(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 929 058**

(51) Int. CI.:

A61K 31/546 (2006.01)
A61K 31/407 (2006.01)
C07D 477/12 (2006.01)
C07D 201/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/424 (2006.01)
A61K 31/43 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/431 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2016 PCT/US2016/041565**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17008034**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2016 E 16822054 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2022 EP 3319609**

(54) Título: **Composiciones y procedimientos de uso de combinaciones de fármacos antibacterianos**

(30) Prioridad:

09.07.2015 US 201562190588 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2022

(73) Titular/es:

WASHINGTON UNIVERSITY (50.0%)
One Brookings Drive
Saint Louis, MO 63130, US y
UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC (50.0%)

(72) Inventor/es:

DANTAS, GAUTAM;
GONZALES, PATRICK;
FORSBERG, KEVIN;
PESESKY, MITCHELL;
CHANG, MAYLAND y
MOBASHERY, SHAHRIAR

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de uso de combinaciones de fármacos antibacterianos

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. número 62/190,588, presentada el 9 de julio de 2015.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La divulgación se refiere a composiciones antibacterianas y su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por bacterias resistentes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los patógenos multirresistentes (MDR) representan una amenaza creciente para la salud humana, ya que muchas enfermedades infecciosas retroceden efectivamente hacia la era preantibiótica, ejemplificada por el dramático aumento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) adquiridas en la comunidad. *El Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es uno de los patógenos multirresistentes más frecuentes en todo el mundo, y presenta una resistencia cada vez mayor a las últimas monoterapias antibióticas utilizadas para tratar estas infecciones. La aparición del SARM ha eliminado prácticamente el uso de los β-lactámicos como opción terapéutica contra el S. *aureus.* El agente β-lactámico recientemente desarrollado, la ceftarolina, que muestra actividad en el tratamiento de las infecciones por SARM, lo hace mediante la unión al sitio alostérico de PBP2a, desencadenando la apertura del sitio activo para la inactivación por el fármaco; sin embargo, se ha informado de la resistencia a la ceftarolina y a otros antibióticos utilizados para tratar el SARM, incluyendo linezolid, vancomicina y daptomicina. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una nueva estrategia para tratar los patógenos MDR y reutilizar los antibióticos existentes.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la invención proporciona una composición, como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de una infección causada por una bacteria resistente a los antibióticos, en la que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a). La composición comprende: (i) al menos un carbapenem u otra β-lactama adecuada capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a; (ii) al menos un inhibidor de β-lactamasas; y (iii) al menos una β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a. La bacteria resistente a los antibióticos es *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y la composición se selecciona del grupo que consiste en: (a) meropenem/piperacilina/tazobactam (ME/PI/TZ); (b) cefepime/piperacilina/tazobactam (CP/PI/TZ); (c) aztreonam/piperacilina/tazobactam (AZ/PI/TZ); (d) meropenem/amoxicilina/tazobactam (ME/AX/TZ); (e) meropenem/amoxicilina/clavulanato (ME/AX/CV); y (f) imipenem/piperacilina/clavulanato (IM/PI/CV). Concretamente, la composición suprime la evolución de la resistencia a la composición.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una infección causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) en un sujeto, en el que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a). La composición para su uso en dicho tratamiento se administra al sujeto en una cantidad eficaz.

En otro aspecto, la composición de la invención suprime la evolución de la resistencia a la composición. La composición para su uso en dicho tratamiento se administra al sujeto una cantidad efectiva.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 representa una determinación de sinergia en tablero de control 3D que muestra las isóbolas de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y el crecimiento *in vitro* en condiciones de uno, dos o tres fármacos de ME/PI/TZ. Las líneas/isóbolos coloreados dentro de cada panel indican las MIC de dos fármacos en combinación. Las líneas discontinuas indican las concentraciones teóricas de las interacciones aditivas. Los puntos indican las concentraciones subinhibitorias máximas de meropenem (ME), piperacilina (PI) y tazobactam (TZ) para cada condición probada. El triángulo rojo indica la MIC de los tres fármacos en combinación (cada uno a 2 µg/ml).

La FIG. 2 representa un gráfico que muestra el cambio en las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo del SARM N315 cuando se le desafía con combinaciones antibacterianas. Se calcularon las tasas de crecimiento de SARM N315 durante un periodo de 11 días para cada combinación antibacteriana probada a una dilución triple por debajo de la MIC. Se calcularon las diferencias en la tasa de crecimiento (Δr) entre el primer día (Tasa de Crecimiento Inicial) y la tasa promedio de los últimos seis días del ensayo (Tasa de Crecimiento Final). SARM N315 en condiciones cuyo cambio en la tasa de crecimiento Δr >0,2 se consideraron adaptadas. El parámetro de tiempo de adaptación t-adapt se calculó como el tiempo en el que el cambio en la tasa de

crecimiento era medio máximo. La tasa de adaptación, α = (Δr /2)/t-adapt ($1/h^2$), se calculó para las cepas que cumplían este criterio. Los resultados proceden de dos experimentos repetidos. tasa para ME/PI: α = $8,23\times10^{-3}$ h^{-2}; ME/TZ: α = $8,68\times10^{-4}$ h^{-2}; PI/TZ: α = $4,32\times10^{-3}$ h^{-2}. Sólo ME/PI/TZ a una dilución triple por debajo de la MIC (1,2 µg/ml cada una) y el control sin fármaco mostraron falta de aumento en la tasa de crecimiento y no se adaptaron.

La FIG. 3A y la **FIG. 3B** representan diagramas que ilustran las sensibilidades colaterales que subyacen a la supresión de la adaptación a las combinaciones antibacterianas en SARM N315. **(FIG. 3A)** Red de interacción SARM N315 de sensibilidades y resistencias colaterales entre ME/PI/TZ, sus componentes simples y dobles, y otros compuestos 13-lactámicos de varias subclases (cefalosporinas, penicilinas, carbapenems e inhibidores de 13-lactamasas). Los colores de los nodos indican subclases de 13-lactamasas, inhibidores de 13-lactamasas o combinaciones. Las flechas azules indican las sensibilidades colaterales. Las líneas negras indican la resistencia colateral. Por ejemplo, la adaptación a la piperacilina sensibiliza al SARM N315 al meropenem y al imipenem. Las cefalosporinas no fueron colateralmente sensibles a ninguno de los compuestos que se probaron. En los casos en los que no se probaron los pares o no se observaron efectos colaterales, no se muestran flechas de conexión. **(FIG. 3B)** Red de interacción SARM N315 de sensibilidades y resistencias colaterales entre ME/PI/TZ y sus componentes simples y dobles únicamente. Las flechas azules en negrilla indican sensibilidades colaterales recíprocas entre dos nodos, por ejemplo, piperacilina y meropenem/tazobactam.

La FIG. 4A, la **FIG. 4B** y la **FIG. 4C** representan gráficos que muestran la evidencia genómica de los mecanismos de sinergia y sensibilidad colateral. **(FIG. 4A**) La adaptación de SARM N315 a meropenem/tazobactam o a tazobactam solo desestabiliza el plásmido pN315. Cobertura de lecturas alineadas con pN315 en SARM N315 adaptado a combinaciones de fármacos que contienen tazobactam (TZ) o que no contienen tazobactam (no TZ), frente a las lecturas totales por muestra. Se indican los días de adaptación bajo las condiciones dadas, por ejemplo, D-2 indica que el aislado fue secuenciado después de dos días de adaptación. **(FIG. 4B, FIG. 4C**) La qRT-PCR confirma la desregulación de los operones *bla* y mec como mecanismos causantes de algunas sensibilidades colaterales en SARM N315. Se muestra la expresión de *blaZ* o *mecA* en relación con *gyrB* en el SARM N315 de tipo silvestre o en cepas adaptadas (N315 adaptada a TZ 100 µg/ml, y PI 33,3 o 100 µg/ml), cultivadas posteriormente en caldo solo o en caldo + PI sub-MIC o TZ. N.D. = No se ha determinado. "-" indica que no hay expresión. La pérdida de la expresión de blaZ en el SARM N315 adaptado a TZ confirma la pérdida de *blaZ* y del operón *bla* , y es consistente con la desregulación de la expresión de *mecA* . Los datos proceden de tres experimentos repetidos. Las barras de error indican el error estándar de medición.

La FIG. 5 representa un gráfico que muestra la eficacia del tratamiento ME/PIT/TZ en el modelo de peritonitis de ratón neutropénico de SARM N315. Se muestra la supervivencia proporcional de los ratones (n = 6) de cada tratamiento farmacológico. Los tratamientos con ME/PI/TZ, ME/PI y linezolid son significativamente diferentes al vehículo (*p = 0,02). Las barras de error indican el error estándar de las proporciones de supervivientes por condición probada.

La FIG. 6A, la FIG. 6B, la FIG. 6C, la FIG. 6D, la FIG. 6E, la FIG. 6F, la FIG. 6G, la FIG. 6H y **la FIG. 6I** representan el crecimiento de la placa bacteriana que ilustra la inducción de xilosa PBP para las cepas SARM COL antisentido (AS). **(FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C)** cepa *pbp2a/mecA* antisentido (AS). La represión dirigida de PBP2a mostró una mayor susceptibilidad a meropenem cuando se indujo la xilosa. También se observó una mayor susceptibilidad a la piperacilina. Se observó un aumento de la susceptibilidad en todas las combinaciones. **(FIG. 6D, FIG. 6E)** cepa *pbpA* antisentido (AS). La represión dirigida de PBP1 mostró una mayor susceptibilidad a meropenem y piperacilina. Se observó una mayor susceptibilidad en las combinaciones ME/PI, ME/TZ y ME/PI/TZ. **(FIG. 6F, FIG. 6G)** cepa *pbp2* antisentido (AS). La represión dirigida de PBP2 mostró una mayor susceptibilidad a meropenem y piperacilina. Se observó un aumento de la susceptibilidad en todas las combinaciones. **(FIG. 6H, FIG. 6I**) cepa *pbp3* antisentido (AS). La represión dirigida de PBP3 no mostró un aumento de la susceptibilidad a ninguno de los fármacos individuales. Se observó un ligero aumento de la susceptibilidad para la combinación ME/PI; no se observó ningún cambio en la susceptibilidad para ninguna de las otras combinaciones.

La FIG. 7 representa un gráfico que ilustra las sensibilidades colaterales que subyacen a la supresión de la adaptación a las combinaciones de β-lactámicos en SARM N315. Los tonos azules indican la sensibilización colateral de la cepa a los fármacos simples y a las combinaciones, tras la adaptación previa a las combinaciones de fármacos simples y dobles. Los tonos rojos indican resistencia colateral. Sombreado claro = cambio de una dilución MIC. Sombreado oscuro = cambio de dos o más diluciones MIC. Por ejemplo, la adaptación a la piperacilina produce una sensibilidad colateral al meropenem, y viceversa. ME = meropenem, PI = piperacilina, TZ = tazobactam, AX = amoxicilina, CF = cefdinir, CP = cefepime, CX = cefoxitina, DC = dicloxacilina, IM = imipenem.

La FIG. 8A, la FIG. 8B, la FIG. 8C y **la FIG. 8D** representan histogramas que ilustran la duplicación genómica en el SARM N315 adaptado a la piperacilina/tazobactam. Histograma que muestra la cobertura total de lecturas en el genoma de N315 adaptado a **la FIG. 8A,** meropenem/tazobactam durante cinco días, **la FIG. 8B,** tazobactam solo durante dos días, **la FIG. 8C,** piperacilina/tazobactam durante seis días, y **la FIG. 8D,** piperacilina/tazobactam durante 11 días. La cobertura promedio de lecturas por base en todo el genoma y sólo en la región indicada por el recuadro rojo son, respectivamente: a) 116,6 lecturas/pb y 126,6 lecturas/pb; b) 124,5 lecturas/pb y 128,9 lecturas/pb; c) 157,8 lecturas/pb y 302,2 lecturas/pb; y d) 120,1

lecturas/pb y 230,6 lecturas/pb. Clones en **la FIG. 8A** y **la FIG. 8B** fueron elegidos para ser representativos de todas las adaptaciones no relacionadas con la piperacilina/tazobactama.

La FIG. 9 representa un mecanismo propuesto de sinergia de meropenem/piperacilina/tazobactam (ME/PI/TZ) contra el SARM. Estos datos apoyan el modo de acción sinérgico propuesto contra la síntesis de la pared celular en el SARM que implica: I.) supresión de la transpeptidación por PBP1 en el tabique de división por carbapenems, II.) supresión de la transpeptidación por PBP2 por penams (penicilinas), III.) supresión de la actividad de β-lactamasas contra penams por inhibidores de β-lactamasas, y IV.) apertura alostérica del sitio activo de PBP2a por meropenem, permitiendo la inhibición por meropenem o por otros β-lactámicos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Se divulgan en el presente documento composiciones que comprenden una combinación de antibióticos de tres subclases de antibióticos β-lactámicos, todos dirigidos a la síntesis de la pared celular. Esta terapia utiliza: 1) antibióticos que se dirigen a múltiples nodos del mismo sistema celular, 2) combinaciones de estos antibióticos que aumentan la potencia del fármaco utilizando la sinergia de los mismos, y 3) sensibilidad colateral entre los componentes de la combinación para suprimir la evolución de la resistencia. Sin querer estar limitado por la teoría, la composición comprende un carbapenem u otro β-lactámico adecuado que inhibe la proteína de unión a la penicilina 1 (PBP1) y abre alostéricamente el sitio activo de la PBP2a para la inhibición por otra molécula de antibiótico en la combinación, un β-lactámico que se une a PBP2 y a PBP2a, y un inhibidor de β-lactamasa que protege al β-lactámico(s) de las β-lactamasas. Esto culmina en una respuesta sinérgica por la perturbación simultánea de múltiples componentes de la maquinaria de síntesis de la pared celular. Los inventores han demostrado que la combinación actúa de forma sinérgica y es bactericida contra las bacterias que comprenden PBP2a, específicamente *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

I. Composiciones

En un aspecto, se proporcionan composiciones útiles para el tratamiento de una infección causada por una bacteria resistente a los antibióticos, en la que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) y en la que la bacteria resistente a los antibióticos es *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). La composición comprende al menos un carbapenem u otros β-lactámicos adecuados capaces de unirse al sitio alostérico de PBP2a; al menos un inhibidor de β-lactamasas; y al menos un β-lactámico que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a y en el que la composición se selecciona del grupo que consiste en: (a) meropenem/piperacilina/tazobactam (ME/PI/TZ); (b) cefepime/piperacilina/tazobactam (CP/PI/TZ); (c) aztreonam/piperacilina/tazobactam (AZ/PI/TZ); (d) meropenem/amoxicilina/tazobactam (ME/AX/TZ); (e) meropenem/amoxicilina/clavulanato (ME/AX/CV); y (f) imipenem/piperacilina/clavulanato (IM/PI/CV).

Los inventores han descubierto que la composición divulgada reduce o elimina la evolución de las bacterias resistentes tras la exposición a la combinación de antibióticos citada. En la composición divulgada, es esencial que un antibiótico se una al sitio alostérico de PBP2a y que otro antibiótico se una al sitio activo de PBP2a. Sin querer estar limitado por la teoría, el antibiótico que se une al sitio alostérico de PBP2a abre el sitio activo de la transpeptidasa de PBP2a de tal manera que el antibiótico que se une al sitio activo de PBP2a también puede unirse a un sitio separado en PBP2a. La unión de estos dos antibióticos es necesaria para detener completamente la función vital de transpeptidasa de PBP2a. Al detener la función de transpeptidasa de PBP2a, una bacteria resistente a los antibióticos que depende de un mecanismo impulsado por PBP2a para la resistencia será eliminada. Un ejemplo concreto de este tipo de bacterias es el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). El inhibidor de la β-lactamasa de la composición facilita además la eliminación de las bacterias resistentes al proteger la(s) β-lactama(s) de la combinación de la descomposición enzimática por las β-lactamasas producidas por las bacterias resistentes.

De acuerdo con la divulgación, la composición es eficaz contra las bacterias resistentes a los antibióticos, en las que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a). Un artesano experto sería capaz de determinar si la bacteria resistente a los antibióticos presenta resistencia debido a un mecanismo impulsado por la PBP2a. Por ejemplo, la bacteria puede comprender *mecA,* que codifica para PBP2a. En general, se sabe que las especies del género *Staphylococcus* poseen el gen *mecA* en este momento, incluyendo: S. *aureus, S. epidermidis, S. hominis, S. lugdunensis, S. xylosus* y S. *felis* (Petinaki et al. Detection of mecA, mecR1 and mecl genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. J. Antimicrob. Chemother. 47, 297-304 (2001)), (Nascimento et al. Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. J. Infect. Dev. Ctries. 9, (2015)). Por consiguiente, en una realización, una bacteria resistente a los antibióticos es del género *Staphylococcus.* En otra realización, una bacteria resistente a los antibióticos se selecciona del grupo formado por S. *aureus, S. epidermidis, S. hominis, S. lugdunensis, S. xylosus* y S. *felis.* De acuerdo con la presente invención, la bacteria resistente a los antibióticos es *el Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Las PBP son proteínas de unión a la penicilina, que son las enzimas transpeptidasas necesarias para la síntesis de la pared celular de peptidoglicano en las bacterias. Existen cuatro PBP nativas en *Staphylococcus aureus,* de las cuales la PBP2 es la esencial para la viabilidad de la célula. Además de poseer PBP2, S. *aureus* resistente a la meticilina (SARM) ha adquirido una PBP accesoria (PBP2a) que es capaz de realizar toda la actividad transpeptidasa crítica para la síntesis de la pared celular. La PBP2a tiene actividad de

transpeptidasa incluso en presencia de muchos β-lactámicos que suelen funcionar inhibiendo la PBP2 nativa. Los fármacos β-lactámicos se dirigen específicamente a las PBP, y se componen de varias subclases que contienen la "ojiva" β-lactámica, tienen afinidades variables con las PBP. Algunos ejemplos no limitantes son las penicilinas, los carbapenems, las cefalosporinas y los monobactámicos. Sin embargo, la PBP2a tiene poca afinidad de unión con algunos de los β-lactámicos mientras está en su conformación nativa y cerrada, lo que resulta en una alta resistencia a esta clase de fármacos por parte de los organismos que contienen PBP2a. En consecuencia, la presente divulgación supera esta mala unión empleando un β-lactámico que se une al sitio alostérico de PBP2a manteniéndolo así abierto mientras que un segundo β-lactámico se une a la configuración abierta del sitio activo inhibiendo así eficazmente la función de PBP2a.

Una composición de la divulgación comprende, en parte, un carbapenem u otros β-lactámicos adecuados capaces de unirse al sitio alostérico de PBP2a. En consecuencia, un carbapenem o un β-lactama adecuado de la divulgación debe unirse al sitio alostérico de PBP2a. Ejemplos no limitantes de carbapenems o β-lactámicos que se unen al sitio alostérico de PBP2a incluyen meropenem, imipenem, tomopenem, ceftarolina y ceftobiprole. En una realización específica, el carbapenem se selecciona del grupo que consiste en meropenem e imipenem. En otra realización específica, el carbapenem es meropenem. En otra realización específica, el carbapenem es imipenem.

Una composición de la divulgación comprende, en parte, un inhibidor de β-lactamasas. Un inhibidor de β-lactamasas adecuado protege a la β-lactama también presente en la composición de la descomposición enzimática por las β-lactamasas producidas por las bacterias. En consecuencia, un inhibidor de la β-lactamasa inhibe la actividad de las β-lactamasas, una familia de enzimas que rompen el anillo β-lactámico que permite el funcionamiento de los antibióticos tipo penicilina. Ejemplos no limitantes de inhibidores de β-lactamasas incluyen el ácido clavulánico (clavulanato), el sulbactam, el tazobactam y el avibactam. En una realización específica, el inhibidor de la β-lactamasa se selecciona del grupo que consiste en tazobactam y clavulanato. En otra realización específica, el inhibidor de la β-lactamasa es el tazobactam. En otra realización específica, el inhibidor de la β-lactamasa es el clavulanato.

Una composición de la divulgación comprende, en parte, una β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a. En consecuencia, una β-lactama de la divulgación debe unirse a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a. Ejemplos no limitantes de β-lactámicos que se unen a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a incluyen carbapenems, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas, oxacilinas, meticilinas y algunas cefalosporinas. Ejemplos no limitantes de carbapenems incluyen meropenem, imipenem, doripenem, ertapenem, faropenem y tebipenem. Ejemplos no limitantes de oxacilinas y meticilinas incluyen cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, oxacilina, meticilina y nafcilina. Ejemplos no limitantes de cefalosporinas que se unen a la configuración abierta del sitio activo de la PBP2a incluyen cefepima, cefozopran, cefpirome, cefquinome, ceftarolina y ceftobiprole. En particular, la mayoría de los β-lactámicos de tipo penicilina (por ejemplo, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas) se unen a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a. Ejemplos no limitantes de aminopenicilinas incluyen amoxicilina, ampicilina, pivampicilina, hetacilina, bacampicilina, metampicilina, talampicilina y epicilina. Ejemplos no limitantes de carboxipenicilinas son carbenicilina, carindacilina, ticarcilina y temocilina. Ejemplos no limitantes de ureidopenicilinas son azlocilina, mezlocilina y piperacilina. Ejemplos específicos no limitantes de β-lactámicos que no se unen a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a y no funcionarán en una composición de la divulgación incluyen mecillinam, cefradina y tienamicina. En una realización específica, la β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a se selecciona del grupo que consiste en piperacilina y amoxicilina. En otra realización específica, la β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es piperacilina. En otra realización específica, la β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es amoxicilina.

En una realización específica, el carbapenem u otro β-lactámico adecuado capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a es meropenem, el inhibidor de la β-lactamasa es tazobactam y el β-lactámico que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es piperacilina. En otra realización específica, el carbapenem u otro β-lactámico adecuado capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a es imipenem, el inhibidor de la β-lactamasa es clavulanato y el β-lactámico que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es piperacilina. En otra realización específica, el carbapenem u otro β-lactámico adecuado capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a es meropenem, el inhibidor de β-lactamasa es tazobactam y el β-lactámico que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es amoxicilina.

La relación de la cantidad de cada antibiótico en la combinación puede determinarse experimentalmente mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un gráfico de tablero de ajedrez tridimensional para determinar la relación de cada antibiótico en la combinación, tal como se representa en la **FIG. 1.** Utilizando esta metodología, un artesano experto puede ser capaz de determinar la relación óptima de la combinación de antibióticos. Como han demostrado los inventores, la relación de los antibióticos en la combinación puede oscilar entre 64:1:1, 1:64:1 y 1:1:64 y 1:1:1. En una realización específica, la relación entre el carbapenem u otro β-lactámico adecuado capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a y el inhibidor de la β-lactamasa y el β-lactámico que se une a la configuración abierta del sitio activo de PBP2a es de 1:1:1. Sin embargo, se entiende que estas relaciones pueden variarse y seguir dando lugar a una combinación eficaz de la divulgación.

