



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 346 808**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/48 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07732211 .3**

(96) Fecha de presentación : **29.03.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2004215**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

(54) Título: **Composiciones antimicrobianas que comprenden un péptido catiónico y una endopeptidasa de glicil-glicina.**

(30) Prioridad: **31.03.2006 GB 0606493**
04.08.2006 GB 0615500

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2010

(73) Titular/es: **The University Court of the University of
St. Andrews
College Gate, North Street
St. Andrews, Fife KY16 9AJ, GB**

(72) Inventor/es: **Coote, Peter, John y
Graham, Shirley**

(74) Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 346 808 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones antimicrobianas que comprenden un péptido catiónico y una endopeptidasa de glicilglicina.

La presente invención se refiere a unas composiciones para inhibir la propagación de organismos procariontes, como las bacterias.

Se conocen diversos tipos de agentes con actividad bactericida o bacteriostática, por ejemplo los antibióticos. Sin embargo, cada vez más, la resistencia microbiana a los antibióticos está creando dificultades en el tratamiento de algunas infecciones. Surgen dificultades concretas con infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* que es una causa importante de infecciones hospitalarias y comunitarias. En los hospitales, los pacientes cateterizados o que se recuperan de procedimientos quirúrgicos tienen una tasa de infección significativamente mayor con morbilidad y mortalidad considerables. En algunos países el problema empeora debido a que la mayoría de las infecciones nosocomiales por *S. aureus* son causadas por cepas que son multirresistentes a los antibióticos. Estas cepas multirresistentes a fármacos se denominan "MRSA" (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina). Se ha dado un aumento drástico en la proporción de aislados de *S. aureus* clasificados como MRSA. Por ejemplo, en el RU en 2.004, el 40% de todos los aislados de bacteriemias por *S. aureus* se clasificaron como MRSA. Queda claro por tanto que el MRSA es un problema considerable, especialmente en el mundo desarrollado.

Se han desarrollado combinaciones específicas de antimicrobianos para tratar enfermedades derivadas de microorganismos en seres humanos y animales, especialmente enfermedades causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. Por ejemplo, la infección por la bacteria Gram positiva *Mycobacterium tuberculosis* (el agente etiológico de la tuberculosis), que adquiere fácilmente resistencia a los antibióticos, puede tratarse más eficazmente con una combinación de antibióticos diferentes. Además, la combinación del antibiótico betalactámico amoxicilina y el ácido clavulónico inhibidor de la beta-lactamasa (Nadler JP *et al.*, Chest, 1991, Vol. 99, pp. 1025-1026) ha tenido como resultado el desarrollo de un tratamiento eficaz para algunas bacterias resistentes a la penicilina. De esta manera, los métodos de combinaciones de tratamiento de la infección bacteriana tienen el beneficio de tener menos probabilidades de inducir resistencia en las bacterias debido a que tienen como diana múltiples sitios de acción diferentes. Si las combinaciones de antimicrobianos presentan un modo sinérgico de acción también tienen el beneficio añadido de ser más económicas ya que la combinación utiliza cantidades menores de antimicrobianos que si se utilizaran solos. Las infecciones nosocomiales suelen implicar bacterias multirresistentes y éstas tienen como resultado un aumento de la mortalidad, morbilidad y coste de tratamiento de los pacientes afectados.

Los agentes antimicrobianos se derivan de una amplia variedad de fuentes. Por ejemplo, la proteína ranalexina es secretada por la rana toro norteamericana (*Rana catesbeiana*) y consiste en 20 aminoácidos (N-terminal F-L-G-G-L-I-K-I-V-P-A-M-I-C-A-V-T-K-K-C C-terminal) con un único enlace disulfuro intramolecular que forma un anillo heptapéptido dentro de la molécula (Clark *et al.*, J Biol Chem, 1994, Vol.

