsilitis, síndrome de choque tóxico, tracoma, tularemia, tifoideo, tífus, uretritis, infecciones de heridas, pián, aspergilosis, candidiasis, criptococosis, favo, histoplasmosis, interatómico, mucólticos, tiña, monoatómicos, pitiriasis versacuerpos, tiña y estequiométricos; o infecciones con MASA, MRSA, *Staph. epidermidis*, *Strept. agalactiae*, *Strept. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebs. pneumoniae*, *Klebs. oxytoca*, *Pr. mirabilis*, *Pr. rettgeri*, *Pr. vulgaris*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*.
10. Un producto que comprende zidovudina en combinación con; una polimixina seleccionada entre colistina y polimixina B; un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina; y opcionalmente piperina; y las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos; como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial.
11. Una composición farmacéutica que comprende zidovudina en combinación con; una polimixina seleccionada entre colistina y polimixina B; un antibiótico antituberculosis seleccionado entre rifampicina, rifapentina o rifabutina; y opcionalmente piperina; y las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un transportador farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición que comprende zidovudina, colistina y rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptable de los mismos, para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de una infección microbiana.

13. Zidovudina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en combinación con colistina y rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvato farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 5 14. Colistina, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en combinación con zidovudina y rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 15. Rifampicina o rifapentina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en el tratamiento de una infección microbiana en combinación con colistina y zidovudina, o las sales y/o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Figura 1a