Ventajosamente, una composición de la divulgación suprime la evolución de la resistencia a dicha composición. A

menudo, los pacientes tratados con un antibiótico específico desarrollan resistencia a dicho antibiótico por diversas razones. El desarrollo y la propagación de la resistencia pueden reducir drásticamente la eficacia y la longevidad de la terapia antimicrobiana. Sorprendentemente, los inventores han demostrado que una combinación de la divulgación suprime la evolución de la resistencia. Dicho de otro modo, tras una exposición prolongada de las bacterias a una combinación de la divulgación, no se observaron bacterias resistentes a dicha combinación. Esto contrasta con las combinaciones de un solo fármaco y de dos fármacos.

(a) composición farmacéutica

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de una infección causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). La composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con la invención, como principio activo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un diluyente, un aglutinante, un relleno, un agente amortiguador, un agente modificador del pH, un desintegrante, un dispersante, un conservante, un lubricante, un agente enmascarador del sabor, un agente aromatizante o un agente colorante. La cantidad y los tipos de excipientes utilizados para formar las composiciones farmacéuticas pueden seleccionarse según los principios conocidos de la ciencia farmacéutica.

En una realización, el excipiente puede ser un diluyente. El diluyente puede ser compresible (es decir, plásticamente deformable) o abrasivamente frágil. Entre los ejemplos no limitantes de diluyentes compresibles adecuados se encuentran la celulosa microcristalina (MCC), los derivados de la celulosa, la celulosa en polvo, los ésteres de celulosa (es decir, ésteres mixtos de acetato y butirato), etilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, almidón de maíz, almidón de maíz fosfatado, almidón de maíz pregelatinizado, almidón de arroz almidón de patata, almidón de tapioca, almidón-lactosa, almidón-carbonato de calcio, almidón glicolato de sodio, glucosa, fructosa, lactosa, lactosa monohidrato, sacarosa, xilosa, lactitol, manitol, malitol, sorbitol, xilitol, maltodextrina y trehalosa. Entre los ejemplos no limitantes de diluyentes abrasivos adecuados se encuentran fosfato de calcio dibásico (anhidro o dihidrato), fosfato de calcio tribásico, carbonato de calcio y carbonato de magnesio.

En otra realización, el excipiente puede ser un aglutinante. Los aglutinantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidones, almidones pregelatinizados, gelatina, polivinilpirrolidona, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa poliacrilamidas, poliviniloxoazolidona, polivinilalcoholes, alcohol de ácidos grasos C_{12}-C_{18}, polietilenglicol, polioles, sacáridos, oligosacáridos, polipéptidos, oligopéptidos y combinaciones de los mismos.

En otra realización, el excipiente puede ser un agente de carga. Los agentes de carga adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, compuestos inorgánicos y polivinilpirrolidona. A modo de ejemplo no limitativo, el relleno puede ser sulfato de calcio, tanto di- como tri-básico, almidón, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, celulosa microcristalina, fosfato de calcio dibásico, carbonato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de calcio, talco, almidones modificados, lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol.

En otra realización, el excipiente puede ser un agente tampón. Ejemplos representativos de agentes tampón adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfatos, carbonatos, citratos, tampones de tris y sales salinas tamponadas (por ejemplo, solución salina tamponada de tris o solución salina tamponada de fosfato).

En diversas realizaciones, el excipiente puede ser un modificador del pH. A modo de ejemplo no limitativo, el agente modificador del pH puede ser carbonato sódico, bicarbonato sódico, citrato sódico, ácido cítrico o ácido fosfórico.

En otra realización, el excipiente puede ser un desintegrante. El desintegrante puede ser no efervescente o efervescente. Ejemplos adecuados de desintegrantes no efervescentes incluyen, pero no se limitan a, almidones tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidones pregelatinizados y modificados de los mismos, edulcorantes, arcillas, tales como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, almidón glicolato de sodio, gomas tales como agar, guar, garrofín, karaya, pecitina y tragacanto. Ejemplos no limitantes de desintegrantes efervescentes adecuados incluyen bicarbonato de sodio en combinación con ácido cítrico y bicarbonato de sodio en combinación con ácido tartárico.

En otra realización, el excipiente puede ser un dispersante o un agente potenciador de la dispersión. Los dispersantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, almidón, ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín, bentonita, celulosa de madera purificada, glicolato de almidón de sodio, silicato isoamorfo y celulosa microcristalina.

En otra realización alternativa, el excipiente puede ser un conservante. Entre los ejemplos no limitativos de conservantes adecuados se encuentran los antioxidantes, tales como BHA, BHT, vitamina A, vitamina C, vitamina E o palmitato de retinilo, ácido cítrico, citrato de sodio; quelantes, tales como EDTA o EGTA; yantimicrobianos, tales como parabenos, clorobutanol o fenol.

En otra realización, el excipiente puede ser un lubricante. Ejemplos no limitativos de lubricantes adecuados incluyen minerales, tales como talco o sílice, y grasas, tales como estearina vegetal, estearato de magnesio o ácido esteárico.

En otra realización, el excipiente puede ser un agente enmascarador del sabor. Los materiales que enmascaran el sabor incluyen éteres de celulosa; polietilenglicoles; alcohol polivinílico; copolímeros de alcohol polivinílico y polietilenglicol; monoglicéridos o triglicéridos; polímeros acrílicos; mezclas de polímeros acrílicos con éteres de celulosa; ftalato de acetato de celulosa; y combinaciones de los mismos.

En una realización alternativa, el excipiente puede ser un agente aromatizante. Los agentes aromatizantes pueden elegirse entre aceites aromáticos sintéticos y aromatizantes y/o aceites naturales, extractos de plantas, hojas, flores, frutas y combinaciones de los mismos.

En otra realización, el excipiente puede ser un agente colorante. Los aditivos de color adecuados incluyen, pero no se limitan a, colores para alimentos, medicamentos y cosméticos (FD&C), colores para medicamentos y cosméticos (D&C), o colores externos para medicamentos y cosméticos (Ext. D&C).

La fracción en peso del excipiente o de la combinación de excipientes en la composición puede ser aproximadamente 99 % o menos, aproximadamente 97 % o menos, aproximadamente 95 % o menos, aproximadamente 90 % o menos, aproximadamente 85 % o menos, aproximadamente 80 % o menos, aproximadamente 75 % o menos, aproximadamente 70 % o menos, aproximadamente 65 % o menos, aproximadamente 60 % o menos, aproximadamente 55 % o menos, aproximadamente 50 % o menos, aproximadamente 45 % o menos, aproximadamente 40 % o menos, aproximadamente 35 % o menos, aproximadamente 30 % o menos, aproximadamente 25 % o menos, aproximadamente 20 % o menos, aproximadamente 15 % o menos, aproximadamente 10 % o menos, aproximadamente 5 % o menos, aproximadamente 2 %, o aproximadamente 1 % o menos del peso total de la composición.

La composición puede ser formulada en diversas formas de dosificación y administrada por un número de diferentes medios que entregarán una cantidad terapéuticamente efectiva del ingrediente activo. Dichas composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteral o tópica en formulaciones de unidades de dosificación que contienen portadores, adyuvantes y vehículos convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables, según se desee. La administración tópica también puede implicar el uso de la administración transdérmica, tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término parenteral, tal como se utiliza en el presente documento, incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraesternal, o técnicas de infusión. La formulación de medicamentos se discute, por ejemplo, en Gennaro, A. R., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. (18ª ed., 1995), y Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker Inc., Nueva York, N.Y. (1980).

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, tableta, píldoras, polvos, pellas y gránulos. En dichas formas farmacéuticas sólidas, el principio activo se combina normalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, cuyos ejemplos se han detallado anteriormente. Los preparados orales también pueden administrarse como suspensiones acuosas, elixires o jarabes. Para ello, el ingrediente activo puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, agentes colorantes y, si se desea, agentes emulsionantes y/o suspensores, así como diluyentes tales como agua, etanol, glicerina y combinaciones de los mismos.

Para la administración parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), la preparación puede ser una solución acuosa o una con base en aceite. Las soluciones acuosas pueden incluir un diluyente estéril tal como agua, solución salina, un poliol farmacéuticamente aceptable tal como glicerol, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; un agente antibacteriano y/o antifúngico tal como alcohol bencílico, parabeno metílico, el clorobutanol, fenol, timerosal y similares; un antioxidante tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; un agente quelante tal como ácido etilendiaminotetraacético; un tampón tal como acetato, citrato o fosfato; y/o un agente para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio, dextrosa o un polialcohol tal como manitol o sorbitol. El pH de la solución acuosa puede ajustarse con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Las soluciones o suspensiones con base en aceite pueden comprender además aceite de sésamo, de cacahuete, de oliva o mineral.

Para la administración tópica (por ejemplo, transdérmica o transmucosa), generalmente se incluyen en la preparación penetrantes apropiados para la barrera que se va a permeabilizar. La administración transmucosa puede llevarse a cabo mediante el uso de aerosoles nasales, aerosoles, comprimidos o supositorios, y la administración transdérmica puede ser a través de ungüentos, bálsamos, geles, parches o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

II. Procedimientos

En un aspecto, la presente divulgación abarca una composición para su uso en el tratamiento de una infección causada por una bacteria resistente a los antibióticos en un sujeto, en la que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a) y en la que la bacteria resistente a los antibióticos es *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). La composición para su uso en dicho tratamiento se administra al sujeto en una cantidad efectiva.

En otro aspecto, la presente divulgación abarca una composición para su uso en el tratamiento de una infección causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). La composición para su uso en dicho tratamiento se administra al sujeto en una cantidad efectiva.

El término "infección", tal y como se utiliza en el presente documento, incluye la presencia de microbios, incluyendo las bacterias, en o sobre un sujeto, que, si se inhibiera su crecimiento, daría lugar a un beneficio para el sujeto. Por ello, el término "infección", además de referirse a la presencia de bacterias, también se refiere a la flora normal, que no es deseable. El término "infección" incluye la infección causada por bacterias.

El término "tratar", "que trata" o "tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la administración de una composición farmacéutica de la divulgación con fines profilácticos y/o terapéuticos. El término "tratamiento profiláctico" se refiere al tratamiento de un sujeto que aún no está infectado, pero que es susceptible o tiene riesgo de infección. El término "tratamiento terapéutico" se refiere a la administración de un tratamiento a un sujeto que ya sufre una infección. El término "tratar", "que trata" o "tratamiento", tal como se utiliza en el presente documento, también se refiere a la administración de una composición de la divulgación, con o sin ingredientes farmacéuticamente activos o inertes adicionales, con el fin de: (i) reducir o eliminar una infección bacteriana o uno o más síntomas de la infección bacteriana, o (ii) retrasar la progresión de una infección bacteriana o de uno o más síntomas de la infección bacteriana, o (iii) reducir la gravedad de una infección bacteriana o de uno o más síntomas de las infecciones bacterianas, o (iv) suprimir la manifestación clínica de una infección bacteriana, o (v) suprimir la manifestación de síntomas adversos de las infecciones bacterianas.

El término "control" o "que controla", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a la prevención, reducción o erradicación de la infección o a la inhibición de la tasa y el alcance de dicha infección, o a la reducción de la población microbiana, tal como una población microbiana presente en o sobre un cuerpo o estructura, superficie, líquido, sujeto, etc., en la que dicha prevención o reducción de la infección o población microbiana es estadísticamente significativa con respecto a la infección o población no tratada. En general, dicho control puede lograrse mediante el aumento de la mortalidad de la población microbiana.

El término "cantidad efectiva", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una cantidad que tiene un efecto terapéutico o es la cantidad necesaria para producir un efecto terapéutico en un sujeto. Por ejemplo, una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz de un agente antibiótico o de una composición farmacéutica es la cantidad del agente antibiótico o de la composición farmacéutica requerida para producir un efecto terapéutico deseado, tal y como se puede juzgar por los resultados de los ensayos clínicos, los estudios de infección en animales modelo, y/o los estudios *in vitro* (por ejemplo, en medios de agar o caldo). La cantidad efectiva o farmacéuticamente efectiva depende de diversos factores, que incluyen, pero no se limitan a, el microorganismo (por ejemplo, la bacteria) implicado, las características del sujeto (por ejemplo, la altura, el peso, el sexo, la edad y el historial médico), la gravedad de la infección y el tipo concreto de antibiótico utilizado. En el caso de los tratamientos profilácticos, una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz es aquella cantidad que sería efectiva para prevenir una infección microbiana (por ejemplo, bacteriana). En particular, la combinación divulgada en el presente documento puede permitir que la cantidad efectiva de la combinación de agentes activos sea menor que la cantidad efectiva por sí sola, de modo que se administre una menor concentración total de antibiótico a un sujeto.

El término "administración" o "que administra" incluye la entrega de una composición o uno o más ingredientes farmacéuticamente activos a un sujeto, incluyendo, por ejemplo, por cualquier procedimiento apropiado, que sirve para entregar la composición o sus ingredientes activos u otros ingredientes farmacéuticamente activos al sitio de la infección. El procedimiento de administración puede variar en función de diversos factores, tales como, por ejemplo, los componentes de la composición farmacéutica o el tipo/naturaleza de los ingredientes farmacéuticamente activos o inertes, el lugar de la infección potencial o real, el microorganismo implicado, la gravedad de la infección, la edad y el estado físico del sujeto. Algunos ejemplos no limitantes de formas de administrar una composición o un ingrediente farmacéuticamente activo a un sujeto de acuerdo con la presente divulgación incluyen la administración oral, intravenosa, tópica, intrarespiratoria, intraperitoneal, intramuscular, parenteral, sublingual, transdérmica, intranasal, en aerosol, intraocular, intratraqueal, intrarrectal, vaginal, pistola génica, parche dérmico, gota ocular, gota auricular o enjuague bucal. En algunas realizaciones, las composiciones o los ingredientes activos de las mismas se administran por vía oral.

Las composiciones de acuerdo con la divulgación pueden formularse en diversas formas de dosificación en las que los ingredientes activos pueden estar presentes juntos (por ejemplo, como una mezcla) o como componentes separados. Cuando los distintos ingredientes de la composición se formulan como una mezcla, dicha composición puede administrarse mediante la administración de dicha mezcla (por ejemplo, en forma de una forma de dosificación unitaria adecuada, tal como un comprimido, una cápsula, una solución, un polvo, etc.). Alternativamente, los ingredientes también pueden administrarse por separado (simultáneamente o uno tras otro) siempre que estos ingredientes alcancen niveles terapéuticos beneficiosos de manera que la composición en su conjunto proporcione un efecto sinérgico. La composición o forma de dosificación en la que los ingredientes no vienen como una mezcla, sino que vienen como componentes separados, dicha composición/forma de dosificación puede ser administrada de varias maneras. En una de las formas posibles, los ingredientes pueden mezclarse en las proporciones deseadas y la mezcla se administra a continuación según sea necesario. Alternativamente, los componentes pueden ser administrados por

separado en proporciones adecuadas para lograr el mismo o equivalente nivel o efecto terapéutico que se habría logrado mediante la administración de la mezcla equivalente.

Un sujeto puede ser un humano, un animal de ganado, un animal de compañía, un animal de laboratorio o un animal zoológico. En una realización, el sujeto puede ser un roedor, por ejemplo, un ratón, una rata, una cobaya, etc. En otra realización, el sujeto puede ser un animal de ganado. Ejemplos no limitativos de animales de ganado adecuados pueden ser cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas, llamas y alpacas. En otra realización, el sujeto puede ser un animal de compañía. Ejemplos no limitativos de animales de compañía pueden ser mascotas tales como perros, gatos, conejos y pájaros. En otra realización, el sujeto puede ser un animal zoológico. Tal como se utiliza en el presente documento, un "animal zoológico" se refiere a un animal que puede encontrarse en un zoológico. Estos animales pueden incluir primates no humanos, gatos grandes, lobos y osos. En ciertas realizaciones, el animal es un animal de laboratorio. Los ejemplos no limitantes de un animal de laboratorio pueden incluir roedores, caninos, felinos y primates no humanos. En ciertas realizaciones, el animal es un roedor. Ejemplos no limitativos de roedores pueden ser ratones, ratas, cobayas, etc.

En general, las composiciones farmacéuticas y el procedimiento divulgados en el presente documento son útiles para tratar o controlar infecciones bacterianas causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, en las que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a). Algunos ejemplos no limitativos de estas bacterias que se sabe que han desarrollado resistencia debido a la PBP2a son S. *aureus, S. epidermidis, S. hominis, S. lugdunensis, S. xylosus* y S. *felis* (Petinaki et al. Detection of mecA, mecR1 and mecl genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. J. Antimicrob. Chemother. 47, 297-304 (2001)), (Nascimento et al. Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. J. Infect. Dev. Ctries. 9, (2015)). En una realización específica, la bacteria resistente a los antibióticos es *el Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Ejemplos no limitantes de infecciones que pueden prevenirse o tratarse utilizando las composiciones y/o procedimientos de la divulgación incluyen: infecciones de piel y tejidos blandos, neutropenia febril, infección del tracto urinario, infecciones intraabdominales, infecciones del tracto respiratorio, neumonía (nosocomial), meningitis bacteriémica e infecciones quirúrgicas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar diversas realizaciones de la presente divulgación. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Introducción a los ejemplos.

Los patógenos multirresistentes (MDR) representan una amenaza creciente para la salud humana, con muchas enfermedades infecciosas retrocediendo efectivamente hacia la era preantibiótica [1-3], ejemplificada por el dramático aumento de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) adquiridas en la comunidad. En la década de 1940, las infecciones por S. *aureus* se trataban principalmente con β-lactámicos de primera generación (penicilinas), que se dirigen a las proteínas de unión a la penicilina (PBP), las transpeptidasas críticas para la síntesis de la pared celular [4]. Cuatro PBP (PBP1-PBP4) realizan estas funciones en S. *aureus* [4]. La aparición de cepas productoras de β-lactamasa condujo al desarrollo de penicilinas de segunda generación resistentes a la β-lactamasa, incluyendo la meticilina. Poco después de la introducción de la meticilina en 1959, se notificaron las primeras cepas de SARM [5]. Estas cepas adquirieron una colección altamente regulada de genes de una fuente no-S. *aureus* que produjo resistencia inducible a los antibióticos β-lactámicos [4]. Uno de estos genes, *el mecA,* codifica la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a). La PBP2a lleva a cabo la reacción crítica de la transpeptidasa que entrecruza la pared celular, incluso bajo el desafío de los antibióticos β-lactámicos, cuando otras PBPs están inhibidas [6-8]. La base mecánica de este resultado es compleja, e implica una conformación cerrada para el sitio activo, cuya función está regulada por el alosterio [9,10]. La aparición del SARM ha eliminado prácticamente el uso de los β-lactámicos como opción terapéutica contra el S. *aureus.* El agente β-lactámico recientemente desarrollado, ceftarolina, que muestra actividad en el tratamiento de las infecciones por SARM, lo hace mediante la unión al sitio alostérico de PBP2a, desencadenando la apertura del sitio activo para la inactivación por el fármaco [10,11]; sin embargo, se ha informado de la resistencia a la ceftarolina [12] y a otros antibióticos utilizados para tratar el SARM, incluyendo linezolid, vancomicina y daptomicina [13-15].

El uso de la terapia combinada de múltiples fármacos dirigidos a procedimientos celulares ortogonales ha tenido éxito en el tratamiento de *Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori* y otras infecciones [16,17]. Sin embargo, la resistencia está aumentando incluso contra estas terapias [18-20]. Se ha identificado una nueva terapia potencial contra el SARM que consiste en una combinación de fármacos clínicamente aprobados de tres generaciones y subclases distintas de antibióticos β-lactámicos, todos ellos dirigidos a la síntesis de la pared celular: meropenem, piperacilina y tazobactam (ME/PI/TZ). Esta terapia utiliza elementos de tres estrategias: 1) uso de derivados de antibióticos semisintéticos que se dirigen a múltiples nodos del mismo sistema celular [12,21]; 2) uso de combinaciones de estos antibióticos que aumentan la potencia del fármaco utilizando la sinergia de los fármacos [22,23], y 3) uso de la sensibilidad colateral entre los componentes de la combinación para suprimir la evolución de la resistencia [24,25]. Cada uno de estos

procedimientos se ha empleado con éxito contra los principales patógenos humanos Gram-negativos y Gram-positivos MDRS [26,27]. Sin embargo, estas estrategias utilizadas individualmente se han visto a menudo frustradas por la evolución de nuevas resistencias en los patógenos MDR, lo que ha llevado a la disminución de las opciones para tratar sus infecciones [5,14,21,28,29].

La hipótesis es que ME/PI/TZ opera a través de la inhibición de PBP1 por el meropenem, la orientación de la PBP2 por la piperacilina, la protección de la piperacilina de las β-lactamasas de clase A PC1 por el tazobactam [6,30-34], y la apertura alostérica del sitio activo de la PBP2a por el meropenem para la inhibición por otra molécula de antibiótico en la combinación[11]. Esto culmina en una respuesta sinérgica por la perturbación simultánea de múltiples componentes de la maquinaria de síntesis de la pared celular en el SARM. Se encuentra que la exposición de SARM N315 a los componentes de ME/PI/TZ revela sensibilidades colaterales recíprocas dentro de esta combinación triple altamente sinérgica que suprime la evolución de la resistencia, en contraste con algunas terapias combinadas sinérgicas que, en cambio, aceleran la evolución de la resistencia [23,35]. Este efecto es coherente con trabajos recientes que muestran que la sensibilidad colateral retrasa la evolución de la resistencia en una cepa no patógena de laboratorio de *Escherichia coli* [24,36]. Los resultados apoyan la renovación del uso clínico de los antiguos antibióticos β-lactámicos contra el SARM cuando se utilizan en combinaciones sinérgicas de componentes colateralmente sensibles, abriendo un nuevo paradigma de tratamiento con fármacos existentes que ya están aprobados para uso humano.

Ejemplo 1. Sinergia entre meropenem, piperacilina y tazobactam en cepas de SARM *in vitro.*

Basándose en su alto nivel de resistencia contra 23 antibióticos diversos **(Tabla 1),** se seleccionó S. *aureus* SARM N315 [37] de un grupo de cepas MDR de SARM completamente secuenciadas para este estudio. El SARM N315 contiene el casete cromosómico estafilocócico mec (SCCmec) tipo II que codifica el operón *mec* de resistencia a la meticilina [38], así como el plásmido de penicilinasa pN315 que contiene el operón *bla* β-lactamasa [39]. A partir de un cribado combinatorio específico de estos 23 compuestos antibióticos, que incluían representantes de todas las clases principales de fármacos **(Tabla 1),** se identificó la combinación de ME/PI/TZ para mostrar una actividad bactericida altamente sinérgica contra el SARM N315 *in vitro,* utilizando la métrica del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI), FICI = 0,11[40,41] **(Tabla 2A).** Para cualquier número de fármacos en combinación, un FICI inferior a 1 indica sinergia, un FICI igual a 1 indica aditividad, y un FICI superior a 1 indica indiferencia o antagonismo [40,41]. En particular, estos tres fármacos pertenecen a diferentes subclases de fármacos β-lactámicos, que se dirigen a las enzimas transpeptidasas críticas de la síntesis de la pared celular, aunque las cepas de SARM suelen ser muy resistentes a la mayoría de los β-lactámicos [8]. La resistencia general a los β-lactámicos individuales se debe a la incapacidad de estos fármacos para inhibir el sitio activo de la transpeptidasa de PBP2a, que compensa la inhibición de los β-lactámicos de las otras transpeptidasas en S. *aureus* [8].