269 No. 14, pp 10849-10855). La ranalexina tiene una estructura similar al antibiótico bacteriano polimixina, que también es un péptido anfipático con un anillo heptapéptido. La ranalexina se ha sometido a ensayo *in vivo* con éxito para evitar la infección de injertos vasculares causada por *Staphylococcus epidermidis* Gram positivo resistente a antibióticos (Giacometti *et al.*, J Antimicrob Chemother, 2000, Vol. 46, pp 751-756). También se ha demostrado que otros péptidos anfipáticos catiónicos tienen actividad antimicrobiana. Hasta la fecha, se han descrito más de 500 de tales péptidos (véase Zasloff Nature, 2002, 415:389-395). Estos péptidos son todas moléculas anfipáticas: tienen unos dominios hidrófobos que comprenden cadenas laterales de aminoácidos no polares, y unos dominios hidrófilos de residuos polares y cargados positivamente. Por ejemplo las dermaseptinas, como la dermaseptina S3, muestran actividad antimicrobiana, p. ej., contra las levaduras, incluso en forma truncada (Coote *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 1998, Vol. 42, No. 9, pp 2160-2170). Se han llevado con éxito estudios funcionales *in vitro* de péptidos catiónicos como la ranalexina o la megainina2 en combinación con antibióticos utilizados clínicamente como la claritromicina o la polimixina E contra aislados clínicos de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Una combinación de los péptidos con estos antibióticos dio como resultado un efecto sinérgico (Giacometti *et al.*, J Antimicrob Chemother, 1999, Vol. 44, pp 641-645). Las megaininas se derivan de la rana de uñas africana *Xenopus laevis* y las dermaseptinas de la rana arbórea sudamericana *Phyllomedusa sauvagii* (que comprende s1 a s5) son de 23-24 aminoácidos de longitud, catiónicos y anfipáticos, y pueden adoptar una conformación alfa helicoidal.

Determinadas enzimas también pueden mostrar una actividad antimicrobiana, por ejemplo interfiriendo con la pared celular bacteriana. Un ejemplo de una enzima de este tipo es la lisozima, que puede aislarse del líquido lagrimal o la clara de huevo. La lisozima hidroliza el enlace glucosídico beta-1,4 entre la N-acetil glucosamina y el ácido N-acetilmurámico, llevando así a la ruptura de la pared. Otra enzima que también tiene como diana la pared celular bacteriana es la lisostafina. Esta metalopeptidasa dependiente del cinc de 27 KDa, que es secretada por cepas de *Staphylococcus stimulans* y *S. staphylolyticus*, escinde los enlaces glicina-glicina en los puentes cruzados de pentaglicina entre las capas de peptidoglicano de las paredes celulares estafilocócicas, lo que lleva a la lisis celular. La lisostafina puede matar *Staphylococcus aureus* a concentraciones bajas en cuestión de minutos (Wu *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 2003, Vol. 47, No. 11, pp 3407-3414). Lamentablemente, se da un nivel alto de resistencia a la lisostafina tras la exposición a niveles sub-inhibitorios. En un método para superar los problemas de resistencia, se utilizó lisostafina con un antibiótico betalactámico, que suprime la resistencia de las bacterias a la lisostafina y que dio como resultado adicional un efecto letal sinérgico (Kiri *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 2002, Vol. 46, no. 6, pp 2017-2020).

La presente invención se basa en que la lisostafina y la ranalexina actúan sinérgicamente en su acción antibacteriana.

La resistencia a la lisostafina puede seleccionarse fácilmente *in vitro* y se ha citado como un problema potencial si la enzima se desarrolla para aplicacio-

nes comerciales (Climo *et al.*, 2001, Antimic Agents Chemother, 45:1431-1437). La lisostafina también es inmunogénica, de manera que los pacientes expuestos anteriormente a la enzima podrían producir potencialmente anticuerpos que secuestrarán el compuesto y redujeran así la actividad (Walsh *et al.*, 2003, Antimic Agents Chemother, 47:554-558). Nuestra demostración de sinergia inhibitoria entre combinaciones de ranalexina y lisostafina podría abordar estos dos problemas potenciales. En primer lugar, es menos probable que se de resistencia cuando las bacterias se exponen a una combinación de dos compuestos con modos de acción divergentes, y en segundo lugar, la naturaleza sinérgica de la combinación significa que se requieren cantidades reducidas de cada compuesto individual para inducir el mismo efecto letal permitiendo el uso de niveles menores de lisostafina en circulación que tienen menos probabilidades de inducir una respuesta inmunogénica mientras mantienen la eficacia del tratamiento.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de terapias y agentes antimicrobianos adicionales, especialmente aquellos destinados a tener como diana bacterias multirresistentes como el MRSA.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una composición que comprende un péptido catiónico, que es ranalexina, dermaseptina S3 o una mezcla de las mismas, y una endopeptidasa de glicilglicina, la lisostafina.