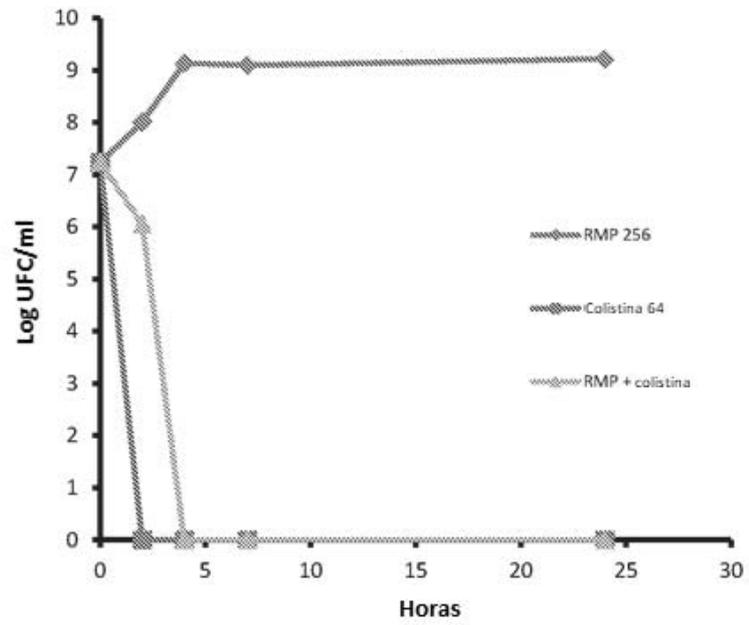


Figura 1b

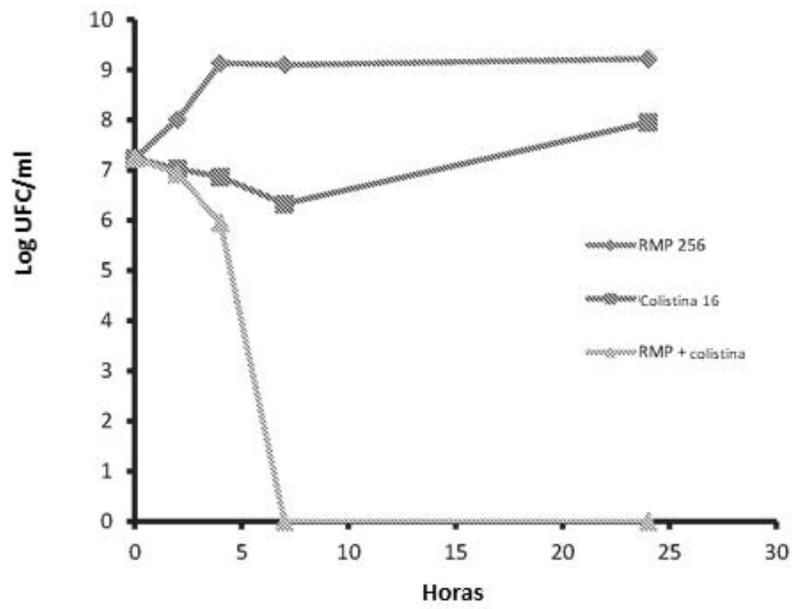


Figura 1c

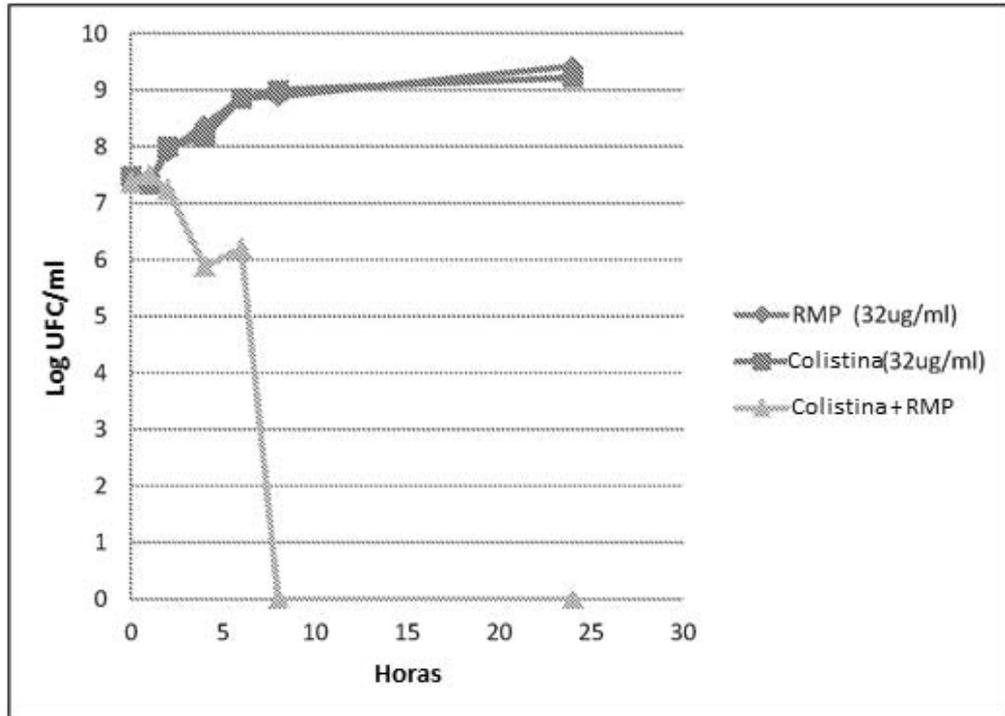