ME/PI/TZ muestra una mayor sinergia contra el SARM N315 en relación con sus tres combinaciones dobles constituyentes meropenem/piperacilina (ME/PI), meropenem/tazobactam (ME/TZ) y piperacilina/tazobactam (PI/TZ) a concentraciones clínicamente relevantes **(FIG. 1, Tabla 2B-C).** Los tres compuestos β-lactámicos se sometieron a prueba para determinar la MIC y la FICI finales utilizando un tablero de control tridimensional con series de diluciones dobles de cada compuesto de 128 a 2 µg/ml, y sin fármaco. Esto permitió explorar hasta una diferencia de 64 veces en las proporciones de los componentes para obtener la máxima sinergia, así como permitir el aislamiento de los resultados de cada compuesto individual, de todas las combinaciones dobles constituyentes y de la combinación triple. Utilizando el tablero de control tridimensional, se determinó que la relación óptima de ME/PI/TZ es de 1:1:1 para un aporte mínimo de fármacos y una sinergia máxima contra el SARM N315. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de los tres componentes de la combinación contra el SARM N315 (2 µg/ml cada una) están por debajo de los puntos de ruptura de la susceptibilidad clínica de cada uno de estos fármacos por separado contra el S. *aureus* susceptible a la meticilina (4-8 µg/ml)[42]. Las combinaciones dobles constituyentes ME/PI y PI/TZ también son sinérgicas contra N315 con FICI = 0,44 y 0,22, respectivamente, mientras que ME/TZ es menos sinérgico con 0,67. Co base en el modelo de aditividad de Loewe de la sinergia, los fármacos no pueden ser sinérgicos consigo mismos[36]. Aunque todos los β-lactámicos se dirigen a la vía de la pared celular, el uso del procedimiento FICI (aditividad de Loewe) confirma la naturaleza no aditiva de estas interacciones. En contraste con la alta sinergia de ME/PI/TZ observada en SARM N315, la combinación muestra una actividad ligeramente inferior a la aditiva (FICI = 1,12) en la cepa de referencia de S. *aureus* susceptible a la meticilina (MSSA) ATCC 29213[42,43] **(Tabla 2B-C)** , y planteamos la hipótesis de la necesidad de PBP2a para que se produzca la sinergia.

Se propone que el mecanismo de sinergia observado para ME/PI/TZ es el resultado de la activación alostérica de la PBP2a por parte de sus componentes, de forma similar a lo informado para la ceftarolina[10,11]. De hecho, se determinó que el meropenem se une al sitio alostérico de la PBP2a con una constante de disociación (K_d) de 270 ± 80 µM (equivalente a 104 ± 31 µg/ml). La concentración plasmática máxima media en humanos sanos tras una inyección intravenosa en bolo de meropenem a la dosis recomendada de 1 g es de 112 µg/ml[44]. Las concentraciones de meropenem alcanzadas clínicamente están por encima de la K_d; por lo tanto, a estas concentraciones la unión de meropenem al sitio alostérico de PBP2a desencadenaría la apertura del sitio activo de PBP2a, permitiendo el acceso a su sitio activo de transpeptidasa para la acilación/inactivación ya sea por otra molécula de meropenem o por otros β-lactámicos en la combinación[8,10,45].

La actividad altamente sinérgica de ME/PI/TZ contra SARM N315 se recapituló contra todos en un panel de 72 aislados

clínicos de SARM con múltiples tipos de SCCmec representados **(Tabla 3A-B).** La MIC de la combinación contra los aislados clínicos osciló entre 0,4-33,3 µg/ml para cada componente, con una media de 9,7 µg/ml, y una MIC_{50} y MIC_{90} de 3,7 µg/ml y 33,3 µg/ml, respectivamente **(Tabla 4A).**

Ejemplo 2. Solidez mecanística de la sinergia utilizando carbapenems alternativos, penicilinas e inhibidores de la β-lactamasa contra el SARM

Se determinó que la sinergia observada no se limita a los antibióticos ensayados, sino que puede generalizarse a sus respectivas clases de β-lactámicos, probando el SARM N315 y aislados clínicos representativos de SARM contra otras combinaciones de carbapenem/penicilina/inhibidores de β-lactamasas. Se encontró que el tratamiento de SARM N315 con imipenem/piperacilina/clavulanato (IM/PI/CV) muestra un sinergismo igual o mayor al de ME/PI/TZ. Meropenem/amoxicilina/tazobactam (ME/AX/TZ) mantiene una alta sinergia sólo en el SARM N315 (FICI = 0,04), y el aislado clínico de SARM muestra una menor sinergia (FICI = 0,55) **(Tabla 2B).** Las CMI de los componentes de estos triples sustituidos están todas por debajo de las concentraciones plasmáticas humanas máximas medias de los mismos *in vivo*[46,47]. Al igual que ME/PI/TZ, IM/PI/CV muestra una actividad menos que aditiva contra MSSA ATCC 29213 (FICI = 1,14) **(Tabla 2B-C).** Estos resultados soportan aún más la necesidad de la presencia del producto del gen *mecA* PBP2a con su alosterismo concomitante para la sinergia, debido a la falta de sinergia de las combinaciones de inhibidores de carbapenem/penicilina/β-lactamasas en S. *aureus* susceptibles a la meticilina .

También se probó el efecto de sustituir el componente carbapenem de la combinación por un monobactam o una cefalosporina, otros dos derivados β-lactámicos de última generación. A diferencia de ME/PI/TZ, las combinaciones triples aztreonam/piperacilina/tazobactam (AZ/PI/TZ) y cefepime/piperacilina/tazobactam (CP/PI/TZ) (FICI para ambas = 0,33) presentan niveles de sinergia inferiores a los de PI/TZ solos (FICI = 0,22) **(Tabla 2B),** posiblemente porque el aztreonam (un monobactam) tiene actividad PBP en Gram-negativos [48], mientras que la cefepima (una cefalosporina) se dirige preferentemente a la PBP2 sobre la PBP1 [8].

Confirmamos los objetivos de los constituyentes de ME/PI/TZ reduciendo la expresión de PBP1, PBP2, PBP2a o PBP3 utilizando una estrategia de ARN antisentido inducible por xilosa en el fondo de la cepa SARM COL [49]. Cuando se atenuaron los niveles de expresión de PBP2a, la cepa se comportó como un S. *aureus* susceptible a la meticilina y fue sensible a todos los β-lactámicos probados **(FIG. 6A-C).** Cuando se probaron el meropenem, la piperacilina y el tazobactam contra la cepa antisentido *pbpA* , sólo el meropenem mostró mayores zonas de inhibición bajo la inducción de xilosa, confirmando que la PBP1 es un objetivo del meropenem **(FIG. 6D-E).** Para la cepa antisentido de *pbp2* , tanto el meropenem como la piperacilina mostraron una mayor eficacia bajo la inducción de xilosa, demostrando que cada uno de ellos tiene cierta actividad contra la PBP2 **(FIG. 6F-G).** No se observó ningún efecto con la cepa antisentido de *pbp3* , lo que concuerda con la hipótesis de que la actividad de ME/PI/TZ se centra en la interrupción de PBP1, PBP2 y PBP2a **(FIG. 6H-I).** Las cepas antisentido en todos los casos, excepto el de *pbp3* , mostraron sensibilización a la triple combinación, lo que subraya la sinergia observada.

Ejemplo 3. Falta de adaptación a meropenem/piperacilina/tazobactam durante más de 10 días para SARM N315.

El desarrollo y la propagación de la resistencia pueden reducir drásticamente la eficacia y la longevidad de una terapia antimicrobiana. Se demostró que ME/PI/TZ suprime la evolución de la resistencia en SARM utilizando pases seriados en concentraciones antibióticas subinhibitorias de la triple combinación y de cada uno de sus componentes. Para modelar con mayor precisión un tratamiento clínico *in vitro* e *in vivo,* se aplicaron estos fármacos a dosificaciones fijas durante periodos prolongados, como ocurre en el tratamiento clínico, y no a dosificaciones crecientes en el tiempo. Durante el experimento de 11 días, no se observaron ninguna evolución de la resistencia en SARM N315 a ME/PI/TZ. Por el contrario, se observó la evolución de la resistencia contra todas las combinaciones dobles y los constituyentes simples en un plazo de 1 a 8 días, lo que coincide con trabajos anteriores[23,50] **(FIG. 2).** Se observaron células viables en todas las condiciones por encima de la MIC inicialmente determinada para los dobles y los simples, pero no para las condiciones a o por encima de la MIC inicial para ME/PI/TZ. Se observaron aumentos en las tasas de crecimiento a lo largo del tiempo en todos los dobles y sencillos, mientras que la tasa de crecimiento de N315 en sub-MIC ME/PI/TZ a lo largo del tiempo no cambió durante todo el experimento, equivalente al control sin fármacos **(FIG. 2)** [23]. Además, N315 expuesta a la doble combinación ME/PI mostró un aumento del triple de la CMI después del primer día, lo que indica que había células viables después del primer día, pero que no crecían hasta más pases y adaptación. La determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) confirmó que la triple combinación ME/PI/TZ es bactericida contra el SARM N315 **(Tabla 4B).** En conjunto, estos resultados demuestran la supresión de la aparición de nuevas resistencias contra ME/PI/TZ en SARM N315.

Ejemplo 4. Las sensibilidades colaterales recíprocas de los componentes de estas combinaciones subyacen a la supresión de la adaptación.

Para determinar si la sensibilidad colateral era un factor en la supresión de la adaptación de ME/PI/TZ, se analizaron los efectos de la exposición previa de SARM N315 a una serie de β-lactámicos sobre la susceptibilidad a los otros componentes **(FIG. 3** y **FIG. 7).** Se observó que había una fuerte sensibilidad colateral recíproca entre meropenem y piperacilina, y entre piperacilina y ME/TZ, mientras que PI/TZ sensibilizó a SARM N315 a meropenem, pero no recíprocamente. La sensibilidad colateral a la piperacilina también fue conferida por la exposición previa al tazobactam,

pero no a la inversa. Curiosamente, no se encontró ninguna sensibilidad colateral al tazobactam después de la exposición a otros compuestos simples o dobles. Los perfiles de sensibilidad y resistencia colaterales de la amoxicilina y la piperacilina son casi idénticos, y la adaptación al meropenem también sensibiliza al SARM N315 a la amoxicilina **(FIG. 3** y **FIG. 7).** La piperacilina también mostró una sensibilización colateral al imipenem, un carbapenem aún más potente contra el SARM N315. Sin embargo, ninguna de las cefalosporinas sometidas a pruebas de sensibilidad colateral por parte de las combinaciones de carbapenemas/inhibidores de penicilina/β-lactamasas o de sus componentes dio lugar a una sensibilidad, sino que se observó un aumento de la resistencia o de la indiferencia. Estos resultados confirman que la supresión de la resistencia observada por la sensibilidad colateral es específica de las clases de fármacos constituyentes de ME/PI/TZ.

Ejemplo 5. El SARM N315 adaptado sufre alteraciones genómicas a gran escala.

Se utilizó la secuenciación del genoma completo para investigar la base genómica de los fenotipos de sensibilidad y resistencia de las cepas de SARM N315 de tipo silvestre y adaptadas. No se encontraron mutaciones en los genes de la PBP o de la β-lactamasa en ninguno de los aislados de SARM N315 adaptados. Sin embargo, la ausencia de cobertura de lectura identificó que el plásmido de penicilinasa pN315 se perdió en los aislados adaptados a tazobactam solo (100 µg/ml) y a ME/TZ (11,1 µg/ml cada uno) **(FIG. 4A).** Esta pérdida de plásmidos se produjo mucho más rápidamente que con las técnicas anteriormente descritas para curar los plásmidos del SARM, tal como el calor elevado y el tratamiento con SDS [51]. En los aislados adaptados a PI/TZ, se observó que aproximadamente 400 kb del cromosoma N315 de SARM (GenBank ID: BA000018.3) se duplicó tras el análisis de la profundidad de cobertura de las lecturas, desde las posiciones genómicas aproximadas de 2.100.000 a 2.550.000 pb. Curiosamente, este intervalo contiene varios genes putativos y confirmados implicados en la síntesis de la pared celular, incluyendo *ddlA* D-Ala-D-Ala ligasa **(FIG. 8).**

La pérdida de pN315 en SARM N315 se correlaciona con una mayor sensibilidad a la piperacilina y la amoxicilina, ambas penicilinas que deberían ser sensibles a la β-lactamasa de clase A *blaZ* (PC1) codificada en el plásmido. Sin embargo, la pérdida de pN315 también resulta en un aumento de la resistencia a tazobactam solo y a ME/PI/TZ **(FIG.** 3, **FIG. 7, Tabla 5A).** Un posible vínculo entre la presencia de pN315 y la actividad ME/PI/TZ es la conocida diafonía reguladora entre los represores MecI y BlaI y su objetivo compartido del operón mec [52-54.] Para comprobar el efecto de la pérdida de pN315 en la expresión de genes que se sabe que son importantes para la actividad ME/PI/TZ, se realizó un análisis de qRT-PCR de las cepas adaptadas y de tipo silvestre de SARM N315 **(FIG. 4B).** Se determinó que la expresión de la β-lactamasa *blaZ* en el plásmido pN315 dentro del SARM N315 de tipo silvestre es constitutiva, pero en los clones adaptados al tazobactam no se observó expresión de *blaZ*, lo que es coherente con la pérdida de pN315 en estos clones. También se encontró que la expresión de *mecA* es constitutiva en el aislado *blaZ-null* SARM N315 que se adaptó a tazobactam a 100 µg/ml, lo que concuerda con la desregulación del operón mec a través de la pérdida de pN315 y del operón *bla* . Por último, se encontró que el tazobactam es un fuerte inductor de *mecA* en el SARM N315 de tipo silvestre, a niveles similares a la expresión constitutiva de *mecA* observada en la condición *blaZ-null*.

Ejemplo 6. Sinergia de ME/PI/TZ cuando SARM N315 ha desarrollado resistencia a los componentes.

A continuación, se examinó el papel que tiene la resistencia a los componentes de ME/PI/TZ en su eficacia contra el SARM **(Tabla 5A**). La exposición previa de SARM N315 a la piperacilina a 33,3 o 100 µg/ml mostró una posterior sensibilización de la cepa a ME/PI/TZ, de 3,7 a 1,2 µg/ml para cada componente. Sin embargo, la exposición previa de SARM N315 a ME/TZ (11,1 µg/ml cada uno) o a meropenem solo (33,3 µg/ml) mostró un aumento de nueve veces en los niveles de resistencia a ME/PI/TZ (aumentando de 3,7 a 33,3 µg/ml para cada componente). La exposición a tazobactam solo dio ganancias intermedias de resistencia a ME/PI/TZ hasta el día 7 (11,1 µg/ml cada uno), y una mayor resistencia al día 11 (33,3 µg/ml cada uno). La exposición previa a ME/PI o PI/TZ sólo generó un aumento del triple de la MIC (de 3,7 a 11,1 µg/ml) durante los 11 días.

A pesar de las elevadas MIC a ME/PI/TZ en los aislados adaptados a los fármacos componentes, la combinación de triple fármaco siguió manteniendo la sinergia en todos los aislados adaptados **(Tabla 5B).** Esto es coherente con la actividad farmacológica sinérgica dentro del intervalo de MIC de ME/PI/TZ observado para los 72 aislados clínicos de SARM **(Tabla 4),** en relación con sus MIC de un solo fármaco. Estos resultados demuestran que incluso cuando se pueden seleccionar cambios genómicos que permiten la resistencia a los subcomponentes, se mantiene la actividad sinérgica global de la combinación de triple fármaco. En contraste con el trabajo reciente con una cepa [36] de E. *coli* no patógena, no se observó ningún cambio en el perfil general de interacción de fármacos de ME/PI/TZ con respecto a la sinergia con el aumento de la resistencia a cualquier fármaco componente.

Ejemplo 7. ME/PIT/TZ es tan eficaz como el linezolid contra el SARM *in vivo.*

A continuación, probamos si ME/PI/TZ o sus componentes pueden ser eficaces en el tratamiento de las infecciones por SARM *in vivo* utilizando un modelo de peritonitis en ratones neutropénicos. La sangre tomada a las 11 h después de la infección de los ratones que fueron tratados con ME/PI/TZ, ME/PI (67 mg/kg cada uno) o linezolid (30 mg/kg) no produjo colonias en placas ni crecimiento en cultivos líquidos, lo que indica la eliminación de la infección **(FIG. 5, Table 7).** Todos los ratones (n =6/grupo) de cada uno de estos tratamientos sobrevivieron durante seis días después de la

infección (duración total del estudio con ratones). La eficacia de ME/PI/TZ y ME/PI fue similar a la de la monoterapia con linezolid con base en el aclaramiento de la infección por SARM y la supervivencia de todos los ratones tratados en comparación con el vehículo (p = 0,02, prueba exacta de Fisher).

En contraste con el rescate completo de los ratones infectados por ME/PI/TZ, ME/PI, o linezolid, varios ratones tratados con ME/TZ, PI/TZ, o meropenem-solo, y todos los ratones tratados individualmente con piperacilina o tazobactam sucumbieron a la infección, la mayoría dentro de 48h **(FIG. 5, Table 7).** El tratamiento con estos otros regímenes farmacológicos no fue significativamente diferente al tratamiento con el vehículo (p > 0,05, prueba exacta de Fisher) **(Tabla 6A)** , donde todos los ratones también sucumbieron a la infección en 48 h.

Se probaron los cultivos de SARM N315 de la sangre extraída de ratones tratados con meropenem, piperacilina o vehículo para sus CMI *in vitro* contra ME/PI/TZ y sus fármacos individuales constituyentes para determinar si la adaptación ocurrió durante el paso *in vivo.* Los cuatro aislados de SARM N315 analizados presentaron idénticas CMI para la triple ME/PI/TZ y todos los fármacos que la componen, y por tanto idéntica sinergia **(Tabla 6B).** Estos datos sugieren que no se produjo ninguna adaptación en estas cepas para superar la triple ME/PI/TZ probada en el paso de 11 horas *in vivo.*

Discusión para los Ejemplos.

Se ha demostrado que las combinaciones antibacterianas triples que contienen carbapenems, penicilinas e inhibidores de la β-lactamasa se dirigen a múltiples nodos del mismo sistema celular (síntesis de la pared celular) y son altamente sinérgicas y bactericidas contra diversas cepas de SARM *in vitro,* a concentraciones clínicamente alcanzables. Esto contrasta con los trabajos recientes que demuestran que la sensibilidad colateral y la sinergia surgen de las combinaciones de clases de fármacos que trabajan contra objetivos celulares ortogonales sólo en cepas de laboratorio no patógenas[25,36]. Dado que los carbapenems y otros fármacos a alta concentración podrían tener efectos tóxicos, la reducción de las dosificaciones por fármaco a través de la sinergia mitiga las posibles toxicidades[55]. Nuestras pruebas de tablero de control tridimensional confirmaron que las concentraciones de entrada óptimas para ME/PI/TZ se administran en una relación de 1:1:1 (2 µg/ml cada una) contra SARM N315, que está por debajo de los puntos de ruptura de susceptibilidad para estos compuestos contra S. *aureus* susceptible a la meticilina y es una reducción de 8 a 64 veces en las concentraciones de entrada para estos fármacos anteriormente inactivos contra esta cepa SARM altamente resistente. Los análisis mecanísticos apoyan la hipótesis de que la focalización de PBP1 por meropenem, la focalización de PBP2 por piperacilina, la protección de piperacilina por tazobactam contra la escisión de β-lactamasas, y la apertura alostérica del sitio activo de PBP2a por meropenem para la inhibición por otra molécula de antibiótico en la combinación, resultan en sinergia al perturbar simultáneamente múltiples componentes del sistema de síntesis de la pared celular de SARM **(FIG. 9**).

También se ha demostrado de forma preliminar que esta combinación tiene actividad en un modelo *in vivo* de SARM neutropénico altamente letal, demostrando que esta triple combinación de β-lactámicos clínicamente aprobados puede eliminar la infección de forma similar a monoterapias sustancialmente más caras como el linezolid. Los niveles plasmáticos de meropenem observados en ratones se correlacionan bien con los niveles plasmáticos del fármaco en humanos sanos[56], y el meropenem alcanzaría la Kd a estas concentraciones clínicamente alcanzables para desencadenar el alosterio de apertura del sitio activo de PBP2a, proporcionando accesibilidad para la inhibición por meropenem y otros β-lactámicos en la combinación [9,10].

En particular, la combinación doble ME/PI eliminó la infección por SARM N315 *in vivo* de forma similar a ME/PI/TZ y linezolid en 11 h. *In vitro* se observaron altas puntuaciones de sinergia y sensibilidad colateral recíproca para esta combinación, similar a lo observado para ME/PI/TZ, pero ME/PI no suprimió la evolución de la resistencia en la misma medida que ME/PI/TZ. Esta propiedad puede no haber sido relevante en este modelo de infección agresiva, pero puede ser importante para los tiempos de tratamiento más largos que se observan en las infecciones humanas con SARM. También es probable que ME/PI/TZ sea eficaz a concentraciones totales más bajas que ME/PI debido a su mayor sinergia. Una exposición más prolongada de la cepa N315 al componente de tazobactam de ME/PI/TZ *in vivo* también puede promover la expulsión del plásmido pN315 con la sensibilización concomitante al componente de penicilina, en consonancia con los resultados *in vitro* para la sensibilidad colateral y la supresión de la adaptación. De hecho, para abordar de forma más adecuada esta cuestión, habría que probar la posible evolución de la resistencia *in vivo* a largo plazo bajo concentraciones subletales de los fármacos en importantes experimentos de seguimiento con ratones.

Nuestros sólidos resultados mecanísticos *in vitro* y los resultados preliminares *in vivo* para la actividad de ME/PI/TZ sugieren que esta combinación puede estar disponible de inmediato para su uso en la clínica, ya que incluye fármacos actualmente aprobados por la FDA, que habían encontrado su obsolescencia como monoterapias contra el SARM hace décadas. Sin embargo, las características mecánicas adicionales de la combinación que se mostraron *in vitro* (sinergia, supresión de la resistencia durante periodos más largos de dosificación, sensibilidad colateral, etc.) requerirán un número sustancialmente mayor de pruebas *in* vivo para respaldar la actividad prometedora pero preliminar observada en nuestro modelo de ratón neutropénico altamente agresivo.