La composición que comprende un péptido catiónico y lisostafina (una endopeptidasa de glicilglicina) inhibe la propagación de un procariota, como una bacteria Gram positiva, por ejemplo *Staphylococcus sp.* La bacteria puede ser *Staphylococcus aureus*, por ejemplo *Staphylococcus aureus* MSSA o MRSA. En una forma de realización la composición es bactericida, es decir, la composición mata las bacterias.

Se cree que los residuos cargados positivamente del péptido catiónico interactúan con la membrana de la célula bacteriana, especialmente con los fosfolípidos cargados negativamente, alterando la estabilidad e integridad de la membrana. Las membranas de las células eucariotas sólo poseen un contenido muy bajo de fosfolípidos cargados negativamente, lo que tiene como resultado la alta especificidad y selectividad de las proteínas anteriormente mencionadas para las membranas bacterianas.

La expresión "inhibe la propagación" se refiere a una acción bacteriostática (es decir, la prevención de la colonización bacteriana en una superficie desinfectada tratada con la composición de la presente invención con respecto a una superficie no tratada) y también se refiere a una acción bactericida (es decir, la aniquilación activa de las bacterias).

La combinación de los dos componentes presentes en la composición tiene como resultado un efecto antibacteriano sinérgico. Nuestros resultados han demostrado que puede producirse un efecto bactericida, y requiere cantidades menores de los dos componentes que cualquiera de los componentes cuando se utiliza solo. Este efecto sinérgico tiene la ventaja de reducir costes.

Además, puesto que cada uno de los dos componentes actúa sobre las bacterias de manera diferente, se espera por tanto que la combinación evite la adquisición de resistencia por las bacterias a la composición. Esta característica de la composición tiene especial importancia para bacterias como las cepas MRSA

de *Staphylococcus aureus* que suelen ser expertas en adquirir resistencia contra las nuevas terapias.

El péptido catiónico de la composición es ranalexina, dermaseptina, o una mezcla de las mismas. La referencia a la dermaseptina incluye derivados truncados de la misma.

La endopeptidasa de glicilglicina de la composición es lisostafina.

La composición de la presente invención puede encontrarse en forma de suspensión o solución acuosa. En esta forma de realización la composición puede aplicarse a la superficie a tratar mediante rociado, por ejemplo como un rociador de aerosol.

La composición de la invención puede aplicarse a una matriz porosa sólida. La composición sigue siendo eficaz incluso cuando se seca en la matriz. La matriz podría ser una venda, un trapo, un tampón, hilo médico, ropa quirúrgica, un apósito o similares.

En una forma de realización, la composición comprende el péptido catiónico a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ o superior, por ejemplo 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$ preferentemente de 4 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$. Concentraciones adecuadas incluyen 1 $\mu\text{g/ml}$ o superior, más preferentemente de 5 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$. Para algunas aplicaciones puede utilizarse una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ o superior (por ejemplo 10 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$).

En una forma de realización, la composición comprende la endopeptidasa de glicilglicina lisostafina a una concentración de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ o superior, por ejemplo 0,1 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$. Tales concentraciones incluyen 0,05 $\mu\text{g/ml}$ o superior, por ejemplo 0,15 $\mu\text{g/ml}$ o superior, preferentemente 0,45 $\mu\text{g/ml}$ o superior. Para algunas aplicaciones puede resultar adecuada una concentración de 0,6 $\mu\text{g/ml}$ o superior, por ejemplo 0,6 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$.

En una forma de realización preferente la composición comprende ranalexina y lisostafina. Una concentración efectiva de ranalexina y lisostafina comprende preferentemente una concentración de 5 μg a 50 μg de ranalexina por ml y 0,15 $\mu\text{g/ml}$ a 1.05 μg de lisostafina por ml.