Figura 2a

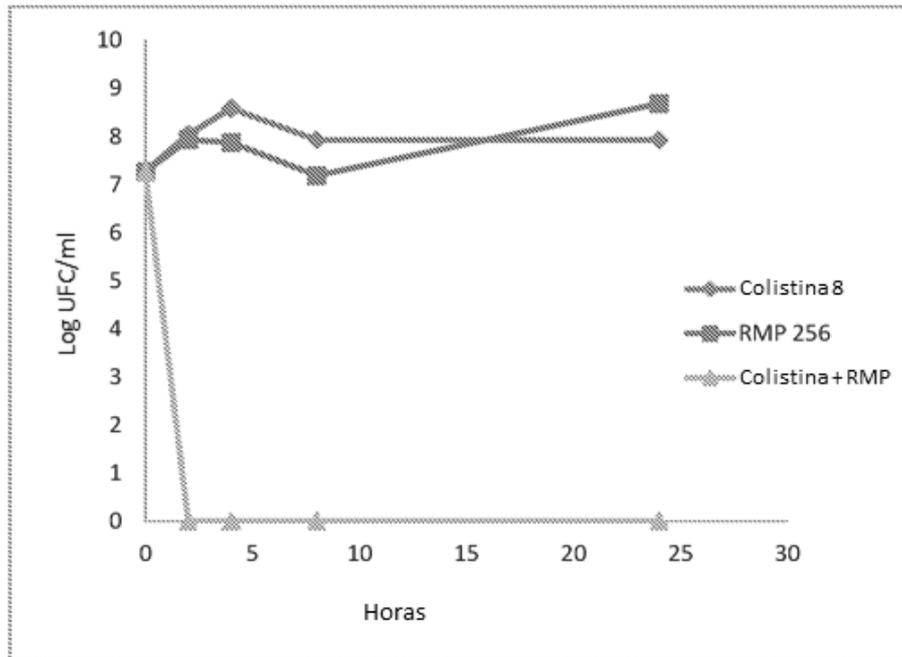


Figura 2b

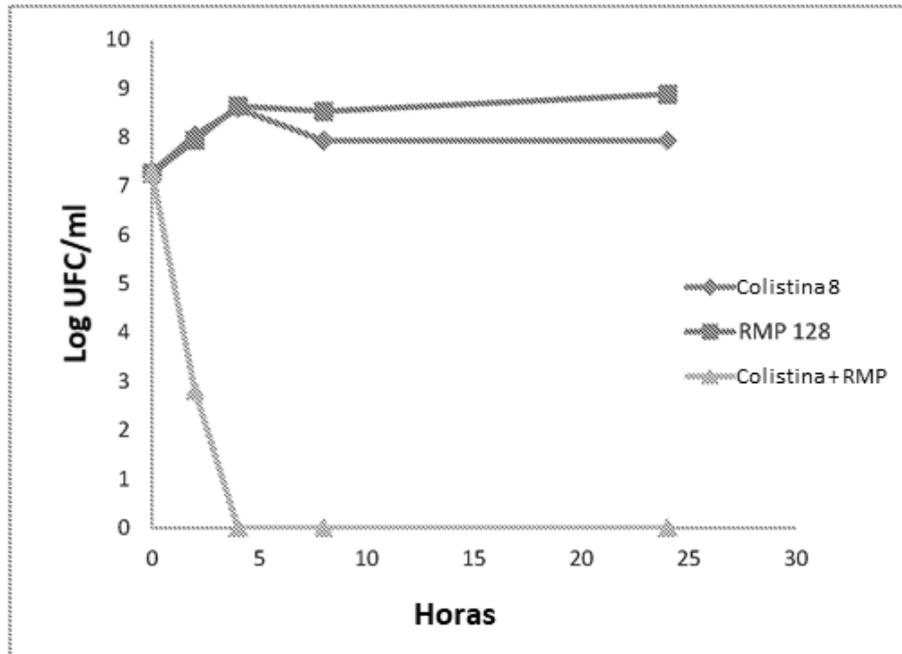


Figura 2c