Se observó que la alta resistencia a meropenem o tazobactam reduce ligeramente la eficacia de ME/PI/TZ,

manteniendo su sinergia, y el análisis de la evolución de la resistencia no puede dar cuenta de los genes de resistencia adquiridos horizontalmente que podrían romper la relación entre meropenem, piperacilina y tazobactam. A pesar de estas advertencias, se cree que la combinación ME/PI/TZ es una terapia anti-SARM inmediatamente viable, y se respalda la exploración mecanística adicional de la supuesta eficacia superior de las combinaciones de antibióticos de alto orden que son a la vez sinérgicas y codificadas por constituyentes colateralmente sensibles. Al tener una actividad similar a la del linezolid contra el SARM *in vivo,* la eficacia potencial de ME/PI/TZ reabre amplias perspectivas para el uso clínico de los β-lactámicos contra los estafilococos. También sugiere que esta línea de investigación sobre la reutilización de antibióticos existentes en combinaciones sinérgicas cuidadosamente diseñadas abordaría las necesidades clínicas inmediatas, ya que estos agentes ya están aprobados para el uso humano. La aparición de resistencia a cualquier antibiótico o a cualquier combinación de antibióticos es inevitable. Sin embargo, como se ha puesto de manifiesto en este estudio, las combinaciones compuestas por características clave de interacción entre fármacos pueden ser una herramienta para mitigar la aparición de resistencias a los antibióticos, preservando la utilidad de los agentes existentes que se tienen a disposición en el arsenal farmacológico.

Procedimientos para los ejemplos

Estudios microbiológicos: El SARM N315 fue un regalo del Dr. Steven Gill, de la University of Rochester, Rochester, NY, Estados Unidos. S. aureus ATCC 29213 se adquirió de la American Type Culture Collection. Los aislados clínicos de SARM desidentificados se seleccionaron al azar del banco de cepas clínicas del Hospital Barnes-Jewish, St. Los ensayos de concentración inhibitoria mínima (MIC) para la inhibición del crecimiento se realizaron siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [43.] Brevemente, se seleccionaron 23 compuestos antibacterianos (Tabla Suplementaria 1) con base en la cobertura de las principales clases de fármacos, incluyendo tres compuestos no clasificados como antibióticos para uso humano, pero con propiedades antibacterianas conocidas. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración madre de 50 mg/ml. Excepciones: Sulfometurón a 20 mg/ml en DMSO; Tobramicina, D-cicloserina y colistina a 50 mg/ml en H2O y filtrado a 2 µm. Los 23 compuestos se formularon en las 253 posibles combinaciones únicas por parejas en proporciones fijas y a concentraciones de 100x en el disolvente. Para aumentar el intervalo de concentraciones ensayadas en busca de posibles interacciones sinérgicas o antagónicas de los fármacos (>2.000 veces), los licores madre de fármacos se dispusieron en series de dilución triple en ocho filas en placas de 96 pocillos Costar master drug, utilizando un manipulador robótico de líquidos BioMek FX (Beckman Coulter, Inc.). A continuación, los fármacos se mezclaron 1:100 en placas de 96 pocillos que contenían 200 µl/pocillo de caldo Mueller-Hinton ajustado a los cationes (CAMHB). Todos los pocillos para el ensayo de susceptibilidad a los fármacos se inocularon con ~1 µl de cultivo bacteriano en fase media-log a 0,5 McFarland estándar (~2 $\times 10^8$ UFC/ml) y se cultivaron a 37 °C durante 24 h. El punto final de crecimiento a 37 °C después de 24 h se determinó mediante la densidad óptica a 600 nm ≥0,1 utilizando un lector Synergy H1 (BioTek, Inc.).

La sinergia de las combinaciones de antibióticos se determinó mediante el procedimiento del índice de concentración inhibitoria fraccional (FICI) [57,58.] Mediante este procedimiento, la MIC del compuesto antibiótico en combinación se divide por la MIC del compuesto solo, lo que da como resultado la contribución fraccional de cada componente farmacológico en la combinación. Se suman los cocientes de todas las combinaciones y se puntúan las interacciones farmacológicas mediante la fórmula: $FICI = (MIC\ Acomb_{A\ B\ C})/MIC_{agente\ A} + (MIC\ Bcomb_{A\ B\ C})/MICa_{gente\ B} + (MIC\ C_{combA\ B\ C)}/MIC_{agente\ C}$. Las combinaciones seleccionadas por pares contra el SARM se combinaron con cada uno de los 21 fármacos individuales restantes para hacer combinaciones triples, formuladas y probadas de forma idéntica a las combinaciones dobles. La sinergia de las combinaciones se confirmó mediante mediciones por triplicado de las condiciones del fármaco en la MIC. Basándose en su alta sinergia contra el SARM N315 en el cribado disperso, se seleccionaron ME/PI/TZ y sus componentes para una mayor caracterización. La prueba de susceptibilidad final de ME/PI/TZ y sus componentes se realizó utilizando una dilución doble de 128 a 2 µg/ml para cada componente

La concentración bactericida mínima (CBM) para ME/PI/TZ en SARM N315 se determinó mediante pocillos duplicados de ME/PI/TZ a las concentraciones indicadas en medio CAMHB, inoculados con ~5 $\times^{105}$ UFC/ml de SARM N315 en fase media logarítmica e incubados a 37 °C durante 24 h. Se sembraron 100 µl de una dilución 1:100 de 50 µl extraída de pozos duplicados de ME/PI/TZ en placas de agar Mueller-Hinton (MHA) y se incubaron durante toda la noche durante 24 h. La ausencia de crecimiento de colonias en o dos diluciones por encima de la MIC confirmó la actividad bactericida, según la definición del CLSI [59]. Meropenem (CAS 96036-03-2) y clavulanato (CAS 61177-45-5) se obtuvieron de AK Scientific, Inc. (Union City, CA, Estados Unidos). Se obtuvieron piperacilina (CAS 59703-84-3), tazobactam (CAS 89786-04-9), imipenem (CAS 74431-23-5) y amoxicilina (CAS 26787-78-0) de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos).

Ensayos de adaptación y resistencia cruzada: Se cultivó 414 SARM N315 en 150 µl/pocillo de CAMHB con agitación constante a 37 °C y se pasó durante 11 días en placas de 96 pocillos idénticas que contenían diluciones triples replicadas de ME/PI/TZ, ME/PI, ME/TZ, PI/TZ, ME, PI y TZ. Las concentraciones máximas de las combinaciones de fármacos fueron de 33,3 µg/ml para cada componente, mientras que las concentraciones máximas de los fármacos individuales fueron de 100 µg/ml. Para comprobar la viabilidad de las células, al final del ensayo en el día 11, todos los pocillos de la placa se fijaron con un replicador estéril de 96 clavijas y se transfirieron sólo a CAMHB. Después del pasaje, las placas se llenaron 1:1 con 30 % de CAMHB/glicerol y se congelaron a -80 °C para su posterior análisis.

La tasa de crecimiento de los aislados a lo largo de los pases en cada condición se determinó mediante el mejor ajuste lineal de la fase de crecimiento exponencial convertida en logaritmo. Siguiendo a Hegreness et al [23], se consideró que los pocillos que contenían células en condiciones farmacológicas cuyas tasas de crecimiento eran >0,2 h-1 entre el primer día y la media de los últimos seis días de crecimiento se adaptaban significativamente a las condiciones y se generó una tasa de adaptación α. Se eligieron retrospectivamente los aislados adaptados de cada combinación o compuesto único en los pozos que mostraban un aumento de la MIC o de la tasa de crecimiento, los aislados congelados se sometieron a un procedimiento de estratificación en placas de agar para obtener colonias individuales, se volvieron a cultivar en condiciones de caldo idénticas a aquellas en las que crecieron originalmente y, a continuación, se volvieron a inocular en placas estériles de 96 pocillos idénticas a las placas originales de 431 días.

Perfil de expresión con qRT-PCR: Los aislados de SARM N315 de tipo silvestre y adaptados se cultivaron por triplicado en frascos de 100 ml hasta la mitad de la fase lógica en CAMHB +/piperacilina a 11,1 µg/ml o tazobactam a 33,3 µg/ml. Para cosechar las células a mitad de la fase logarítmica, cada frasco de cultivo se dividió en 2 tubos con tapa de rosca de 50 ml, se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 3.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se combinaron las pellas cuidadosamente con una pipeta serológica de 2 ml. Se añadió 1 ml de reactivo RNAprotect Bacteria (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos) a las pellas para estabilizar el ARN, se agitó brevemente en vórtex y se incubó durante 5 minutos a RT. Tras la incubación, los tubos se volvieron a centrifugar a 4 °C durante 10 minutos a 3.500 rpm, se eliminó el sobrenadante y las pellas se almacenaron a -80 °C. El ARN total se extrajo mediante el siguiente protocolo:

(1) Resuspender las pellas de células en 500 µl de tampón B (200 mM NaCl, 20 mM EDTA).
(2) Añadir 210 µl de SDS al 20 %.
(3) Añadir un volumen de ~250 µl de perlas de vidrio estériles lavadas con ácido (Sigma, Inc.).
(4) Añadir 500 µl de Fenol:Cloroformo:IAA.
(5) Batido de perlas en "alto" durante 5 minutos.
(6) Centrifugar a 8000 rpm a 4°C durante 3 minutos (para separar las fases).
(7) Eliminar la fase acuosa superior y transferirla a un nuevo tubo.
(8) Añadir 700 µl de isopropanol.
(9) Añadir 70 µl de NaOAc 3M, mezclar bien por inversión.
(10) Centrifugar a 4 °C, máximo de rpm, durante 10 min.
(11) Aspirar el sobrenadante.
(12) Añadir 750 µl de EtOH al 70 % helado, centrifugar a las máximas rpm a 4 °C durante 5 minutos.
(13) Aspirar el sobrenadante, para dejar secar el EtOH, dejar los tubos abiertos en la zona libre de RNasa.
(14) Añadir 100 µl de agua libre de nucleasas a cada tubo y resuspender (poner los tubos en un bloque térmico a 50 °C, agitando periódicamente).
(15) Añadir 12 µl de tampón TURBO-DNasa (Ambion, Inc.) y 10 µl de TURBO-DNasa libre de RNasa a cada muestra, e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
(16) Purificar las muestras utilizando las columnas MEGAClear y el kit según el protocolo del fabricante.
(17) Volver a purificar las muestras utilizando el tampón DNasa Baseline-ZERO (Epicentre, Inc.) y 10 µl de DNasa Baseline-ZERO, siguiendo el protocolo del fabricante.
(18) Eluir las muestras finales de ARN con 30 µl de tampón TE, pH 7,0.

El ADNc de primera cadena se sintetizó a partir del ARN total con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript para RT-PCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). La qRT-PCR de pbp2, mecA y blaZ en SARM N315 se realizó contra gyrB utilizando SYBR Select Master Mix para CFX (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA, Estados Unidos). Secuencias de cebadores utilizadas (0,3 µM cada una):

pbp2_F: CGTGCCGAAATCAATGAAAGACGC, SEQ ID NO:1
pbp2_R: GGCACCTTCAGAACCAAATCCACC; SEQ ID NO:2
mecA_F: TGGAACGATGCCTATCTCATATGC, SEQ ID NO:3
mecA_R: CAGGAATGCAGAAAGACCAAAGC; SEQ ID NO:4
blaZ_F: TTTATCAGCAACCTTATAGTCTTTTGGAAC, SEQ ID NO:5
blaZ_R: CCTGCTGCTTTCGGCAAGAC, SEQ ID NO:6
gyrB_F: CGATGTGGATGGAGCGCATATTAG, SEQ ID NO:7
gyrB_R: ACAACGGTGGCTGTGCAATATAC. SEQ ID NO:8
Protocolo CFX: 2 min @ 50 °C, 2 min @ 95 °C, (15 s @ 95 °C, 1 min @ 60 °C) x 40 ciclos. La expresión génica se determinó mediante el procedimiento ΔΔCt de cuantificación normalizada 60, donde Ct indica el número de ciclo en el que la fase de crecimiento exponencial aumenta por encima del umbral de la señal de fluorescencia.

Preparación de la biblioteca de secuenciación: El ADN genómico (ADNg) se extrajo del SARM N315 de tipo silvestre y del adaptado utilizando la digestión con lisostatina y la extracción con fenol:cloroformo:IAA como se indica a continuación:

(1) Extraer alícuotas de 1 ml de cultivos agitados de 5 ml de cepas de S. *aureus* durante la noche, centrifugar a 13.000 rpm durante 3 minutos, verter los medios, añadir 1 ml adicional de cultivo y repetir.

(2) Añadir 500 µl de tampón 2X A (NaCl 200 mM, Tris 200 mM, EDTA 20 mM) a 4 °C a las células peladas y agitar brevemente para resuspender las células.
(3) Añadir 2,5 µl de 10 mg/ml (200x) de lisostafina (Sigma-Aldrich, Inc.) a los tubos.
(4) Mezclar y centrifugar los tubos, colocarlos en un baño seco a 37 °C durante 1 hora.
(5) Enfriar rápidamente la microcentrífuga a 4 °C.
(6) Añadir ~250 µl de perlas de circonio de 0,1 mm (BioSpec Products, cat# 1107910).
(7) Añadir 210 µl de SDS al 20 %.
(8) Añadir 500 µl de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1, pH 7,9), enfriar las muestras en hielo.
(9) Batido de perlas al "homogeneizar" durante 4 minutos (batir 2 minutos, hielo 2 minutos, batir 2 minutos).
(10) Girar a 6.800 rcf (4 °C) durante 3min.
(11) Hacer girar las columnas PLG (5Prime, cat#2302820) a velocidad máxima (20.800 rcf) durante 30 s a TA mientras se espera.
(12) Transferir la fase acuosa (~500 µl) al tubo de gel de bloqueo de fase prehilado.
(13) Añadir una cantidad igual (500 µl) de fenol:cloroformo:IAA (25:24:1, pH 7,9) al tubo y mezclar por inversión (NO VORTEX).
(14) Centrifugar los tubos a velocidad máxima (20.800 rcf) (RT) durante 5 minutos.
(15) Transferir la fase acuosa (~500 µl) a un nuevo tubo Eppendorf.
(16) Añadir 500 µl de isopropanol a -20 °C.
(17) Añadir 50 µl (1/10 vol.) de NaOAc 3M a pH 5,5 (Ambion, AM9740), y mezclar bien por inversión.
(18) Almacenar a -20 °C durante al menos 1h (es preferible, pero no necesario, pasar la noche).
(19) Centrifugar a velocidad máxima a 4 °C durante 20 minutos.
(20) Lavar la pella con 500 µl de EtOH al 100 % (TA) y centrifugar a 4 °C durante 3 minutos.
(21) Eliminar cuidadosamente con una pipeta el EtOH, secar al aire >15 min.
(22) Añadir 30 µl de TE (Ambion, AM 9861), incubar a 50 °C durante 5 min.
(23) Pase el ADN por la columna de purificación QIAQuick PCR de QIAGEN con las siguientes modificaciones: Tratamiento con RNasa A al comienzo de la limpieza de la columna. Combinar 4 µl de RNasa de Qiagen (100 mg/ml) con cada 300 µl de tampón PB utilizado, incubar en tampón PB/RNasa durante 15 min a TA.
(24) Dejar reposar el tampón de lavado PE en la columna a RT durante 2 minutos, eludir el ADNg con 35 µl de tampón EB precalentado a 55 °C, dejando reposar durante 1 minuto antes del centrifugado final.

Se han esquilado 500 ng de ADN total de cada genoma a fragmentos de ~300 pb en nueve rondas de esquilado de diez minutos cada una en el BioRuptor XL. En cada ronda el ajuste de potencia fue "H" y las muestras se trataron durante 30 s y se dejaron reposar durante 30 s. Cada muestra se concentró utilizando el kit de purificación de PCR Qiagen MinElute según el protocolo del fabricante. La reparación final de los fragmentos de ADN esquilados se inició con la adición de 2,5 µl de tampón de ligasa de ADN T4 con 10 mM de ATP (NEB, B0202S), 1 µl de dNTPs de 1 mM (NEB), 0,5 µl de polimerasa T4 (NEB, M0203S), 0,5 µl de PNK T4 (NEB M0201S) y 0,5 µl de polimerasa Taq (NEB, M0267S). Esta mezcla se incubó a 25 °C durante 30 minutos y luego a 75 °C durante 20 minutos. A continuación, se añadieron adaptadores con código de barras a la solución junto con 0,8 µl de ADN ligasa T4 (NEB, M0202M), con el fin de ligar los adaptadores a los fragmentos de ADN. Esta solución se incubó a continuación a 16 °C durante 40 minutos y luego a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, se purificó el ADN ligado con el adaptador utilizando el kit de purificación de PCR Qiagen MinElute según el protocolo del fabricante.

A continuación, los fragmentos de ADN se seleccionaron por tamaño en un gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X teñido con el colorante Biotium GelGreen (Biotium). Los fragmentos de ADN se combinaron con 2,5 µl de colorante de carga naranja 6x antes de cargarlos en el gel. El ADN ligado al adaptador se extrajo de los cortes de gel correspondientes al ADN de 250-300 pb utilizando un kit de extracción de gel QIAGEN MinElute según el protocolo del fabricante. El ADN purificado se enriqueció mediante PCR utilizando 12,5 µl de 2x Phusion HF Master Mix y 1 µl de 10 µM Illumina PCR Primer Mix en una reacción de 25 µl utilizando 1 µl de ADN purificado como molde. El ADN se amplificó a 98 °C durante 30 s, seguido de 18 ciclos de 98 °C durante 10 s, 65 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s, con una extensión final de 5 min a 72 °C. A continuación, se midió la concentración de ADN con el fluorímetro Qubit y se agruparon 10 nmol de cada muestra (hasta 106 muestras por carril de secuenciación). Posteriormente, las muestras se sometieron a la secuenciación de 101 pb de Illumina HiSeq-2500 Paired-End (PE) en el GTAC (Genome Technology Access Center, Washington University en San Luis) a 9 pmol por carril.

Análisis de la secuencia del ADN: **Alineación y llamada de variantes.** Para el SARM N315 de tipo silvestre y adaptado, todas las lecturas de secuenciación de cada genoma se desmultiplexaron por código de barras en compartimentos genómicos separados. Las lecturas se recortaron para eliminar la secuencia adaptadora y las bases de los extremos con una puntuación de calidad inferior a 19. Las lecturas inferiores a 31 pb tras el recorte de calidad no se utilizaron en el análisis posterior. Todas las lecturas se asignaron al cromosoma de *Staphylococcus aureus* subsp. aureus N315 (ID de GenBank: BA000018.3) y el plásmido pN315 (GenBank ID: AP003139) (comando: bowtie2 -x <reference_genome_index_name> -1 <forward_read_file> -2 <reverse_read_file> -q --phred33 --very-sensitive-local -I 200 -X 1000 -S <sam_output>). Las variantes de la referencia se llamaron utilizando los comandos samtools [61] :samtools view -buS <sam_file> | samtools sort -m 4000000000 - <sample_prefix> ### samtools index <bam_file> ### samtools mpileup -uD -f reference_genome> <bam_file> | bcftools view -bcv - > <bcf_file> ### bcftools view <bcf_file>). A continuación, se filtró el archivo de formato de llamada de variantes (VCF) para eliminar los SNP

con una puntuación de calidad inferior a 70 o con una cobertura superior al doble de la cobertura media esperada por base. La ausencia de cobertura de lectura o la cobertura de lectura sobreabundante indicaban la pérdida del plásmido o una gran duplicación, respectivamente. Se determinó que cualquier posición de variante encontrada en la alineación de tipo silvestre era resultado de un error de alineación o que se derivaba de la deriva específica del laboratorio en N315 y se eliminó de todos los demás archivos VCF. A continuación, se comparó la posición de cada variante con las ubicaciones conocidas del ORF en N315 para buscar variantes causales.

Modelo de ratón in vivo de infección por SARM: **Animales.** Se utilizaron ratones hembra ICR de raza (6-8 semanas de edad, 17-25 g de peso corporal; Harlan Laboratories, Inc., Indianápolis, IN, Estados Unidos). Los ratones recibieron Teklad 2019 Extruded Rodent Diet (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis, IN, Estados Unidos) y agua *ad libitum.* Los ratones se mantuvieron en jaulas de policarbonato con mazorca de maíz (The Andersons, Inc., Maumee, OH, Estados Unidos) y lecho Alpha-dri (Shepherd Specialty Papers, Inc., Richland, MI, Estados Unidos) bajo un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad a 22 ± 1 °C. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el University of Notre Dame Institutional Animal Care and Use Committee.

Modelo de peritonitis de ratón neutropénico de infección por SARM. Se administraron dosis de ciclofosfamida (100 µl de 50 mg/ml en solución salina al 0,9 % correspondientes a 200 mg/kg; Alfa Aesar, Ward Hill, MA, Estados Unidos) por vía intraperitoneal (IP) a los 4 días y 1 día antes de la infección. La cepa de S. N315 se filtró en agar Brain-Heart Infusion (BHI; Becton Dickson and Company, Sparks, MD, Estados Unidos) y se cultivó durante la noche a 36 °C. El inóculo bacteriano de SARM N315 se ajustó a aproximadamente 1 $x10^8$ UFC/ml (correspondiente a OD_{540} = 0,5), y luego se diluyó para obtener 2 $x10^7$ UFC/ml. Se preparó una suspensión de mucina porcina al 10 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) y se ajustó a pH 7. Inmediatamente antes de la infección, los inóculos bacterianos se diluyeron 1:1 con mucina al 10 % hasta alcanzar una concentración final de 1 $x10^7$ UFC/ml en mucina al 5 %. A continuación, los ratones fueron infectados por vía IP con 0,5 ml de este inóculo. La dosificación *in vivo* de los compuestos en ratones se comparó con las concentraciones plasmáticas humanas medias o de pico de intervalo de los β-lactámicos estudiados[44,46,47,62,63].

Preparación de antibióticos. El meropenem se obtuvo de AK Scientific, Inc. (Union City, CA, Estados Unidos), la piperacilina y el tazobactam se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos). Linezolid (CAS 165800-03-3) se obtuvo de AmplaChem (Carmel, IN, Estados Unidos). Los antibióticos se disolvieron a una concentración de 16,67 mg/ml en 30 % DMSO/30 % propilenglicol/40 % agua. El linezolid se utilizó como control positivo y se preparó a 7,5 mg/ml. El vehículo (30 % DMSO/30 % propilenglicol/40 % agua) se incluyó como control negativo. Las formulaciones de dosificación se esterilizaron pasando por un filtro de 0,2 µm antes de la inyección.

Aislamiento bacteriano de la sangre. Se comprobó el crecimiento bacteriano de las muestras de sangre por medio de placas y cultivos líquidos. La sangre entera (100 µl, tres muestras por grupo) se extendió en placas de agar Brain-Heart Infusion (BHI) y se incubó a 36 °C durante la noche. Se contaron las colonias y se seleccionaron tres colonias, que crecieron durante la noche en un cultivo BHI líquido a 36 °C, luego se mezclaron 1:1 con 30 % de LB-glicerol y se almacenaron a -80 °C. Las tres muestras de sangre restantes de cada grupo (50 µl) se añadieron a 5 ml de caldo BHI y se incubaron durante la noche a 36 °C. Cuando se observó el crecimiento, los cultivos se mezclaron 1:1 con LB-glicerol al 30 % y se almacenaron a -80 °C.