La presente invención también proporciona un apósito que contiene la composición, y un dispositivo médico o instrumento quirúrgico que contiene o está recubierto con la composición. El apósito, que puede ser por ejemplo una tirita, una venda o similar, puede impregnarse opcionalmente con la composición o incluir una o más capas impregnadas con la composición. El instrumento quirúrgico o dispositivo médico puede estar recubierto con la composición, por ejemplo mediante rociado o inmersión para reducir el riesgo de diseminar la infección desde un paciente ó a un paciente. Instrumentos quirúrgicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un escalpelo, catéter, tubo de drenaje, pinza, aguja, grapa, tampón, hilo médico y similares. El dispositivo médico incluye cualquier dispositivo unido permanentemente o temporalmente al cuerpo de un paciente. Dispositivos médicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, endoprótesis, injertos (incluyendo injertos vasculares), stents, suturas, articulaciones de sustitución, clavos y placas para fijar huesos, dispositivos de estoma (que incluyen un dispositivo PEG), implantes contraceptivos, y similares.

La presente invención también proporciona un método para inhibir la propagación de bacterias, como *Staphylococcus aureus*, aplicando la composición

de acuerdo con la invención a una superficie de un objeto o una habitación, donde la propagación bacteriana resulta indeseable.

En una forma de realización, la superficie es una superficie de un objeto (instrumento quirúrgico, dispositivo médico, mobiliario, artículos manipulados frecuentemente, etc.) o de una habitación (pared, suelo, techo, etc.) y la composición se utiliza para desinfectar la superficie de cualquier población bacteriana existente sobre la misma y/o inhibir la recolonización de la superficie por las bacterias. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus aureus*.

La composición puede aplicarse como un lavado o puede aplicarse convenientemente como una pulverización. Opcionalmente puede utilizarse un trapo impregnado con la composición.

En una forma de realización alternativa la composición es para aplicarse a la superficie de un cuerpo de un paciente. En una forma de realización la superficie es una herida causada por un accidente, trauma o cirugía.

La composición puede aplicarse directamente a la superficie del cuerpo (por ejemplo como un spray, loción o lavado) o como un apósito que contenga la composición. La aplicación de la composición puede resultar especialmente útil antes de o siguiendo a una cirugía como tratamiento profiláctico para evitar o reducir una infección bacteriana. Por supuesto la composición también puede utilizarse para tratar eficazmente una infección bacteriana existente o establecida. Como se ha indicado anteriormente, la composición de la presente invención es especialmente eficaz contra *Staphylococcus aureus*, incluyendo MSSA y MRSA.

En una forma de realización la aplicación de la composición matará las bacterias.

La presente invención también proporciona la composición como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de una superficie de un objeto o una superficie de una habitación para combatir la propagación bacteriana sobre la misma. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus sp.*, por ejemplo *Staphylococcus aureus*.

La presente invención también proporciona la composición como se ha descrito anteriormente para su uso en combatir una infección bacteriana en un paciente. Las bacterias pueden ser *Staphylococcus aureus*.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido catiónico, que es ranalexina, dermaseptina S3 o una mezcla de las mismas, y lisostafina, para inhibir la propagación de un organismo procariota, en la que el organismo procariota tiene una pared celular que comprende una membrana de fosfolípidos que comprende uno o más fosfolípidos ácidos y un sáculo de mureína que comprende por lo menos dos capas de mureína reticuladas a través de un puente peptídico que comprende por lo menos un enlace peptídico que conecta por lo menos dos residuos de glicina, en la que dicha composición desintegra dicha pared celular, y en la que dicha endopeptidasa de glicilglicina hidroliza dicho enlace peptídico que conecta los por lo menos dos residuos de glicina y en la que dicho péptido catiónico interactúa con dicha membrana. En una forma de realización la composición mata al organismo procariota.

A continuación se describirá la presente invención en mayor detalle mediante referencia a los siguientes

ejemplos y figuras en las que:

Las Figuras 1 y 2 muestran la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) a concentraciones diferentes de ranalexina y lisostafina en un ensayo en placas microtiter.

La Figura 3 muestra la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) a concentraciones diferentes de magainina2 y lisostafina en un ensayo en placas microtiter (comparativo).