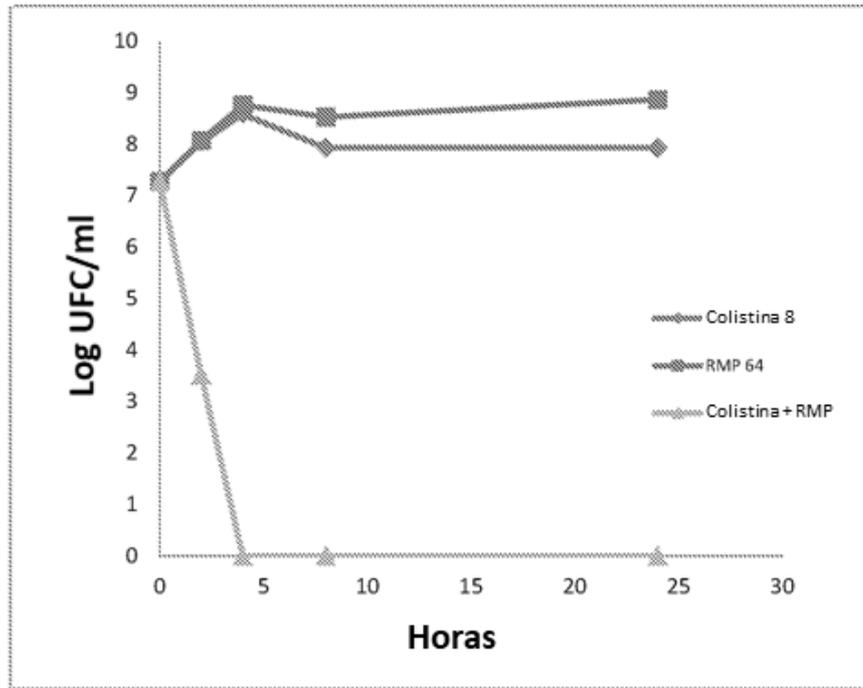


Figura 2d

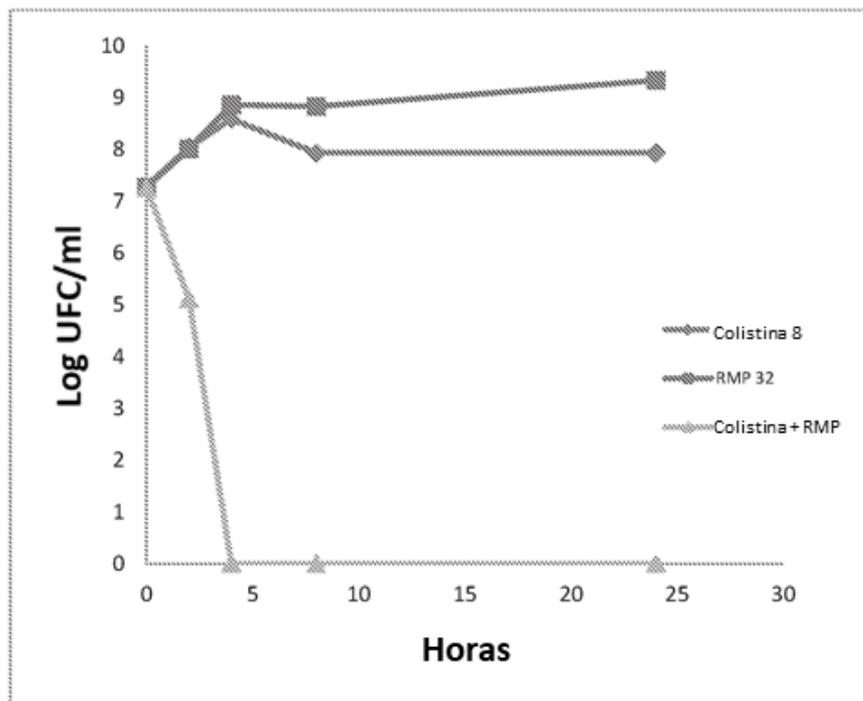


Figura 3

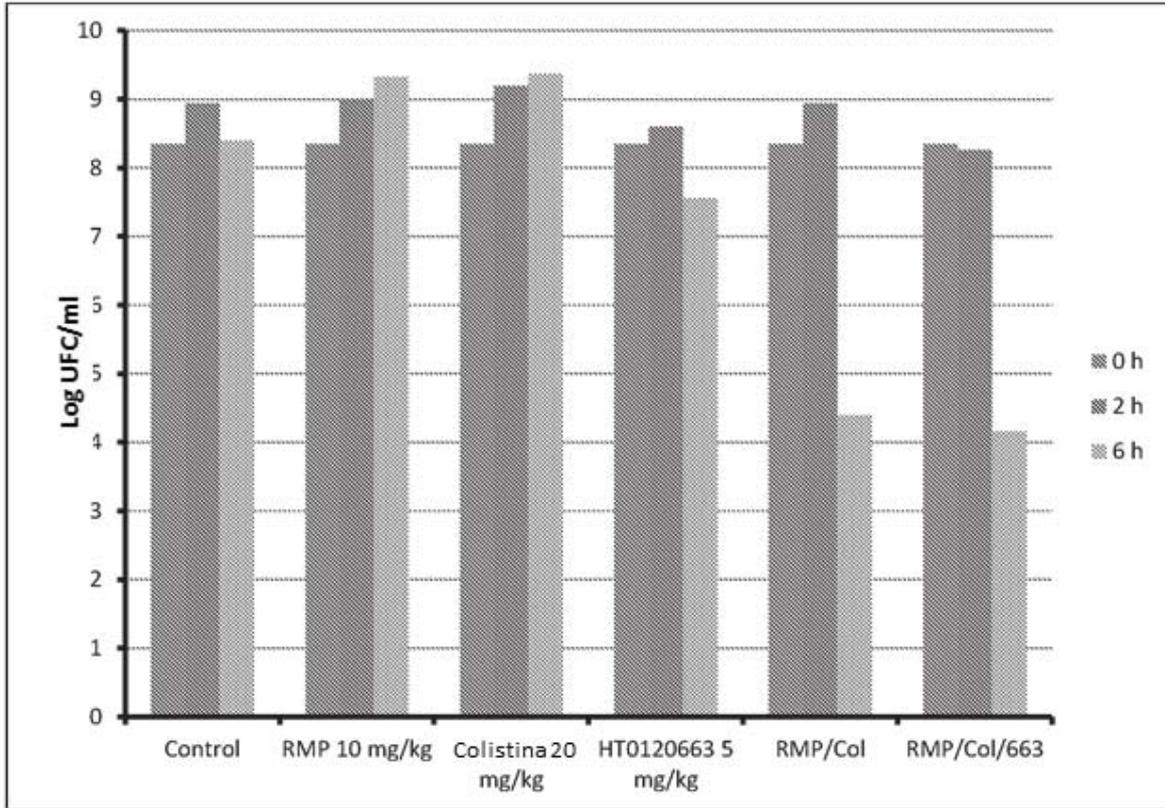


Figura 4