Análisis estadísticos: Los datos de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) proceden de mediciones por triplicado. Los datos de adaptación se toman de dos experimentos repetidos para cada condición de combinación de fármacos. Los datos de los perfiles de expresión de la qRT-PCR se derivan de tres experimentos repetidos tomados de tres réplicas biológicas cada uno, con el error estándar de medición calculado. Los ratones se trataron en grupos de seis y se determinó el crecimiento de las bacterias mediante cultivo en placa y en caldo por triplicado. Se utilizó la prueba exacta de Fisher con la corrección de Bonferroni para 8 pruebas independientes (comparando cada tratamiento con 610 vehículos).

Tabla 1. 23 compuestos antibacterianos utilizados para formular combinaciones en este estudio.

Compuesto	Mecanismo de selección en las bacterias	Clase de antibiótico	MIC en SARM N315 (µg/ml)
Sulfametoxazol	Vía del ácido fólico	Sulfonamida	100
Trimetoprim	Vía del ácido fólico	Derivado de pirimidina	6,2

(continuación)

Tabla 1. 23 compuestos antibacterianos utilizados para formular combinaciones en este estudio.			
Compuesto	Mecanismo de selección en las bacterias	Clase de antibiótico	MIC en SARM N315 (µg/ml)
Levofloxacina	Síntesis de ADN	Fluoroquinolona	0,4
Bleomicina	Síntesis de ADN	Glicopéptido	>500
Gemfibrozil	Síntesis de lípidos	*Fibrato (agente para la hiperlipidemia)	>200
Sulfometurón	Biosíntesis de aminoácidos	*Herbicida de urea de amplio espectro	>200
Disulfiram	Respuesta al estrés osmótico	*Disulfuro de tiuram (terapéutica antialcohólica)	11,1
Tigeciclina	Síntesis de proteínas	Tetraciclina	0,4
Mupirocin	Síntesis de proteínas	Ácido pseudomónico	0,4
Linezolid	Síntesis de proteínas	Oxazolidinona	3,7
Azitromicina	Síntesis de proteínas	Macrólido	>200
Clindamicina	Síntesis de proteínas	Lincosamida	>500
Cloranfenicol	Síntesis de proteínas	Amphenicol	11,1
Tobramicina	Síntesis de proteínas	Aminoglucósido	>500
Rifampin	Transcripción	Rifamicina	0,4
Vancomicina	Síntesis de la pared celular	Glicopéptido	0,4
Piperacilina	Síntesis de la pared celular	β-lactámicos/Penicilina (Penam)/de amplio espectro	64
Aztreonam	Síntesis de la pared celular	β-lactámicos/ Monobactámicos/Gram-negativos específicos	>500
Cefepime	Síntesis de la pared celular	β-lactama/ Cefalosporina de 4ª generación (Cephem)/de amplio espectro	100
Meropenem	Síntesis de la pared celular	β-lactámicos/carbapenemas/espectro ultra-amplio	16
Tazobactam	Síntesis de la pared celular	inhibidor de la β-lactamasa (Penam)	128
D-Cicloserina	Síntesis de la pared celular	Análogo del aminoácido D-alanina	56
Colistina	Lisis de la membrana celular	Polimixina	500
Los compuestos se agrupan según el mecanismo de acción de la diana. * Compuesto no clasificado formalmente como fármaco antibiótico, pero que tiene propiedades antibacterianas conocidas.			

Tabla 2. Perfil del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (ICIF) de las combinaciones.

A. Criterios de interpretación de la puntuación del FICI.

FICI	Interpretación
≤0.5	Sinergia
>0,5 a <1,0	Sinergia parcial
1	Aditividad
>1,0 a <4,0	Indiferencia
≥4.0	Antagonismo

B. Perfiles FICI de diversas combinaciones triples de carbapenems/penicilinas/inhibidores de la bactamasa contra cepas de SARM y MSSA.

Combinación en la corriente	**ME/ PI/ TZ**	**CP/ PI/ TZ**	**AZ/ PI/ TZ**	**ME/ AX/ TZ**	**ME/ AX/ CV**	**IM/ PI/ CV**	**ME/PI**	**ME/TZ**	**PI/TZ**	**IM/PI**	**IM/CV**	**PI/CV**
SARM N315 SCCmec tipo II	0,11	0,33	0,33	0,04	0,41	0,06	0,44	0,67	0,22	0,15	0,67	0,44
SARM #181 SCCmec tipo II	0,28	ND	ND	0,55	ND	0,11	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MSSA ATCC 29213	1,12	ND	ND	ND	ND	1,14	2,97	8,61	0,36	1,11	1,04	0,43

C. Perfiles de CMI de las mismas combinaciones (µg/ml) Se muestran las combinaciones dobles de constituyentes para su comparación.

Combinación en la corriente	**ME/ PI/ TZ**	**CP/ PI/ TZ**	**AZ/ PI/ TZ**	**ME/ AX/ TZ**	**ME/ AX/ CV**	**IM/ PI/ CV**	**ME/PI**	**ME/TZ**	**PI/TZ**	**IM/PI**	**IM/CV**	**PI/CV**
SARM N315 SCCmec tipo II	2 cada uno	11,1 cada uno	11,1 cada uno	0,4 cada uno	3,7 cada uno	0,12/ 1,2/ 1,2	2-abr	8-feb	16-feb	0,37/ 3,7	1,11/ 1,11	1,11 cada uno
SARM #181 SCCmec tipo II	11,1 cada uno	ND	ND	11,1 cada uno	ND	0,37/ 3,7/ 3,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MSSA ATCC 29213	0,27 cada uno	ND	ND	ND	ND	0,04/ 0,4/ 0,4	0,4 cada uno	1,2 cada uno	1,2 cada uno	0,04/ 0,4	0,04-0,4).	1,2 cada uno

Tabla 3. Compilación de datos FICI para ME/PI/TZ contra SARM N315 y 72 aislados clínicos de SARM.

A-B. 72 aislamientos clínicos de BRSA (con el tipo de SCCmec, si se conoce) y puntuaciones FICI para ME/PI/TZ frente a 72 aislamientos clínicos de SARM.

A		**B**	
Aislamiento clínico de SARM (tipo SCCmec)	Puntuación del FICI	Aislamiento clínico de SARM (tipo SCCmec) (continuación)	Puntuación del FICI (continuación)
4	0,22	124	0,28
7	0,22	131 (II)	0,37
13	0,15	132	0,22
15	0,5	140	0,22
22	0,22	144	0,15
25	0,22	146	0,22
27	0,67	150	0,67
31	0,15	152	0,22
35 (II)	0,17	155	0,39
37	0,15	161	0,37
39 (II)	0,67	163	0,37
41 (II)	0,09	164	0,17
45	0,22	165	0,15
48	0,15	167	0,22
53	0,22	168	0,22
59	0,07	169	0,17
64 (II)	0,44	171	0,17
66	0,11	172	0,67
70	0,67	175	0,15
72	0,15	177	0,22
73 (IV)	0,34	181 (II)	0,28
74	0,34	182	0,5
75	0,34	189	0,15
77 (II)	0,67	190	0,34
85	0,5	193 (II)	0,34
89	0,07	194	0,15
90	0,22	195	0,15
95	0,22	197	0,15
99	0,44	200	0,15
101	0,22	201	0,44
103	0,37	204	0,39
104 (II)	0,15	205	0,22
109	0,17	206	0,22
118	0,07	213	0,44
121	0,22	217	0,15
122	0,22	219	0,15

Tabla 4. Compilación de datos de CMI y MBC para ME/PI/TZ contra aislados de SARM.

A. Distribución de los perfiles de resistencia a la CMI de los aislados de SARM estudiados frente a ME/PI/TZ.

CMI de los componentes de ME/PI/TZ (µg/ml)	**# Número de aislamientos de SARM**	**% del total**
33,3	9	12,3
11,1	27	36,9
3,7	27	36,9
1,2	8	10,9
0,4	2	2,7
Total	73	-

B. Confirmación de la concentración bactericida mínima (CBM) para ME/PI/TZ en SARM N315.

Concentraciones de placas	**Colonias Placa A**	**Colonias Placa B**
ME/PI/TZ 2/2/2	Césped punteado	Demasiados para contarlos
ME/PI/TZ 4/4/4*	40	0
ME/PI/TZ 8/8/8	2	0
ME/PI/TZ 16/16/16	0	0
ME/PI/TZ 32/32/32	8	0

* MIC = 4/4/4 µg/ml

Tabla 5. Cambio en el fenotipo de resistencia a ME/PI/TZ de SARM N315 a lo largo de 11 días tras la exposición repetida a los componentes de ME/PI/TZ.

A. Los aislados se seleccionaron en los días en que se observó un aumento de la CIM o de la tasa de crecimiento. Las concentraciones antibacterianas (indicadas en µg/ml) muestran las condiciones de adaptación para el SARM N315. Se muestran las CIM posteriores a la adaptación a cada componente de ME/PI/TZ en aislados seleccionados frente al día de paso.

Día de paso/ Condiciones de adaptación	**ME/PI 11,1µg/ml cada uno**	**ME/TZ 11,1µg/ml cada uno**	**PI/TZ 3,7µg/ml cada uno**	**Meropenem 33,3 µg/ml**	**Piperacilina 100 µg/ml**	**Piperacilina 33,3 µg/ml**	**Tazobactam 100µg/ml**
1	sin cambios	11,1/11,1/ 11,1	1,2/1,2/1,2	11,1/11,1/ 11,1	sin cambios	1,2/1,2/1,2	11,1/11,1/ 11,1
2	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	3,7/3,7/3,7	3,7/3,7/3,7	11,1/11,1/ 11,1
3	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
4	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
5	sin cambios	33,3/33,3/ 33,3	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
6	sin cambios	sin cambios	11,1/11,1/ 11,1	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
7	11,1/11,1/ 11,1	sin cambios	sin cambios	33,3/33,3/ 33,3	sin cambios	sin cambios	11,1/11,1/ 11,1
8	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	1,2/1,2/1,2	1,2/1,2/1,2	sin cambios
9	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
10	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
11	11,1/11,1/ 11,1	33,3/33,3/ 33,3	11,1/11,1/ 11,1	33,3/33,3/ 33,3	1,2/1,2/1,2	1,2/1,2/1,2	33,3/33,3/ 33,3
9	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
10	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios	sin cambios
11	11,1/11,1/ 11,1	33,3/33,3/ 33,3	11,1/11,1/ 11,1	33,3/33,3/ 33,3	1,2/1,2/1,2	1,2/1,2/1,2	33,3/33,3/ 33,3

B. FICI de SARM N315 contra ME/PI/TZ tras los componentes de adaptación *in vitro*.

Aislamiento SARM N315 adaptado a:	**ME/PI**	**ME/TZ**	**PI/TZ**	**ME**	**PI**	**TZ**
FICIME/PI/TZ	0,22	0,83	0,22	0,83	0,05	0,83

ES 2 929 058 T3

Tabla 6.

A. Estadísticas de los tratamientos *in vivo* con β-lactámicos

Condición del fármaco probado	valor p frente al vehículo	Tras la corrección de hipótesis múltiples (Bonferroni)
ME	0,6006	4,848 (1)
PI	1	8 (1)
TZ	1	8 (1)
ME/PI	0,0022	0,0176
ME/TZ	0,0152	0,1216
PI/TZ	0,606	4,848 (1)
ME/PI/TZ	0,0022	0,0176
Linezolid	0,0022	0,0176

B. MICs *in vitro* y puntuaciones FICI para SARM N315 tras su paso *in vivo* bajo las condiciones farmacológicas indicadas.

Colonias de ratones dadas: MIC (µg/ml) para:	ME	PI	Vehículo	Tipo silvestre N315
ME/PI/TZ	3,7/3,7/3,7	3,7/3,7/3,7	3,7/3,7/3,7	3,7/3,7/3,7
ME	33,3	33,3	33,3	33,3
PI	33,3	33,3	33,3	33,3
TZ	100	100	100	100
FICI	0,26	0,26	0,26	0,26

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
1	7:30 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:30 a.m.	4:30 p.m.	6:31 p.m.	12:31 a.m.	8:30 a.m.	4:30 p.m.	12:31 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	4/6
2	7:31 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:31 a.m.	4:31 p.m.	6:32 p.m.	12:32 a.m.	8:31 a.m.	4:31 p.m.	12:32 a.m.	Colocación: 11 colonias	Vivo	
3	7:32 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:32 a.m.	4:32 p.m.	6:33 p.m.	12:33 a.m.	8:32 a.m.	4:32 p.m.	12:33 a.m.	Colocación: 3 colonias	Vivo	
4	7:33 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:33 a.m.	4:33 p.m.	6:34 p.m.	12:34 a.m.	8:33 a.m.	4:33 p.m.	12:34 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
5	7:34 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:34 a.m.	4:34 p.m.	6:35 p.m.	12:35 a.m.	8:34 a.m.	4:34 p.m.	12:35 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
6	7:35 a.m.	meropenem (67 mg/kg)	8:35 a.m.	4:35 p.m.	6:36 p.m.	12:36 a.m.	8:35 a.m.	4:35 p.m.	12:36 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
7	7:40 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:40 a.m.	4:40 p.m.	6:41 p.m.	12:41 a.m.	8:40 a.m.	4:40 p.m.	12:41 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	0/6
8	7:41 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:41 a.m.	4:41 p.m.	6:42 p.m.	12:42 a.m.	8:41 a.m.	4:41 p.m.	12:42 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
9	7:42 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:42 a.m.	4:42 p.m.	6:43 p.m.	12:43 a.m.	8:42 a.m.	4:42 p.m.	12:43 a.m.	Colocación: 40 colonias	Muerto	
10	7:43 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:43 a.m.	4:43 p.m.	6:44 p.m.	12:44 a.m.	8:43 a.m.	4:43 p.m.	12:44 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	

(continuación)

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
11	7:44 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:44 a.m.	4:44 p.m.	6:45 p.m.	12:45 a.m.	8:44 a.m.	4:44 p.m.	12:45 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Muerto	
12	7:45 a.m.	piperacilina (67 mg/kg)	8:45 a.m.	4:45 p.m.	6:46 p.m.	12:46 a.m.	8:45 a.m.	4:45 p.m.	12:46 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	
13	7:50 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:50 a.m.	4:50 p.m.	6:51 p.m.	12:51 a.m.	8:50 a.m.	4:50 p.m.	12:51 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	0/6
14	7:51 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:51 a.m.	4:51 p.m.	6:52 p.m.	12:52 a.m.	8:51 a.m.	4:51 p.m.	12:52 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
15	7:52 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:52 a.m.	4:52 p.m.	6:53 p.m.	12:53 a.m.	8:52 a.m.	4:52 p.m.	12:53 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	
16	7:53 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:53 a.m.	4:53 p.m.	6:54 p.m.	12:54 a.m.	8:53 a.m.	4:53 p.m.	12:54 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
17	7:54 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:54 a.m.	4:54 p.m.	6:55 p.m.	12:55 a.m.	8:54 a.m.	4:54 p.m.	12:55 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	
18	7:55 a.m.	tazobactam (67 mg/kg)	8:55 a.m.	4:55 p.m.	6:56 p.m.	12:56 a.m.	8:55 a.m.	4:55 p.m.	12:56 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
19	*8:00 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:00 a.m.*	*5:00 p.m.*	*7:01 p.m.*	*1:01 a.m.*	*9:00 a.m.*	*5:00 p.m.*	*1:01 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	6/6
20	*8:01 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:01 a.m.*	*5:01 p.m.*	*7:02 p.m.*	*1:02 a.m.*	*9:01 a.m.*	*5:01 p.m.*	*1:02 a.m.*	*Cultivo líquido: no hay crecimiento*	*Vivo*	
21	*8:02 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:02 a.m.*	*5:02 p.m.*	*7:03 p.m.*	*1:03 a.m.*	*9:02 a.m.*	*5:02 p.m.*	*1:03 a.m.*	*Cultivo líquido: qrowth*	*Vivo*	

(continuación)

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
22	*8:03 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:03 a.m.*	*5:03 p.m.*	*7:04 p.m.*	*1:04 a.m.*	*9:03 a.m.*	*5:03 p.m.*	*1:04 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	
23	*8:04 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:04 a.m.*	*5:04 p.m.*	*7:05 p.m.*	*1:05 a.m.*	*9:04 a.m.*	*5:04 p.m.*	*1:05 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	
24	*8:05 a.m.*	*meropenem+ piperacilina (67mg/kg de cada uno)*	*9:05 a.m.*	*5:05 p.m.*	*7:06 p.m.*	*1:06 a.m.*	*9:05 a.m.*	*5:05 p.m.*	*1:06 a.m.*	*Cultivo líquido: no hay crecimiento*	*Vivo*	
25	8:10 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:10 a.m.	5:10 p.m.	7:11 p.m.	1:11 a.m.	9:10 a.m.	5:10 p.m.	1:11 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Vivo	5/6
26	8:11 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:11 a.m.	5:11 p.m.	7:12 p.m.	1:12 a.m.	9:11 a.m.	5:11 p.m.	1:12 a.m.	Colocación: 1 colonia	Muerto	
27	8:12 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:12AM	5:12PM	7:13PM	1:13AM	9:12AM	5:12PM	1:13 a.m.	Colocación: no hay colonias	Vivo	
28	8:13 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:13AM	5:13PM	7:14PM	1:14AM	9:13AM	5:13PM	1:14AM	Colocación: 1 colonia	Vivo	
29	8:14 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:14AM	5:14PM	7:15PM	1:15AM	9:14AM	5:14PM	1:15 a.m.	No se ha obtenido sangre	Vivo	
30	8:15 a.m.	meropenem+t azobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:15AM	5:15PM	7:16PM	1:16AM	9:15AM	5:15PM	1:16 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Vivo	

(continuación)

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
31	8:20 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:20 a.m.	5:20 p.m.	7:21 p.m.	1:21 a.m.	9:20 a.m.	5:20 p.m.	1:21 a.m.	Colocación: 9 colonias	Muerto	4/6
32	8:21 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:21 a.m.	5:21 p.m.	7:22 p.m.	1:22 a.m.	9:21 a.m.	5:21 p.m.	1:22 a.m.	Colocación: 1 colonia	Vivo	
33	8:22 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:22 a.m.	5:22 p.m.	7:23 p.m.	1:23 a.m.	9:22 a.m.	5:22 p.m.	1:23 a.m.	Colocación: 1 colonia	Vivo	
34	8:23 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:23 a.m.	5:23 p.m.	7:24 p.m.	1:24 a.m.	9:23 a.m.	5:23 p.m.	1:24 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
35	8:24 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:24 a.m.	5:24 p.m.	7:25 p.m.	1:25 a.m.	9:24 a.m.	5:24 p.m.	1:25 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
36	8:25 a.m.	piperacilina+tazobactam (67 mg/kg de cada uno)	9:25 a.m.	5:25 p.m.	7:26 p.m.	1:26 a.m.	9:25 a.m.	5:25 p.m.	1:26 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
37	*8:30 a.m.*	*fármaco 1* + 2 + 3 (67*mg/kg* de *cada uno)*	*9:30 a.m.*	*5:30 p.m.*	*7:31 p.m.*	*1:31 a.m.*	*9:30 a.m.*	*5:30 p.m.*	*1:31 a.m.*	*Cultivo líquido: no hay crecimiento*	*Vivo*	6/6
38	8:31 *AM*	*fármaco 1 + 2 + 3 (67mg/kg* de *cada uno)*	*9:31 a.m.*	*5:31 p.m.*	*7:32 p.m.*	*1:32 a.m.*	*9:31 a.m.*	*5:31 p.m.*	*1:32 a.m.*	*Cultivo líquido: no hay crecimiento*	*Vivo*	
39	8:32 *AM*	*fármaco 1* + 2 + 3 *(67mg/kg* d e *cada uno)*	*9:32 a.m.*	5:32 p.m.	*7:33* PM	*1:33 a.m.*	*9:32 a.m.*	5:32 p.m.	*1:33 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	

(continuación)

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
40	8:33 *AM*	*fármaco 1* + 2 + 3 *(67mg/kg de cada uno)*	*9:33 a.m.*	5:33 p.m.	*7:34 p.m.*	*1:34 a.m.*	*9:33 a.m.*	5:33 p.m.	*1:34 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	
41	8:34 *AM*	*fármaco 1* + 2 + 3 (67*mg/kg* de *cada uno)*	*9:34 a.m.*	5:34 p.m.	*7:35* PM	*1:35 a.m.*	*9:34 a.m.*	5:34 p.m.	*1:35 a.m.*	*Cultivo líquido: no hay crecimiento*	*Vivo*	
42	8:35 *AM*	*fármaco 1* + 2 + 3 (67*mg/kg* de *cada uno)*	*9:35 a.m.*	5:35 p.m.	*7:36* PM	*1:36 a.m.*	*9:35 a.m.*	5:35 p.m.	*1:36 a.m.*	*Colocación: no hay colonias*	*Vivo*	
43	8:40 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:40 a.m.	5:40 p.m.	7:41 p.m.	1:41 a.m.	9:40 a.m.	5:40 p.m.	1:41 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	4/6
44	8:41 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:41 a.m.	5:41 p.m.	7:42 p.m.	1:42 a.m.	9:41 a.m.	5:41 p.m.	1:42 a.m.	Colocación: no hay colonias	Vivo	
45	8:42 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:42 a.m.	5:42 p.m.	7:43 p.m.	1:43 a.m.	9:42 a.m.	5:42 p.m.	1:43 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
46	8:43 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:43 a.m.	5:43 p.m.	7:44 p.m.	1:44 a.m.	9:43 a.m.	5:43 p.m.	1:44 a.m.	Cultivo líquido: no hay crecimiento	Vivo	
47	8:44 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:44 a.m.	5:44 p.m.	7:45 p.m.	1:45 a.m.	9:44 a.m.	5:44 p.m.	1:45 a.m.	Colocación: no hay colonias	Vivo	
48	8:45 a.m.	control positivo - linezolid (30 mg/kg)	9:45 a.m.	5:45 p.m.	7:46 p.m.	1:46 a.m.	9:45 a.m.	5:45 p.m.	1:46 a.m.	Colocación: no hay colonias	Vivo	

(continuación)

Tabla 7. Datos de los experimentos con animales

ID	SARM Tiempo de Inf	Compuesto (nivel de dosis)	dosis cada 8 horas SC	2ª dosis SC	Sangrado de la mejilla	3ª dosis SC	4ª dosis SC	5ª dosis SC	6ª dosis SC	Resultados de la detección de bacterias	Resultado	
49	8:50 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:50 a.m.	5:50 p.m.	7:51 p.m.	1:51 a.m.	9:50 a.m.	5:50 p.m.	1:51 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	4/6
50	8:51 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:51 a.m.	5:51 p.m.	7:52 p.m.	1:52 a.m.	9:51 a.m.	5:51 p.m.	1:52 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
51	8:52 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:52 a.m.	5:52 p.m.	7:53 p.m.	1:53 a.m.	9:52 a.m.	5:52 p.m.	1:53 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
52	8:53 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:53 a.m.	5:53 p.m.	7:54 p.m.	1:54 a.m.	9:53 a.m.	5:53 p.m.	1:54 a.m.	Cultivo líquido: qrowth	Muerto	
53	8:54 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:54 a.m.	5:54 p.m.	7:55 p.m.	1:55 a.m.	9:54 a.m.	5:54 p.m.	1:55 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	
54	8:55 a.m.	vehículo (30 % DMSO, 30 % propilenglicol, 40 % agua)	9:55 a.m.	5:55 p.m.	7:56 p.m.	1:56 a.m.	9:55 a.m.	5:55 p.m.	1:56 a.m.	Placa: césped de bacterias	Muerto	

* Se colocaron -100 ul de sangre en 3 muestras para comprobar el número de colonias

* Se añadieron 100 ul de BHI a 3 tubos de sangre y se mezclaron y se añadieron 100 ul de la mezcla a 4,9 ml de caldo BHI

se añadió 1 colonia de cada placa con crecimiento al caldo BHI y se cultivó o.n. y se preparó un caldo de glicerol

Se preparó un caldo de glicerol a partir de cada cultivo líquido que presentaba un crecimiento

Referencias para los ejemplos.

1. Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M. & Toleman, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. The Lancet Infectious Diseases, doi:10.1016/s1473-3099(11)70059-7 (2011).
2. Davies, J. Microbes have the last word. EMBO Reports 9, 302-317 (2007).
3. Davies, J. & Davies, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74, 417-433, doi:10.1128/mmbr.00016-10 (2010).
4. Fuda, C. C. S., Fisher, J. F. & Mobashery, S. Beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus: the adaptive resistance of a plastic genome. Cellular and molecular life sciences : CMLS 62, 2617-2633, doi:10.1007/s00018-005-5148-6 (2005).
5. Chambers, H. F. & Deleo, F. R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature reviews. Microbiology 7, 629-641, doi:10.1038/nrmicro2200 (2009).
6. Malouin, F. & Bryan, L. E. MINIREVIEWS Modification of Penicillin-Binding of Beta-Lactam Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy 30, 1-5, doi:10.1128/AAC.30.1.1.Updated (1986).
7. Harrison, E. M. et al. A novel hybrid SCCmec-mecC region in Staphylococcus sciuri. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 1-8, doi:10.1093/jac/dkt452 (2013).
8. Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. The basis for resistance to beta-lactam antibiotics by penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. The Journal of biological chemistry 279, 40802-40806, doi:10.1074/jbc.M403589200 (2004).
9. Fuda, C. et al. Activation for Catalysis of Penicillin-Binding Protein 2a from Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus by Bacterial Cell Wall. J Am Chem Soc 127, 2056-2057 (2005).
10. Otero, L. H., Rojas-Altuve, A., Llarrull, L. I., Carrasco-López, C. & Kumarasiri, M. How allosteric control of Staphylococcus aureus penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 16808-16813, doi:10.1073/pnas.1300118110/ /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1300118110 (2013).
11. Villegas-Estrada, A., Lee, M., Hesek, D., Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Coopting the Cell Wall in Fighting Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus : Potent Inhibition of PBP 2a by Two Anti-MRSA β-Lactam Antibiotics. J Am Chem Soc 130, 9212-9213 (2008).
12. Long, S. W. et al. PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy 58, 6668-6674, doi:10.1128/AAC.03622-14 (2014).
13. Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J. & Humphries, R. M. The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus. The Journal of antimicrobial chemotherapy, doi:10.1093/jac/dks354 (2012).
14. van Hal, S. J., Paterson, D. L. & Gosbell, I. B. Emergence of daptomycin resistance following vancomycin-unresponsive Staphylococcus aureus bacteraemia in a daptomycin-naïve patient-a review of the literature. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, doi:10.1007/s10096-010-1128-3 (2010).
15. Arias, C. A. & Murray, B. E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century-a clinical super-challenge. The New England journal of medicine 360, 439-443, doi:10.1056/NEJMp0804651 (2009).
16. Bhusal, Y., Shiohira, C. M. & Yamane, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against Mycobacterium tuberculosis. International journal of antimicrobial agents 26, 292-297, doi:10.1016/j.ijantimicag.2005.05.005 (2005).
17. Sjolund, M., Wreiber, K., Andersson, D. I., Blaser, M. & Engstrand, L. Long-Term Persistence of Resistant Enterococcus Species after Antibiotics To Eradicate Helicobacter pylori. Ann Intern Med 139, 483-488 (2013).
18. Tupin, A. et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. International journal of antimicrobial agents 35, 519-523, doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017 (2010).
19. Zhong, M. et al. An interesting case of rifampicin-dependent/-enhanced multidrug-resistant tuberculosis. The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease 14, 40-44 (2010).
20. Comas, I. et al. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase genes. Nature Genetics 44, 106-110, doi:10.1038/ng.1038 (2011).
21. Fischbach, M. A. & Walsh, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. Science (Nueva York, N. Y.) 325, 1089-1093, doi:10.1126/science.1176667 (2009).
22. Zimmermann, G. R., Lehár, J. & Keith, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. Drug discovery today 12, 34-42, doi:10.1016/j.drudis.2006.11.008 (2007).
23. Hegreness, M., Shoresh, N., Damian, D., Hartl, D. L. & Kishony, R. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 13977-13981, doi:10.1073/pnas.0805965105 (2008).
24. Lázár, V. et al. Bacterial evolution of antibiotic hypersensitivity. Molecular Systems Biology 9, doi:10.1038/msb.2013.57 (2013).

25. Imamovic, L. & Sommer, M. O. A. Use of Collateral Sensitivity Networks to Design Drug Cycling Protocols That Avoid Resistance Development. Science Translational Medicine 5, 204ra132-204ra132, doi:10.1126/scitranslmed.3006609 (2013).
26. Boucher, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 48, 1-12, doi:10.1086/595011 (2009).
27. Rice, L. B. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. American journal of infection control 34, S11-19; discussion S64-73, doi:10.1016/j.ajic.2006.05.220 (2006).
28. Alekshun, M. N. & Levy, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128, 1037-1050, doi:10.1016/j.cell.2007.03.004 (2007).
29. Kumarasamy, K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet Infectious Diseases 3099, 1-6, doi:10.1016/s1473-3099(10)70143-2 (2010).
30. Spratt, B. G. Properties of the penicillin-binding proteins of Escherichia coli K12. European journal of biochemistry / FEBS 72, 341-352 (1977).
31. Waxman, D. J. & Strominger, J. L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics. Annual review of biochemistry 52, 825-869, doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.004141 (1983).
32. Lee, S. H. et al. Antagonism of chemical genetic interaction networks resensitize MRSA to β-lactam antibiotics. Chemistry & biology 18, 1379-1389, doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.015 (2011).
33. Koga, T. et al. Affinity of Tomopenem (CS-023) for penicillin-binding proteins in Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial agents and chemotherapy 53, 1238-1241, doi:10.1128/aac.01433-08 (2009).
34. Yang, Y., Bhachech, N. & Bush, K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by betalactamases. The Journal of antimicrobial chemotherapy 35, 75-84 (1995).
35. Campbell, E. M. & Chao, L. A population model evaluating the consequences of the evolution of double-resistance and tradeoffs on the benefits of two-drug antibiotic treatments. PloS one 9, e86971-e86971, doi:10.1371/journal.pone. 0086971 (2014).
36. Munck, C., Gumpert, H. K., Wallin, A. I. N., Wang, H. H. & Sommer, M. O. A. Prediction of resistance development against drug combinations by collateral responses to component drugs. Science Translational Medicine 6, 262ra156-262ra156, doi:10.1126/scitranslmed.3009940 (2014).
37. Kuroda, M. et al. Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet 357, 1225-1240 (2001).
38. Goldstein, F. et al. Identification and phenotypic characterization of a β-lactam-dependent, methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain. Antimicrobial agents and chemotherapy 51, 2514-2522, doi:10.1128/AAC.00040-07 (2007).
39. Arêde, P., Ministro, J. & Oliveira, D. C. Redefining the role of the β-lactamase locus in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: β-lactamase regulators disrupt the Mecl-mediated strong repression on mecA and optimize the phenotypic expression of resistance in strains with constitutive mecA. Antimicrobial agents and chemotherapy 57, 3037-3045, doi: 10.1128/AAC.02621-12 (2013).
40. Berenbaum, M. C. What is Synergy? Pharmacological Reviews 1989 (1989).
41. Saiman, L. Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. Paediatric respiratory reviews 8, 249-255, doi:10.1016/j.prrv.2007.04.006 (2007).
42. Clinical & Laboratory Standards, I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Nineteenth Informational Supplement. CLSI 29 (2009).
43. Clinical & Laboratory Standards, I. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard - Eighth Edition. CLSI 29 (2009).
44. AstraZeneca Pharmaceuticals, L. P. Merrem IV (meropenem) for injection for intravenous use only prescribing information. 1-7 (Wilmington, DE, 2013).
45. Fishovitz, J. et al. Disruption of Allosteric Response as an Unprecedented Mechanism of Resistance to Antibiotics. Journal of the American Chemical Society 136, 9814-9817 (2014).
46. Somani, P., Freimer, E. H., Gross, M. L. & Higgins, J. T. Pharmacokinetics of Imipenem-Cilastatin in Patients with Renal Insufficiency Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. Antimicrobial agents and chemotherapy 32, 4-9, doi:10.1128/AAC.32.4.530.Updated (1988).
47. Kinzig, M., Brismar, B. & Nord, C. E. Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Tazobactam and Piperacillin in Patients Undergoing Colorectal Surgery. Antimicrobial agents and chemotherapy 36, 1997-2004, doi:10.1128/AAC.36.9.1997.Updated (1997).
48. Stutman, H. R., Welch, D. F., Scribner, R. K. & Marks, M. I. In vitro antimicrobial activity of aztreonam alone and in combination against bacterial isolates from pediatric patients. Antimicrobial agents and chemotherapy 25, 212-215 (1984).
49. Lee, S. H. et al. Antagonism of chemical genetic interaction networks resensitize MRSA to beta-lactam antibiotics. Chem. Biol. 18, 1379-1389, doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.015 (2011).

50. Ankomah, P., Johnson, P. J. T. & Levin, B. R. The pharmaco -, population and evolutionary dynamics of multi-drug therapy: experiments with S. aureus and E. coli and computer simulations. PLoS Pathogens 9, e1003300-e1003300, doi:10.1371/journal.ppat.1003300 (2013).
51. Sonstein, S. A. & Baldwin, J. N. Loss of the penicillinase plasmid after treatment of Staphylococcus aureus with sodium dodecyl sulfate. Journal of bacteriology 109, 262-265 (1972).
52. Hackbarth, C. J. & Chambers, H. F. blal and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial agents and chemotherapy 37, 1144-1149 (1993).
53. Lowy, F. D. Antimicrobial resistance : the example of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Investigation 111, 1265-1273, doi:10.1172/JCI200318535. In (2003).
54. Blazquez, B. et al. Regulation of the Expression of the β - Lactam Antibiotic-Resistance Determinants in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Biochemistry 53, 1548-1550 (2014).
55. Craig, W. A. The pharmacology of meropenem, a new carbapenem antibiotic. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 24 Suppl 2, S266-275 (1997).
56. DeRyke, C. A., Banevicius, M. A., Fan, H. W. & Nicolau, D. P. Bactericidal activities of meropenem and ertapenem against extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in a neutropenic mouse thigh model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 51, 1481-1486, doi:10.1128/AAC.00752-06 (2007).
57. Cai, Y., Wang, R., Pei, F. & Liang, B.-b. Antibacterial Activity of Allicin Alone and in Combination with Beta-Lactams against Staphylococcus spp. And Pseudomonas aeruginosa. Journal of Antibiotics 60, 335-338 (2007).
58. Berenbaum, M. C. A method for testing for synergy with any number of agents. The Journal of infectious diseases 137, 122-130 (1978).
59. Clinical & Laboratory Standards, I. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. CLSI 19 (1999).
60. Life_Technologies. SYBR® Select Master Mix for CFX User Guide. 1-34 (2012).
61. Li, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078-2079, doi:10.1093/bioinformatics/btp352 (2009).
62. Pfizer. Zosyn (Piperacillin and Tazobactam for Injection, USP) for injection for intravenous use only prescribing information. 1-26 (Filadelfia, PA, 2012).
63. Merck. PRIMAXIN I.V. (IMIPENEM AND CILASTATIN FOR INJECTION). 1-17 (Whitehouse Station, NJ, 2014).
64. Kumar, K. M., Anbarasu, A. & Ramaiah, S. Molecular docking and molecular dynamics studies on β-lactamases and penicillin binding proteins. Mol. Biosyst. 10, 891-900 (2014).
65. Petinaki et al. Detection of mecA, mecR1 and mecl genes among clinical isolates of methicillin-resistant staphylococci by combined polymerase chain reactions. J. Antimicrob. Chemother. 47, 297-304 (2001)
66. Nascimento et al. Potential spread of multidrug-resistant coagulase-negative staphylococci through healthcare waste. J. Infect. Dev. Ctries. 9, (2015)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> WASHINGTON UNIVERSITY DANTAS, Gautam GONZALES, Patrick FORSBERG, Kevin PESESKY, Mitchell CHANG, Mayland MOBASHERY, Shahriar

<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE COMBINACIONES DE FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS

<130> 047563-548562

<150> 62/190,588
<151>2015-07-09

<160> 8

<170> PatenteIn versión 3.5

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 1
cgtgccgaaa tcaatgaaag acgc 24

<210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 2
ggcaccttca gaaccaaatc cacc 24

<210> 3
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 3
tggaacgatg cctatctcat atgc 24

<210> 4
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 4
caggaatgca gaaagaccaa agc 23

<210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 5
tttatcagca accttatagt cttttggaac 30

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 6
cctgctgctt tcggcaagac 20

<210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 7
cgatgtggat ggagcgcata ttag 24

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> SINTETIZADO

<400> 8
acaacggtgg ctgtgcaata tac 23

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de una infección causada por una bacteria Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (SARM), en la que la resistencia se debe a un mecanismo impulsado por la proteína de unión a la penicilina 2a (PBP2a), comprendiendo la composición:

i) al menos un carbapenem u otra β-lactama adecuada capaz de unirse al sitio alostérico de PBP2a;
ii) al menos un inhibidor de la β-lactamasa; y
iii) al menos una β-lactama que se une a la configuración abierta del sitio activo de la PBP2a;
en la que la composición se selecciona del grupo que consiste en

a) meropenem/piperacilina/tazobactam (ME/PI/TZ);
b) cefepime/piperacilina/tazobactam (CP/PI/TZ);
c) aztreonam/piperacilina/tazobactam (AZ/PI/TZ);
d) meropenem/amoxicilina/tazobactam (ME/AX/TZ);
e) meropenem/amoxicilina/clavulanato (ME/AX/CV); y
f) imipenem/piperacilina/clavulanato (IM/PI/CV).

2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la relación de (i), (ii) y (iii) es 1:1:1.

3. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición suprime la evolución de la resistencia a la composición.

4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la relación de (i), (ii) y (iii) está en el intervalo de 64:1:1, 1:64:1, y 1:1:64 a 1:1:1.

5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de una infección causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

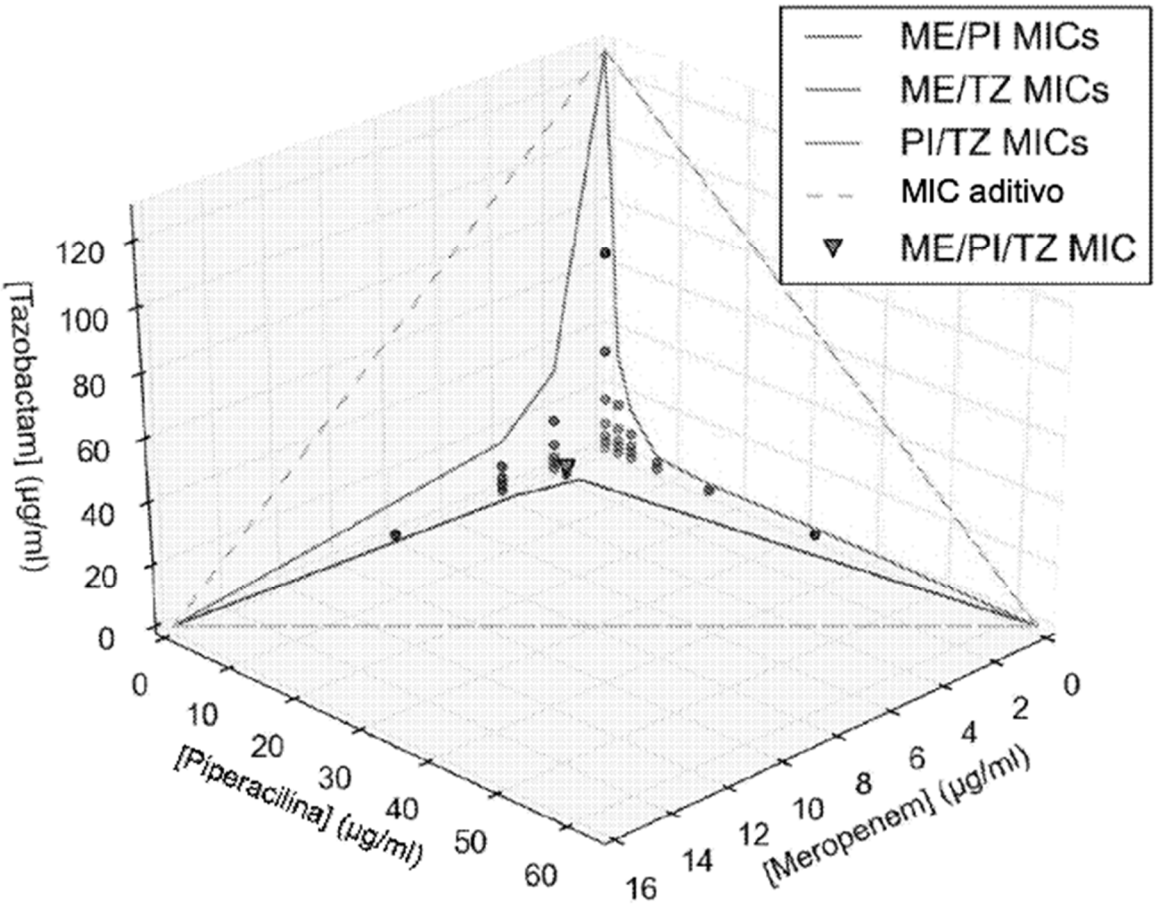

ME/PI MICs
ME/TZ MICs
PI/TZ MICs
MIC aditivo
ME/PI/TZ MIC
[Tazobactam] (µg/ml)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
[Piperacilina] (µg/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
[Meropenem] (µg/ml)

FIG. 1

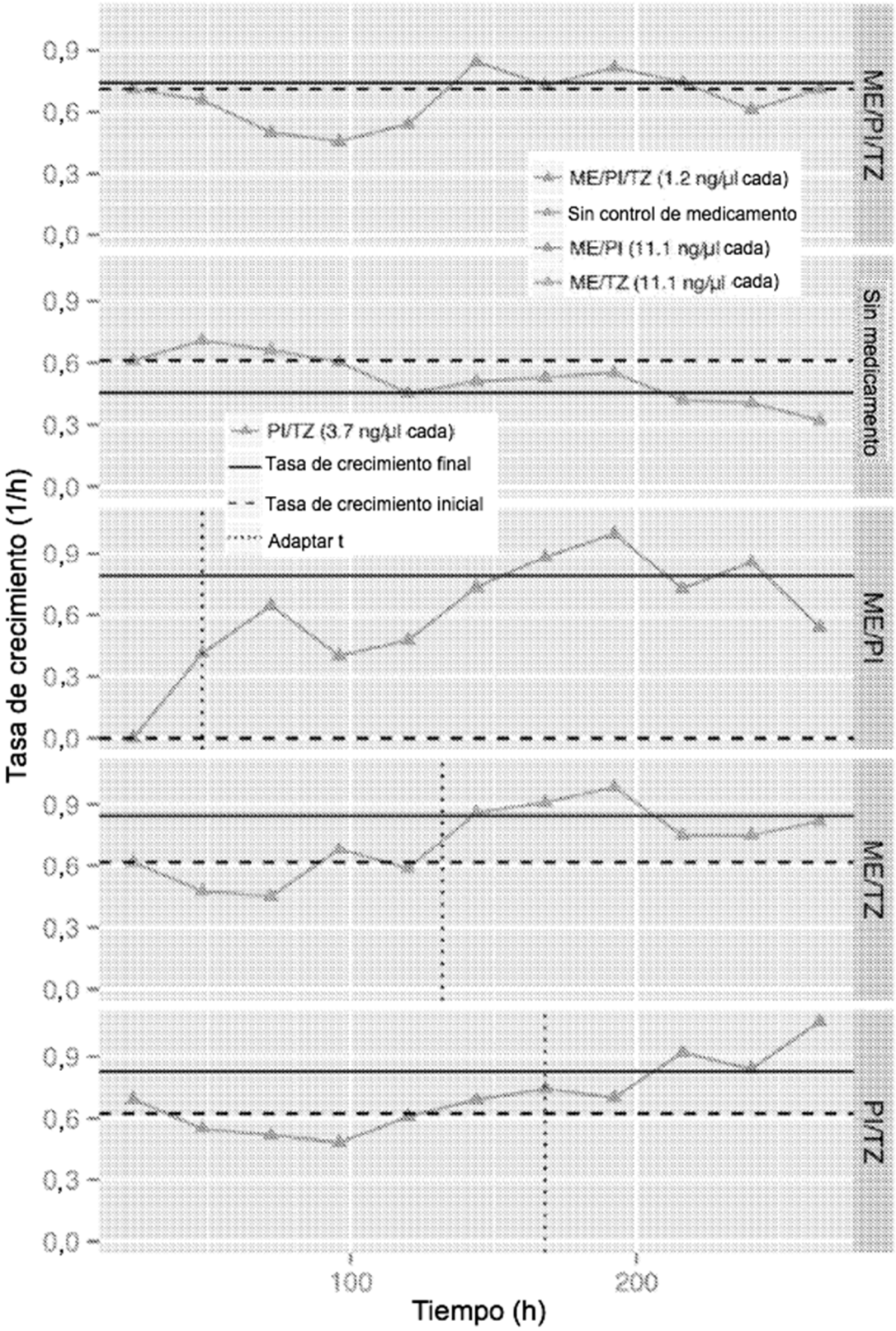

Tasa de crecimiento (1/h)
0,9
0,6
0,3
0,0
ME/PI/TZ
ME/PI/TZ (1.2 ng/µl cada)
Sin control de medicamento
ME/PI (11.1 ng/µl cada)
ME/TZ (11.1 ng/µl cada)
Sin medicamento
PI/TZ (3.7 ng/µl cada)
Tasa de crecimiento final
Tasa de crecimiento inicial
Adaptar t
ME/PI
ME/TZ
PI/TZ
100
200
Tiempo (h)