La Figura 4 muestra la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) a concentraciones diferentes de una forma truncada en el extremo C-terminal de la dermaseptina S3 (aminoácidos 1-16) marcada como "DsS3(1-16)", y lisostafina en un ensayo en placas microtiter.

La Fig. 5 muestra unos gráficos que dibujan la OD600 para cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA252 (a, c, e) y MSSA476 (b, d, f) medidos durante 24 horas con ranalexina, lisostafina o una combinación de ranalexina y lisostafina a concentraciones diferentes.

La Fig. 6 muestra unos gráficos que dibujan la OD600 de *Staphylococcus aureus* MRSA252 medidos durante 24 horas sólo con magainina2 (a) (sólo comparativo) sólo con lisostafina (d), y con una combinación de magainina2 y lisostafina (c) (sólo comparativo). Un experimento similar se muestra dibujando la OD600 de *Staphylococcus aureus* MRSA252 medida durante 24 horas sólo con dermaseptina s3(1-16) (d), sólo con lisostafina (e) y con una combinación de dermaseptina s3(1-16) y lisostafina (f).

La Figura 7 es un gráfico que muestra un efecto bactericida mejorado contra MRSA cuando se utiliza lisostafina en combinación con ranalexina.

La Figura 8 muestra la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* MRSA252 (izquierda) y MSSA476 (derecha) en placas de agar que sigue a la introducción de discos de papel impregnados con lisostafina y/o ranalexina. La inhibición se ilustra mediante las zonas claras alrededor de los discos de papel.

Ejemplo 1

Se cultivaron cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) en TSB (caldo triptona-soja; Oxoid Basingstoke, RU) hasta una fase exponencial media. A continuación se diluyeron los cultivos en medio fresco hasta una densidad óptica de partida de 600 nm de 0,001 (aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/ml). Se midió un crecimiento de cultivos de 100 μ l de volumen en placas de cultivo de 96 pocillos utilizando TSB como control a 37°C durante 48 horas sin agitación en presencia de un medio de 0 μ g de ranalexina/ml a 50 μ g/ml, aumentando de manera incremental en 5 μ g/ml. Se cultivaron 8 muestras para cada concentración de ranalexina y a cada una de tales muestras se añadió una concentración diferente de lisostafina desde 0 μ g/ml hasta 1,05 μ g/ml en etapas de 0,15 μ g/ml. Se midió la actividad antibacteriana mediante turbidez reducida medida por densidad óptica mediante escaneo en un escáner de imágenes (GE Healthcare RU Ltd) utilizando un software Image Master Labscan v.3. Los resultados se muestran en la Figura 1. La concentración de ranalexina se indica por encima de la columna respectiva, teniendo cada pocillo de una columna la misma

concentración de ranalexina. Los pocillos de cada fila contienen lisostafina a una concentración final de 0 μg de lisostafina por ml de medio a 1,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (como se indica en la izquierda), aumentando de manera incremental en 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para *S. aureus* MSSA476 cultivado en ausencia de lisostafina, la ranalexina proporciona un efecto inhibitorio a concentraciones por encima de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio (por lo general de 35 a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En ausencia de ranalexina, resulta efectiva una concentración de lisostafina superior a 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (MSSA476 presentaba un MIC de aproximadamente 0,75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MRSA252 de aproximadamente 0,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La combinación de ranalexina y lisostafina reduce la cantidad necesaria de cada uno de los compuestos proporcionando un efecto antimicrobiano sinérgico.

Por ejemplo, en presencia de ranalexina a una concentración mínima de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o mayor, una concentración de 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina inhibía completamente el crecimiento de MRSA252 durante 48 horas, y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ranalexina con 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina inhibía la MRSA475 durante el mismo período. En presencia de lisostafina a una concentración mínima de 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o mayor, la presencia de ranalexina a más de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio resulta suficiente para lograr tal efecto.

S. aureus MRSA252 cultivado en ausencia de lisostafina es inhibido por la ranalexina a concentraciones superiores a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio; en ausencia de ranalexina, se necesita una concentración de lisostafina superior a 0,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para tal efecto. La combinación de ranalexina y lisostafina reduce nuevamente la cantidad necesaria de cada uno de los compuestos. El efecto inhibitorio puede observarse a concentraciones superiores a 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tanto para la lisostafina como para la ranalexina.

Ejemplo 2

Se cultivaron las cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) en medio TSB como se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto para los intervalos de concentración más estrechos de ranalexina y lisostafina. La ranalexina se proporciona a concentraciones de 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aumentando de manera incremental en 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio, y concentraciones de lisostafina de 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con concentraciones intermedias de 0,01 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,025 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,075 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como se indica en la Fig. 2.

Estudiando concentraciones menores de los dos compuestos, pudimos definir con mayor precisión los límites de crecimiento (Figura 2). De esta manera, la exposición de MRSA252 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ranalexina con 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina representaba los niveles efectivos mínimos de los compuestos que suprimían el crecimiento. De manera similar, la exposición de la MSSA476 a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ranalexina con 0,15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina representaba los niveles efectivos mínimos que suprimían el crecimiento de esta cepa.

Ejemplo 3

Se cultivaron las cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) en medio TSB como se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto porque la ranalexina se sustituyó por dermaseptina s3(1-16) (un derivado truncado de la dermaseptina s3, Mor & Nicolas, Eur J Biochem, 1994, 219:31635-31641) a las mismas concentraciones (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como se indica en la Figura 4.

La dermaseptina s3(1-16) sola tenía escaso efec-

to inhibitorio en cualquiera de las cepas de *S. aureus* (hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pero al aplicarse en combinación con lisostafina, se observó una inhibición sinérgica significativa (Figura 4). Por ejemplo, las concentraciones mínimas de los compuestos combinados que inhibían completamente el crecimiento visible fueron 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dermaseptina s3(1-16) y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina.

Ejemplo 4

Sólo comparativo

Se cultivaron las cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 (izquierda) y MRSA252 (derecha) en medio TSB como se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto porque la ranalexina se sustituyó por magainina2 a las mismas concentraciones (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como se indica en la Figura 3.

La magainina2 sola tenía escaso efecto inhibitorio en cualquiera de las cepas de *S. aureus* (hasta 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), pero la combinación con lisostafina dio como resultado una inhibición sinérgica significativa (Figura 3). Por ejemplo, el crecimiento visible se inhibió completamente durante 48 horas tras una exposición a 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de magainina2 y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina.

Ejemplo 5

Las cepas de *Staphylococcus aureus* MSSA476 y MRSA252 se cultivaron y colocaron en placas de 96 pocillos como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se incubaron las placas a 37°C con agitación durante 24 horas en un espectrofotómetro de microplacas automático PowerWave XS (Bio-tek Instruments Inc., Winooski, EEUU) realizando lecturas de densidad óptica (600 nm) cada 11 min. Se recogieron los datos automáticamente utilizando el software KC4 v.3.2 (Bio-tek, Instruments Inc., Winooski, EEUU) y se analizaron en Microsoft Excel en medio TSB. Las placas contenían concentraciones diferentes de ranalexina, magainina2, dermaseptina s3(1-6) y lisostafina, o combinaciones de lisostafina y ranalexina, lisostafina y magainina2, o lisostafina y dermaseptina s3(1-6). Se midió el aumento de la densidad óptica (OD) a 600 nm y se dibujó contra el tiempo de cultivo (véanse las Figuras 5 y 6). El efecto sinérgico para una combinación de ranalexina y lisostafina se muestra en la Figura 5. Una combinación de ranalexina y lisostafina se compara con ranalexina o lisostafina solas para MRSA252 (a, c, e) y MSSA476 (b, d, f). El efecto inhibitorio sinérgico sobre MRSA252 se obtiene para la composición que comprende 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ranalexina y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 5a). Puede observarse un efecto sinérgico para MSSA476 que tiene como resultado un aumento retardado en la OD600 para una concentración de ranalexina de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ combinada con 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 5b), pero la inhibición total del crecimiento durante 24 horas se obtiene a concentraciones de 10 μg de ranalexina/ml y 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 5d) ó 5 μg de ranalexina/ml y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 5f).