FIG. 2

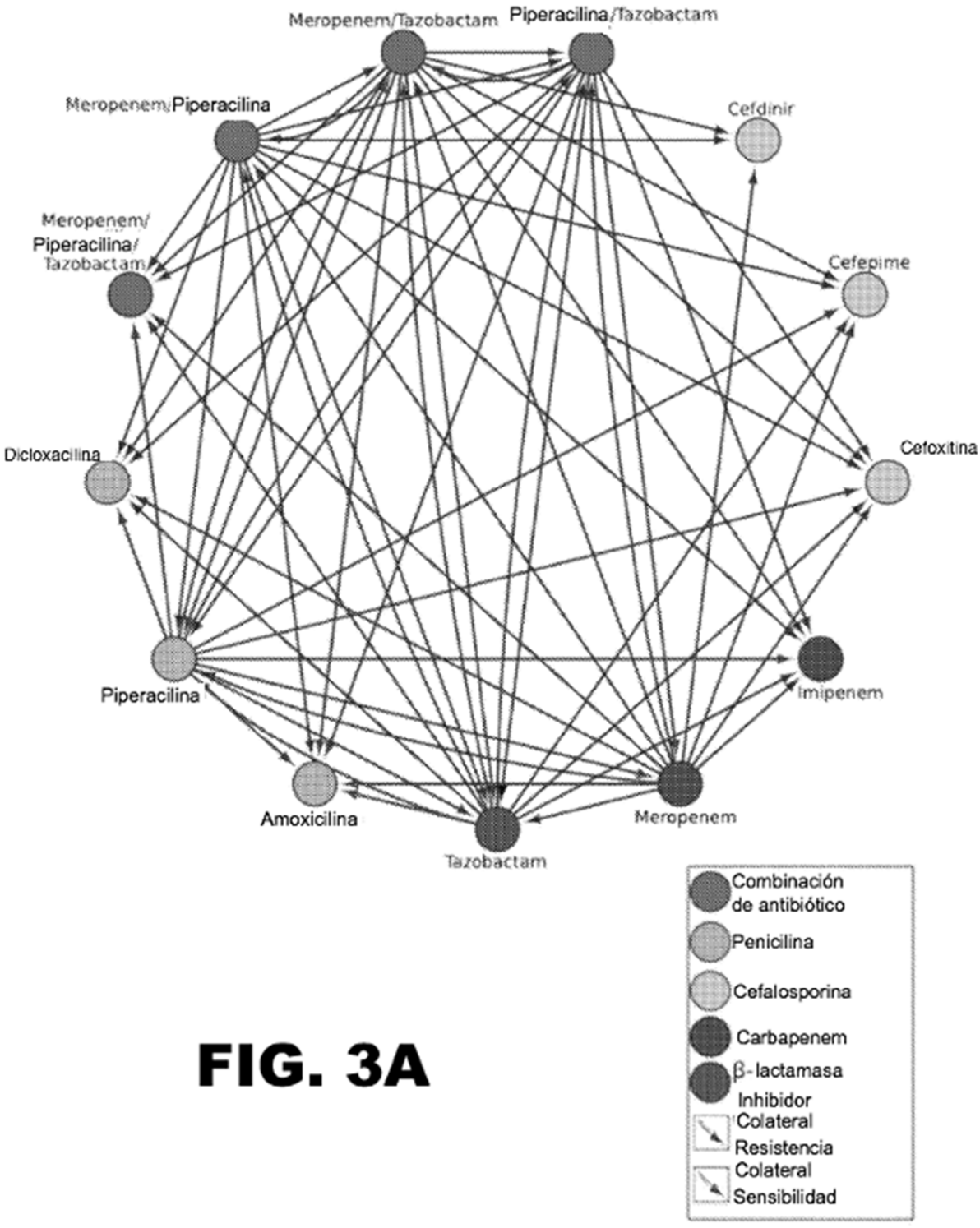

Meropenem/Tazobactam
Piperacilina/Tazobactam
Meropenem/Piperacilina
Cefdinir
Meropenem/
Piperacilina/
Tazobactam
Cefepime
Dicloxacilina
Cefoxitina
Piperacilina
Imipenem
Amoxicilina
Meropenem
Tazobactam
Combinación de antibiótico
Penicilina
Cefalosporina
Carbapenem
β-lactamasa Inhibidor
Colateral Resistencia
Colateral Sensibilidad

FIG. 3A

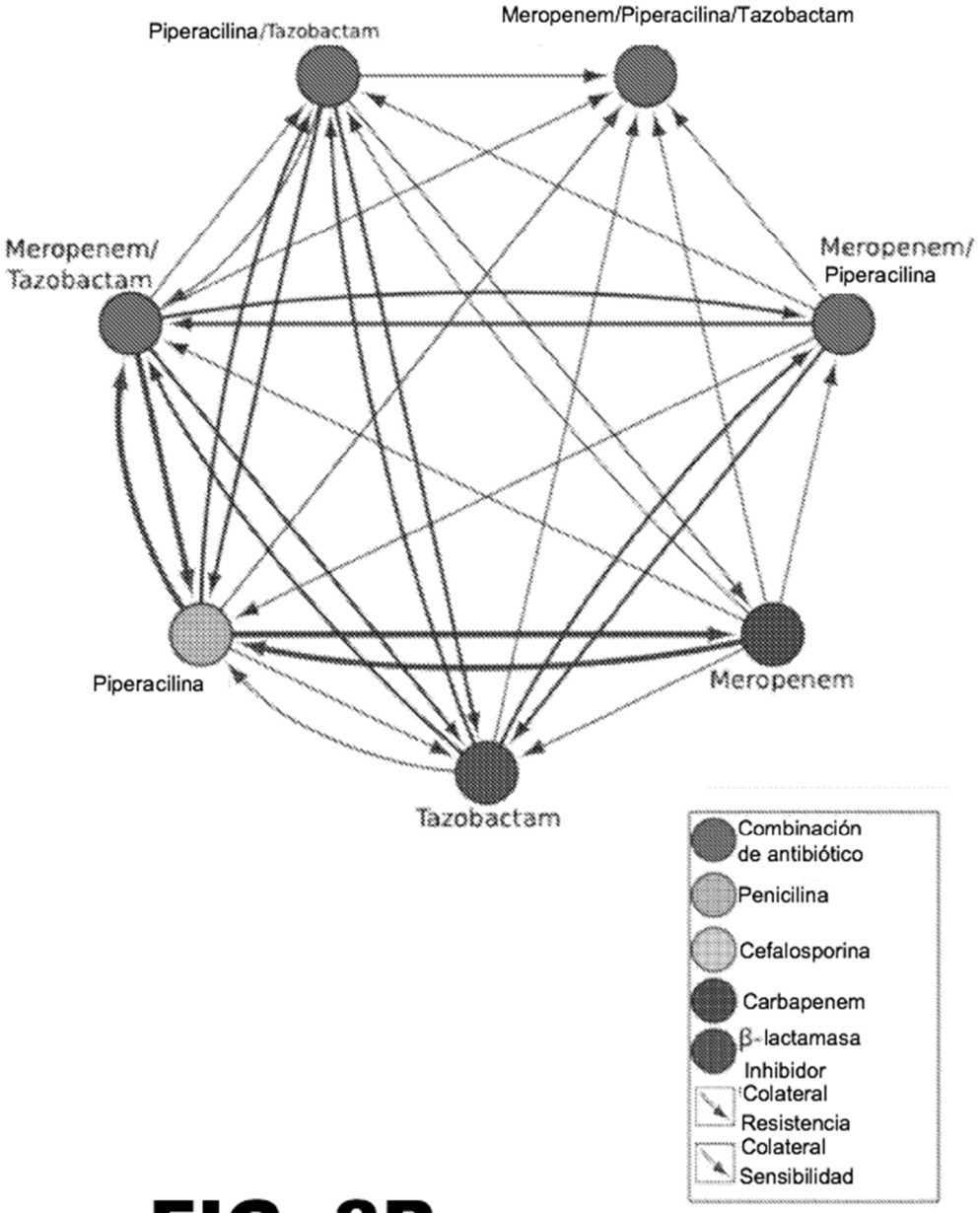

Piperacilina/Tazobactam
Meropenem/Piperacilina/Tazobactam
Meropenem/
Tazobactam
Meropenem/
Piperacilina
Piperacilina
Meropenem
Tazobactam
Combinación de antibiótico
Penicilina
Cefalosporina
Carbapenem
β-lactamasa Inhibidor
Colateral Resistencia
Colateral Sensibilidad

FIG. 3B

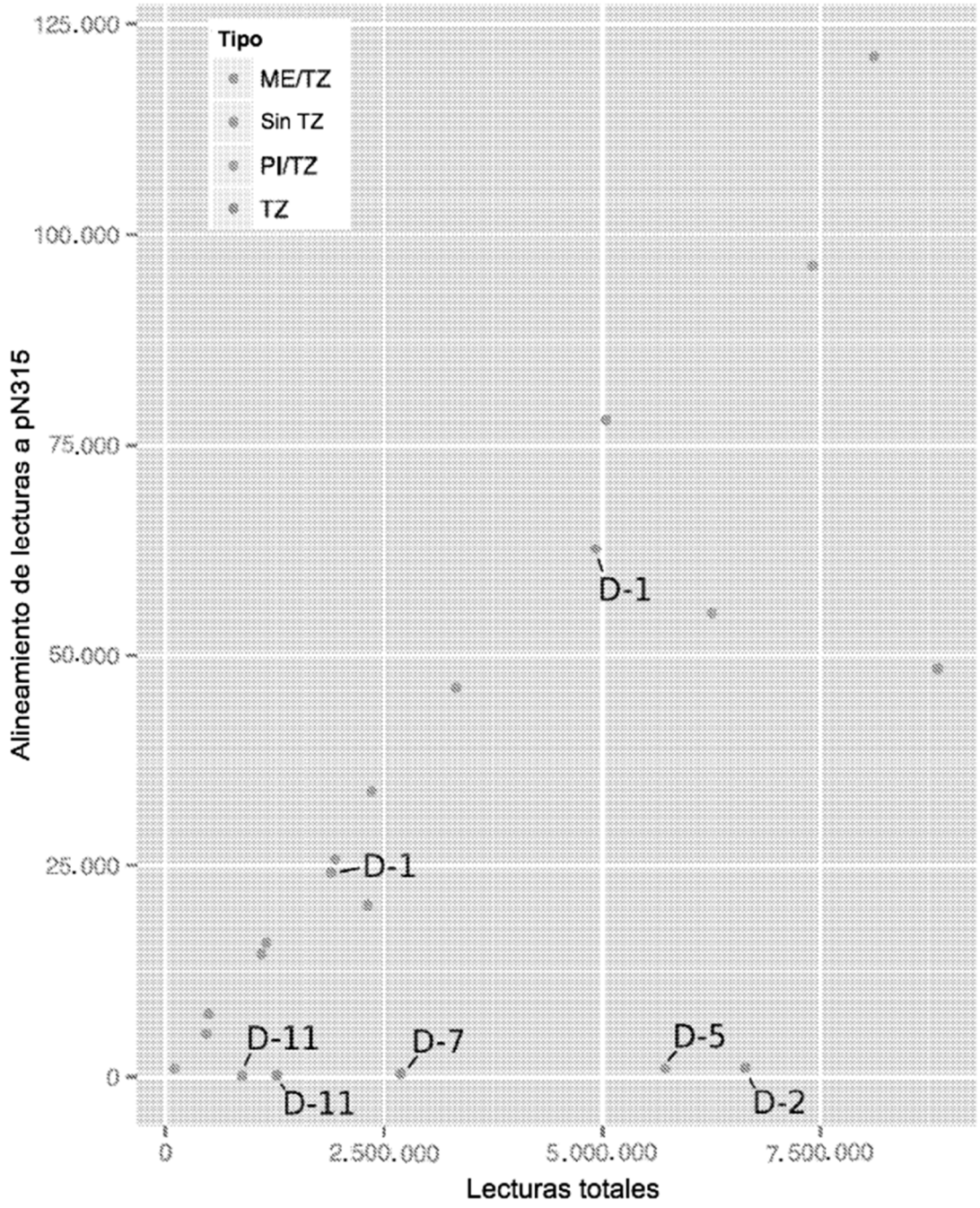

Tipo
ME/TZ
Sin TZ
PI/TZ
TZ
125.000
100.000
75.000
50.000
25.000
0
Alineamiento de lecturas a pN315
D-1
D-1
D-11
D-11
D-7
D-5
D-2
0
2.500.000
5.000.000
7.500.000
Lecturas totales

FIG. 4A

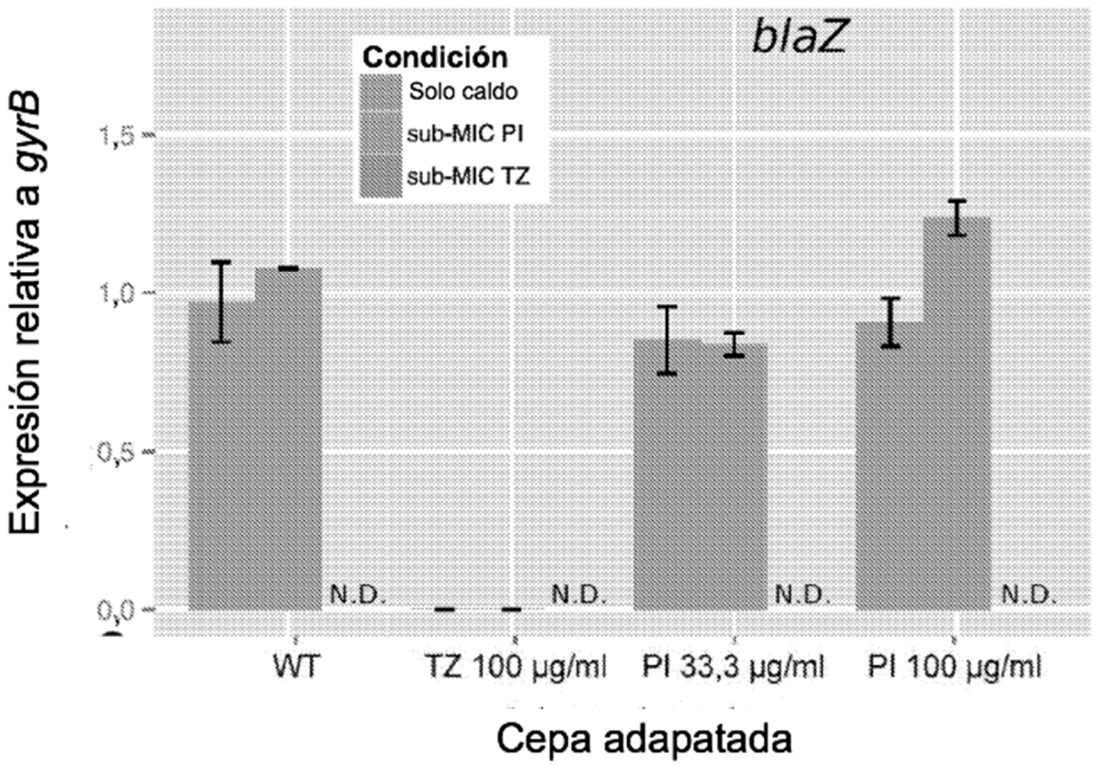

blaZ
Condición
Solo caldo
sub-MIC PI
sub-MIC TZ
Expresión relativa a gyrB
1,5
1,0
0,5
0,0
N.D.
N.D.
N.D.
N.D.
WT
TZ 100 µg/ml
PI 33,3 µg/ml
PI 100 µg/ml
Cepa adapatada

FIG. 4B

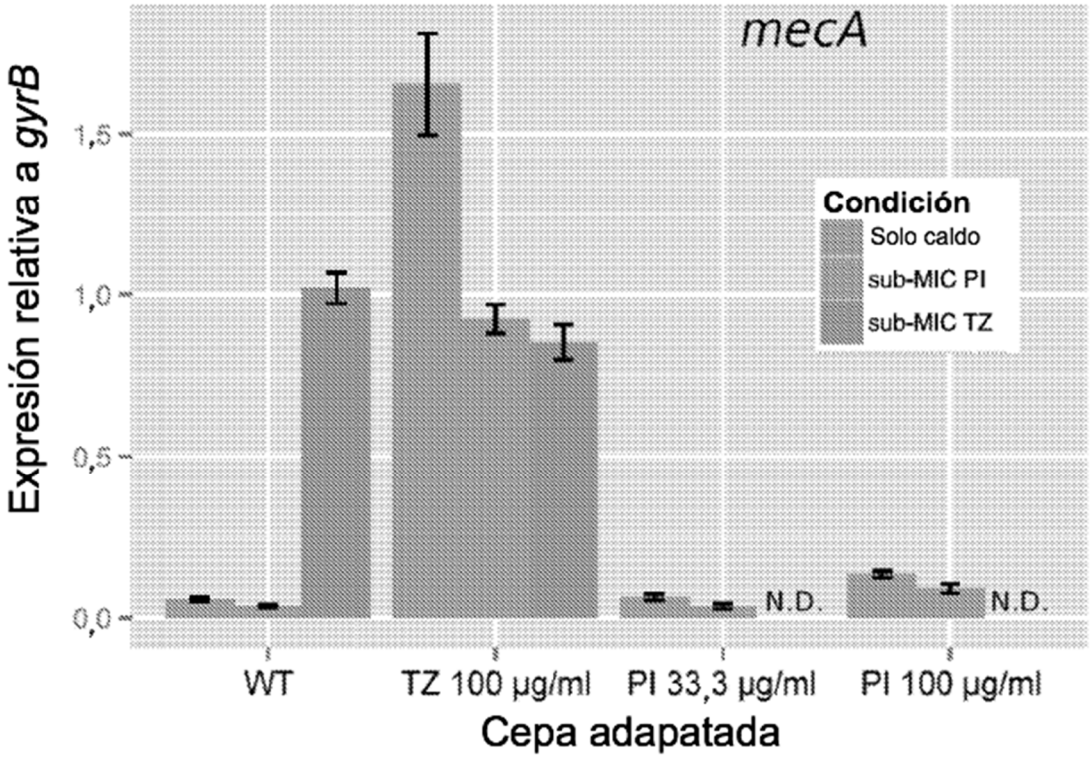

mecA
Expresión relativa a gyrB
1,5
1,0
0,5
0,0
Condición
Solo caldo
sub-MIC PI
sub-MIC TZ
N.D.
N.D.
WT
TZ 100 µg/ml
PI 33,3 µg/ml
PI 100 µg/ml
Cepa adapatada

FIG. 4C

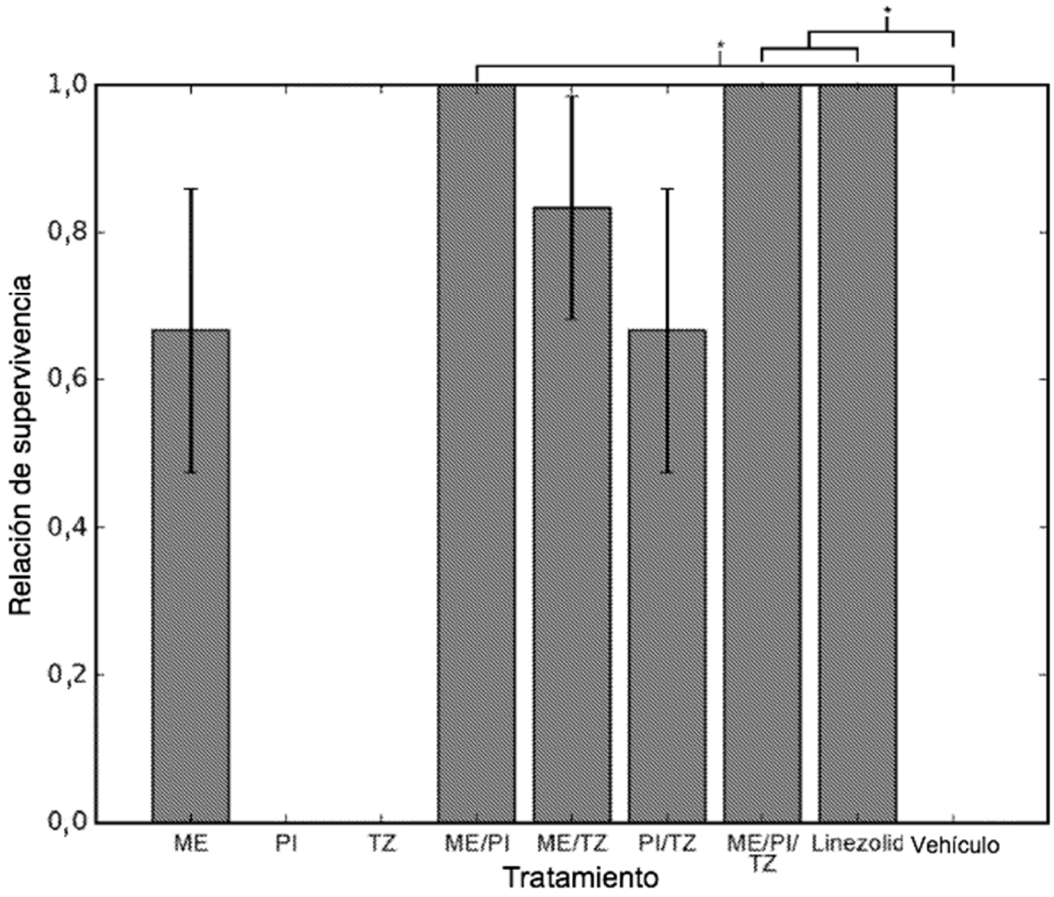

1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
Relación de supervivencia
ME
PI
TZ
ME/PI
ME/TZ
PI/TZ
ME/PI/ TZ
Linezolid
Vehículo
Tratamiento