Los efectos sinérgicos para la magainina2 y lisostafina se muestran en la Figura 6a-c sólo con fines comparativos, (Figs 6 a, b, c: magainina2 y lisostafina, Figs 6d, e, f: dermaseptina s3(1-6) y lisostafina). Se compara una combinación de ambos compuestos con diferentes concentraciones de magainina2 o lisostafina. El efecto inhibitorio sinérgico se obtiene a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de magainina2 y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 6c) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dermaseptina s3 (1-16) y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisostafina (Fig 6f).

Ejemplo 6

Se expuso MRSA252 en caldo TSB durante 30 mins a: concentraciones crecientes (0, 1, 2, 4, 6, 8, y 10 $\mu\text{g/ml}$) de ranalexina sola (cuadrados rellenos); concentraciones crecientes (0,0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) de lisostafina sola (círculos rellenos); o una combinación de 8 $\mu\text{g/ml}$ de ranalexina con concentraciones crecientes (0,0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) de lisostafina. Se determinaron los números de células totales, o supervivientes, tras una exposición de 30 minutos en cada una de las condiciones anteriormente indicadas mediante dilución seriada y cultivo en agar TSB. Se determinaron los supervivientes tras 24 horas de incubación de las placas TSB a 37°C y se expresaron como el logaritmo de las unidades formadoras de colonias por ml de caldo. Los resultados se muestran en la Figura 7. Las flechas de la Figura 7 indican que los números de supervivientes fueron menores que el mínimo detectable por este método.

Como se muestra en la Figura 7, la exposición a concentraciones de ranalexina de hasta 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ no tenía efecto detectable en la viabilidad. Una duración idéntica de exposición a concentraciones crecientes de lisostafina, de 0,01 a 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, dio como resultado una reducción menor de los números de células viables. Por ejemplo, 30 minutos de exposición a 0,06 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lisostafina dio como resultado una reducción de 0,5 log en números pero una exposición a 0,1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lisostafina dio como resultado una reducción de 2 log (>99%). En particular, la combinación de 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ranalexina con concentraciones crecientes de lisostafina dio como resultado una reducción drástica de la viabilidad tras una exposición de 30 minutos. Por ejemplo, 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ranalexina con 0,08 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lisostafina dio como resultado una reducción mayor que 4 log (más allá del límite de detección) en los números de células (Figura 7). De esta manera, la inhibición sinérgica por ranalexina y lisostafina da como resultado un efecto bactericida mejorado.

Ejemplo 7

Se impregnaron discos de papel Whatman estériles con ranalexina (0,5, 1, 2, 5, 10 ó 20 μg), con lisostafina (0,1, 0,2, 0,5, 1, 2 ó 5 μg), una combinación de 1 μg de lisostafina y ranalexina (0,5, 1, 2, 5, 10 ó 20 μg), o una combinación de 10 μg de ranalexina y lisostafina (0,2, 0,2, 0,5, 1, 2 ó 5 μg). Se dejaron secar los discos de papel durante toda la noche y a continuación se almacenaron a -20°C hasta que fueran requeridos.

Se hicieron crecer cultivos de *Staphylococcus aureus* MRSA252 y *Staphylococcus aureus* MS-SA476 hasta una fase semi-logarítmica (OD600 0,6-

0,9) y se diluyeron a 0,6 en caso de ser necesario. A continuación se rociaron 150 μl del cultivo sobre placas de TSA (agar triptona-soya; Oxoid, Basingstoke, RU) y se dejaron secar. Un disco de papel impregnado preparado como se ha descrito anteriormente se colocó centralmente en las placas de agar. Se incubaron las placas durante 20 horas a 37°C antes de la valoración visual de las zonas de inhibición (véase la Figura 8) que resultaron visibles como zonas claras alrededor de los discos. Puede verse por la Figura 8 que se dio cierta inhibición mínima a una concentración de 20 μg de ranalexina y a 5 μg de lisostafina, pero no a concentraciones menores de los agentes cuando se utilizaron solos.