FIG. 5

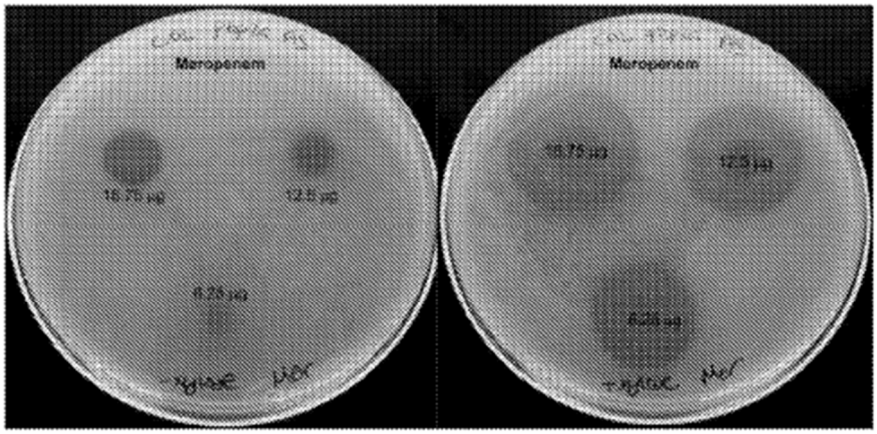


FIG. 6A

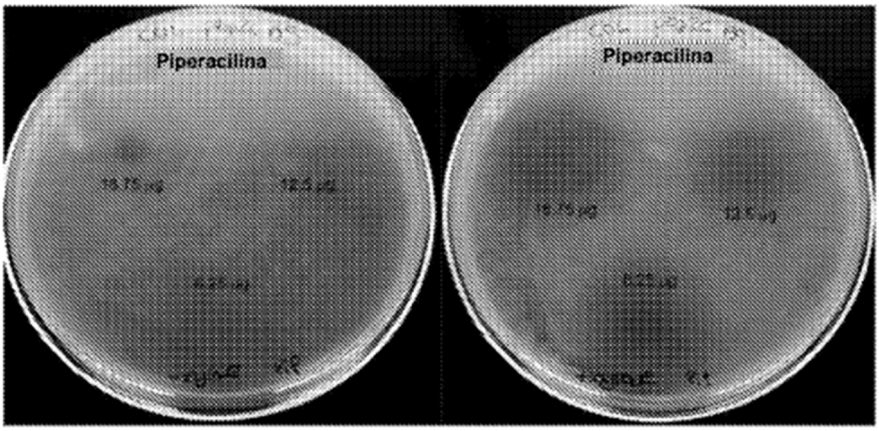


FIG. 6B

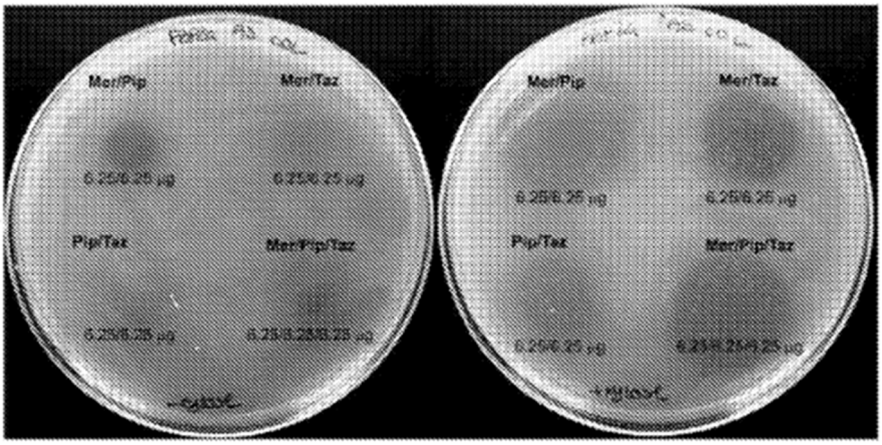


FIG. 6C

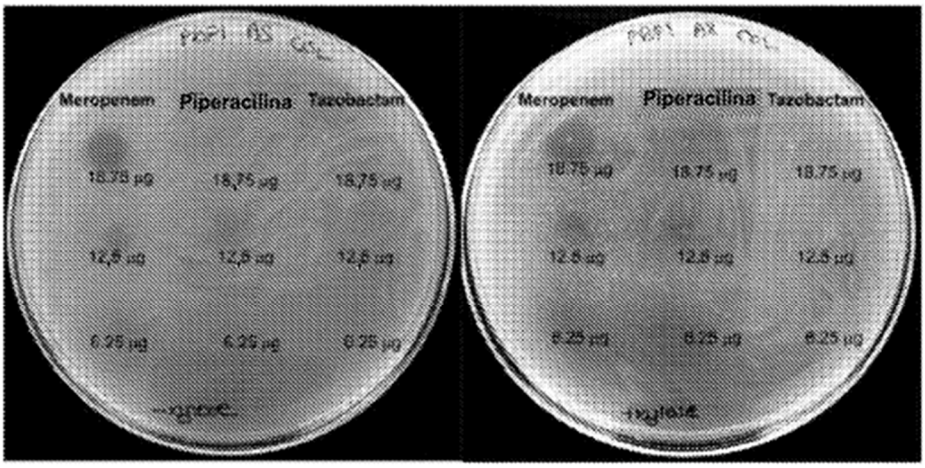


FIG. 6D

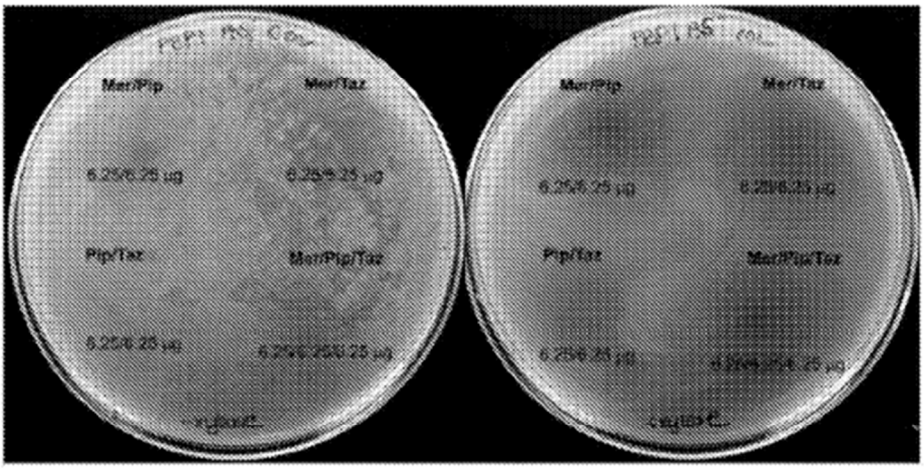


FIG. 6E

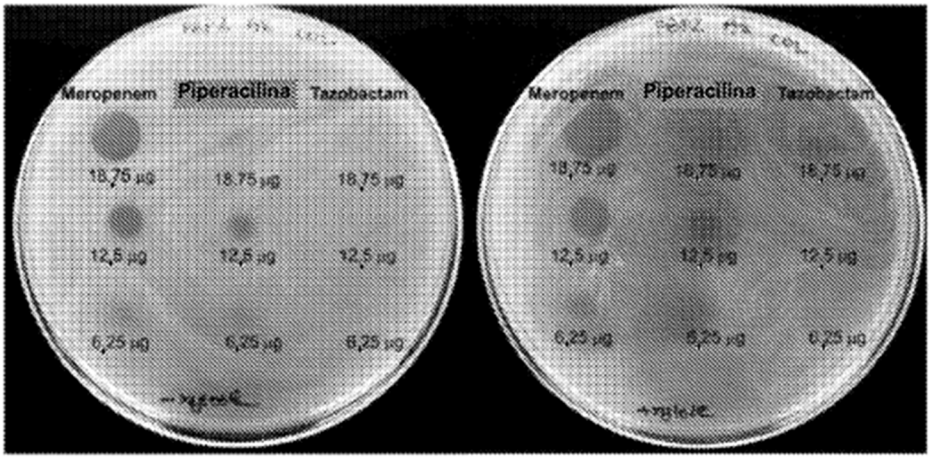


FIG. 6F

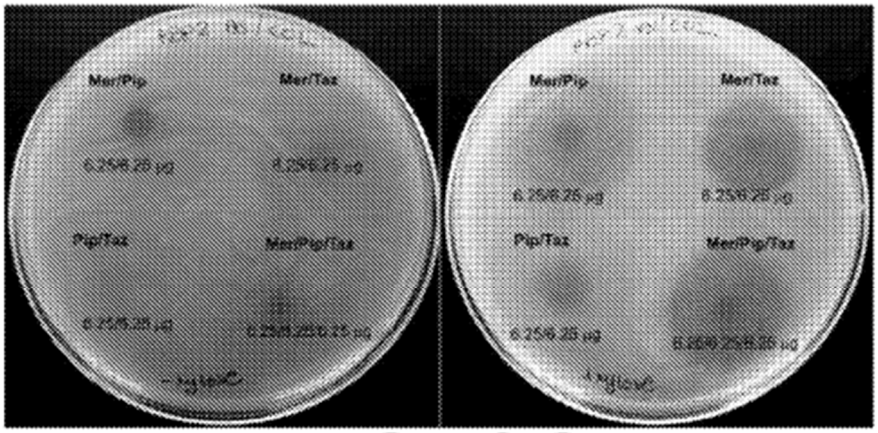


FIG. 6G

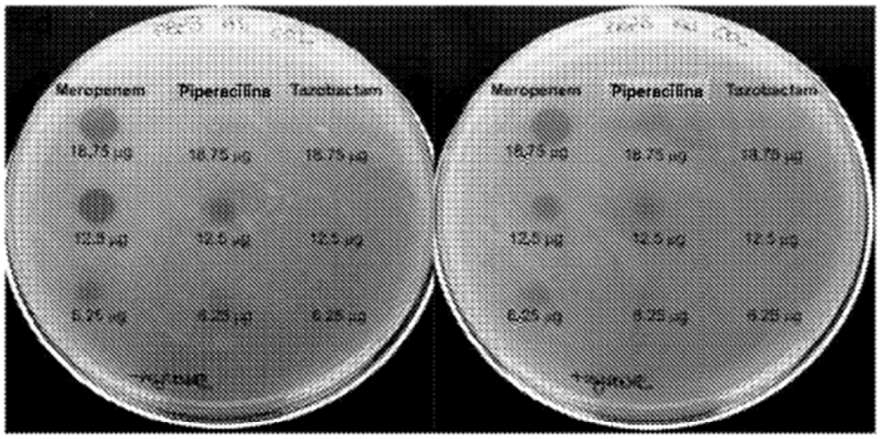


FIG. 6H

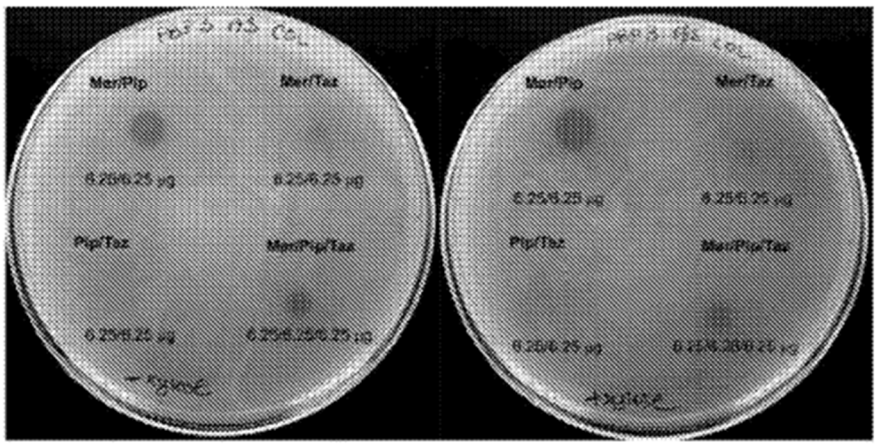


FIG. 6I

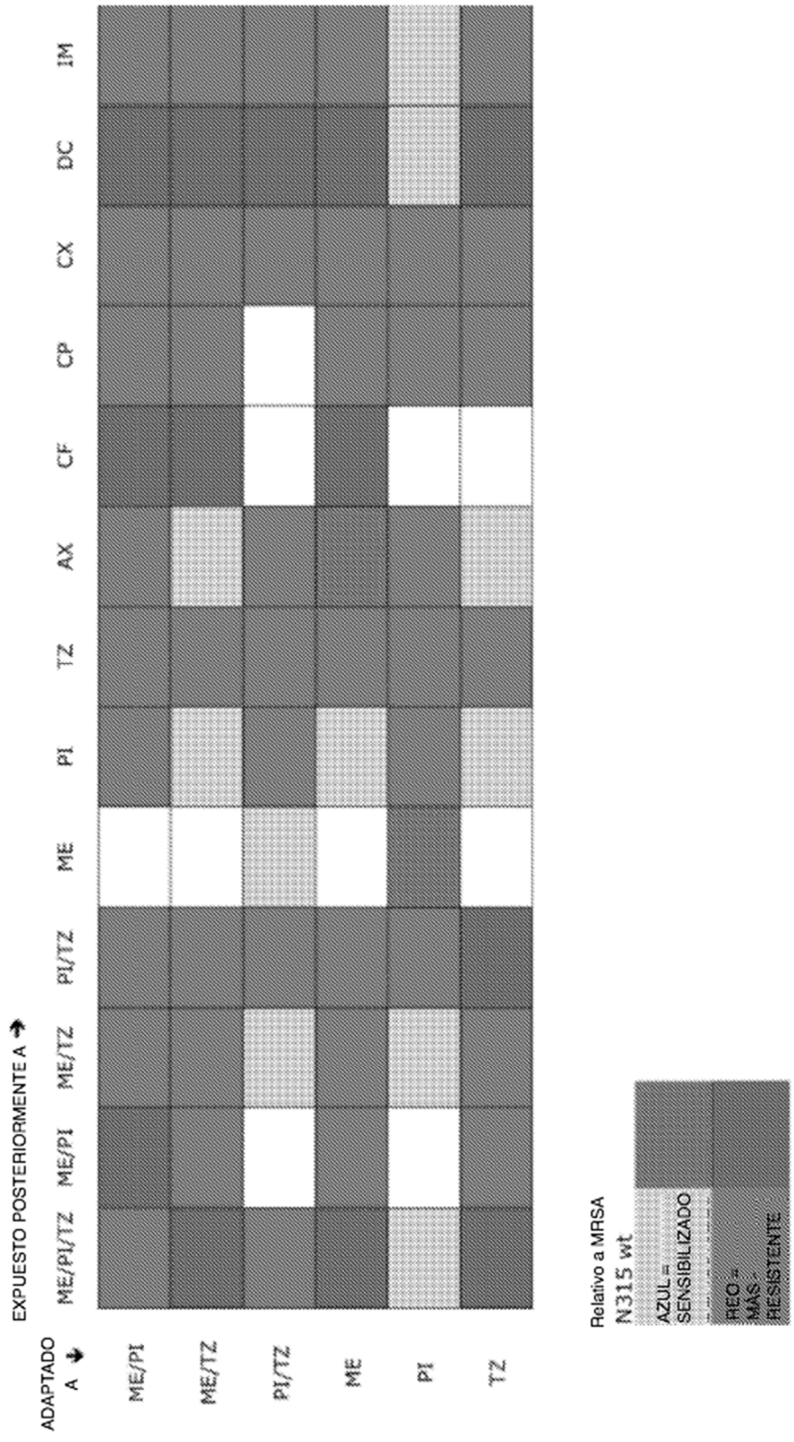

EXPUESTO POSTERIORMENTE A
ADAPTADO A
ME/PI/TZ
ME/PI
ME/TZ
PI/TZ
ME
PI
TZ
AX
CF
CP
CX
DC
IM
ME/PI
ME/TZ
PI/TZ
ME
PI
TZ
Relativo a MRSA
N315 wt
AZUL = SENSIBILIZADO
REO = MAS RESISTENTE

FIG. 7

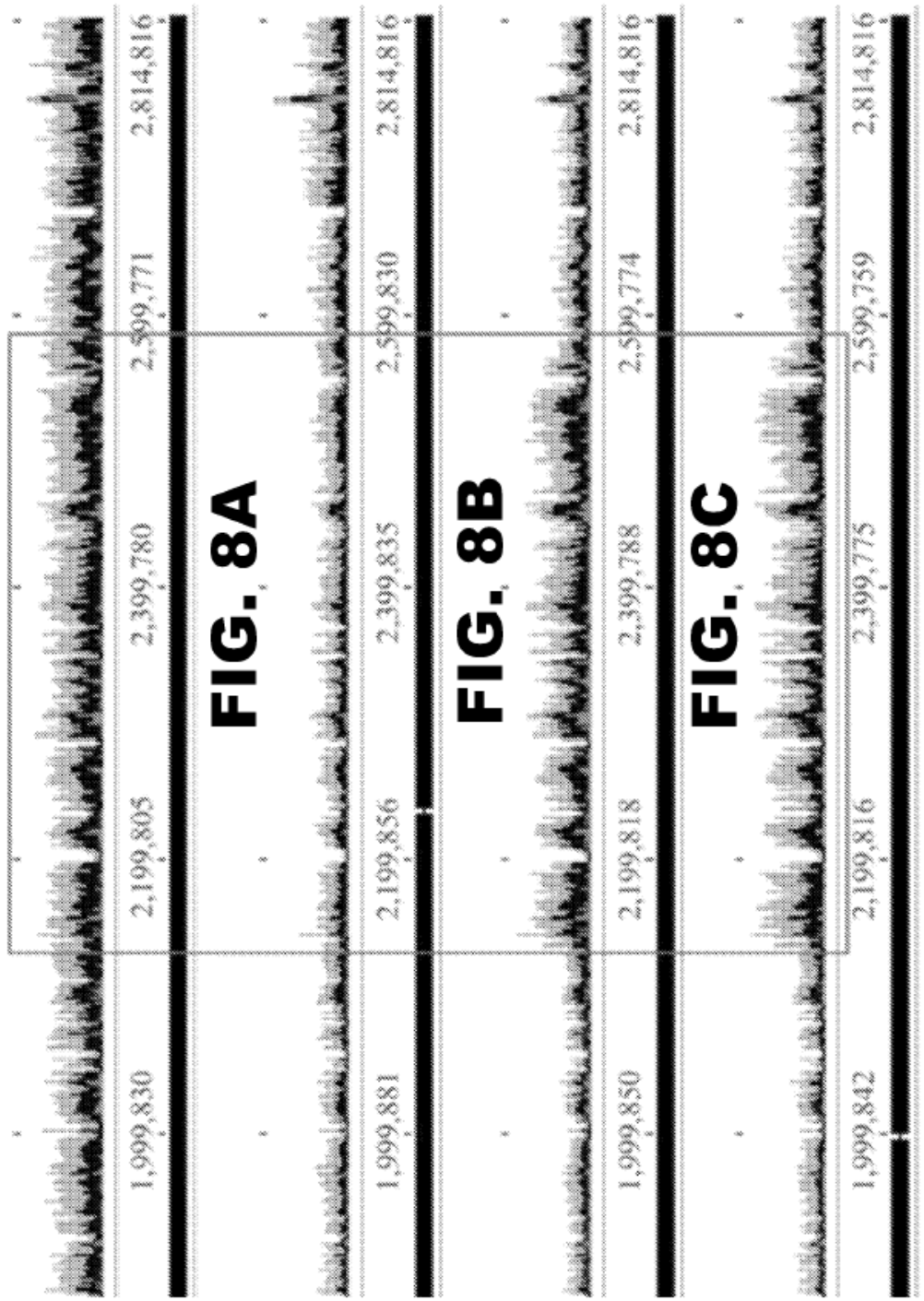


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 8C

FIG. 8D

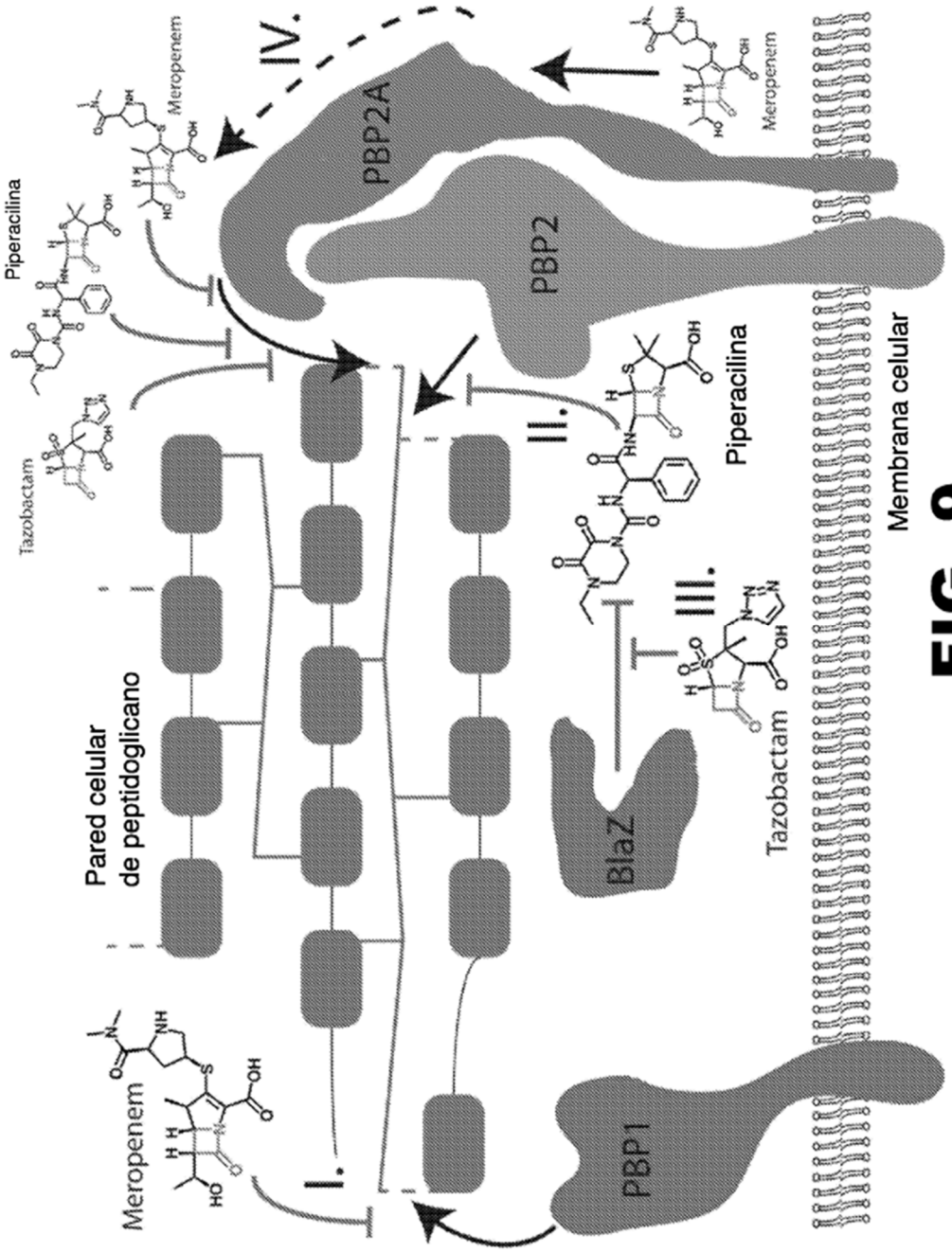

Meropenem
Piperacilina
Tazobactam
Pared celular
de peptidoglicano
I.
II.
III.
IV.
PBP1
PBP2
PBP2A
BlaZ
Membrana celular

FIG. 9