Sin embargo, la exposición a discos impregnados con combinaciones de ranalexina y lisostafina revelaron claramente una inhibición sinérgica, con zonas de inhibición más grandes y más significativas (Figura 8). Por ejemplo, los discos que contenían 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lisostafina pero con ranalexina creciente, mostraron unas zonas claras de inhibición con combinaciones superiores a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ranalexina. De manera similar, los discos con una concentración fija de ranalexina (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), pero lisostafina creciente (0,1-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$), mostraron zonas claras de inhibición con combinaciones superiores a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de lisostafina. En comparación con las zonas de inhibición observadas al someter a ensayo antibióticos convencionales, las zonas observadas con ranalexina y lisostafina son menores. Con la lisostafina, esto se ha atribuido a la pobre difusión de la molécula a través del agar en comparación con los antibióticos convencionales (Kusuma & Kokai-Kum, 2005, Antimic Agents Chemother 49:3256-3263). Tanto la lisostafina como la ranalexina son proteínas cargadas básicas con pesos moleculares de 27 y 2,1 kDa respectivamente. La mayoría de los antibióticos convencionales son mucho menores, con pesos moleculares inferiores, lo que quizás explica las zonas de inhibición aparentemente pequeñas observadas con la ranalexina y la lisostafina. Sin embargo, los resultados demostraron que la combinación sinérgica aniquilaba de manera efectiva el crecimiento de las bacterias en una superficie porosa incluso después que añadir los compuestos a una matriz porosa y permitir su secado. De esta manera las heridas infectadas con MRSA resistente a fármacos podrían ser tratadas de manera eficaz con apósitos o vendas impregnadas con los dos compuestos. Otras aplicaciones potenciales podrían incluir el tratamiento tópico de infecciones cutáneas estafilocócicas, limpiador de superficies para eliminar MRSA y el tratamiento de dispositivos médicos invasivos, por ejemplo, catéteres, suturas, etc. para evitar la infección por MRSA potencialmente peligrosa para la vida.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende lisostafina y un péptido catiónico que es ranalexina, dermaseptina S3 o una mezcla de las mismas.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que el péptido catiónico y la lisostafina se encuentran en forma de suspensión o solución acuosa.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende ranalexina y lisostafina.

4. Composición según la reivindicación 3 que comprende ranalexina a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente de 5 a 50 $\mu\text{g/ml}$, y lisostafina a una concentración de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente 0,15 a 1,05 $\mu\text{g/ml}$.

5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende dermaseptina S3 y lisostafina.

6. Composición según la reivindicación 5, que comprende dermaseptina a una concentración de 0,001 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente de 5 a 10 $\mu\text{g/ml}$, y lisostafina a una concentración de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente de 0,05 a 100 $\mu\text{g/ml}$.

7. Apósito o matriz porosa sólida que contiene una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Matriz según la reivindicación 7 que es una venda, trapo, tampón, hilo médico, ropa quirúrgica, apósito o similar.

9. Dispositivo médico o instrumento quirúrgico impregnado o recubierto con una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

10. Método para tratar una superficie de un objeto o una superficie de una habitación para combatir la propagación bacteriana sobre la misma, comprendiendo dicho método aplicar a dicha superficie una

composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicha composición se aplica como un rociador de aerosol.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso para combatir la propagación de las bacterias.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de una superficie de un objeto o una superficie de una habitación para combatir la propagación bacteriana sobre la misma.

14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso para combatir o evitar una infección bacteriana en un paciente.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que las bacterias son bacterias Gram positivas, preferentemente *Staphylococcus sp.*

16. Composición según la reivindicación 15, en la que la bacteria es *Staphylococcus aureus*, preferentemente *Staphylococcus aureus* MRSA.

17. Composición que comprende un péptido catiónico que es ranalexina, dermaseptina S3 o una mezcla de las mismas y lisostafina para inhibir la propagación de un organismo procariota, en la que el organismo procariota tiene una pared celular que comprende una membrana de fosfolípidos que comprenden uno o más fosfolípidos ácidos y un saco de mureína que comprende por lo menos dos capas de mureína reticuladas mediante un puente peptídico que comprende por lo menos un enlace peptídico que conecta por lo menos dos residuos de glicina, en la que dicha composición desintegra dicha pared celular, y en la que dicha lisostafina hidroliza dicho enlace peptídico que conecta los por los menos dos residuos de glicina y en la que dicho péptido catiónico interactúa con dicha membrana.

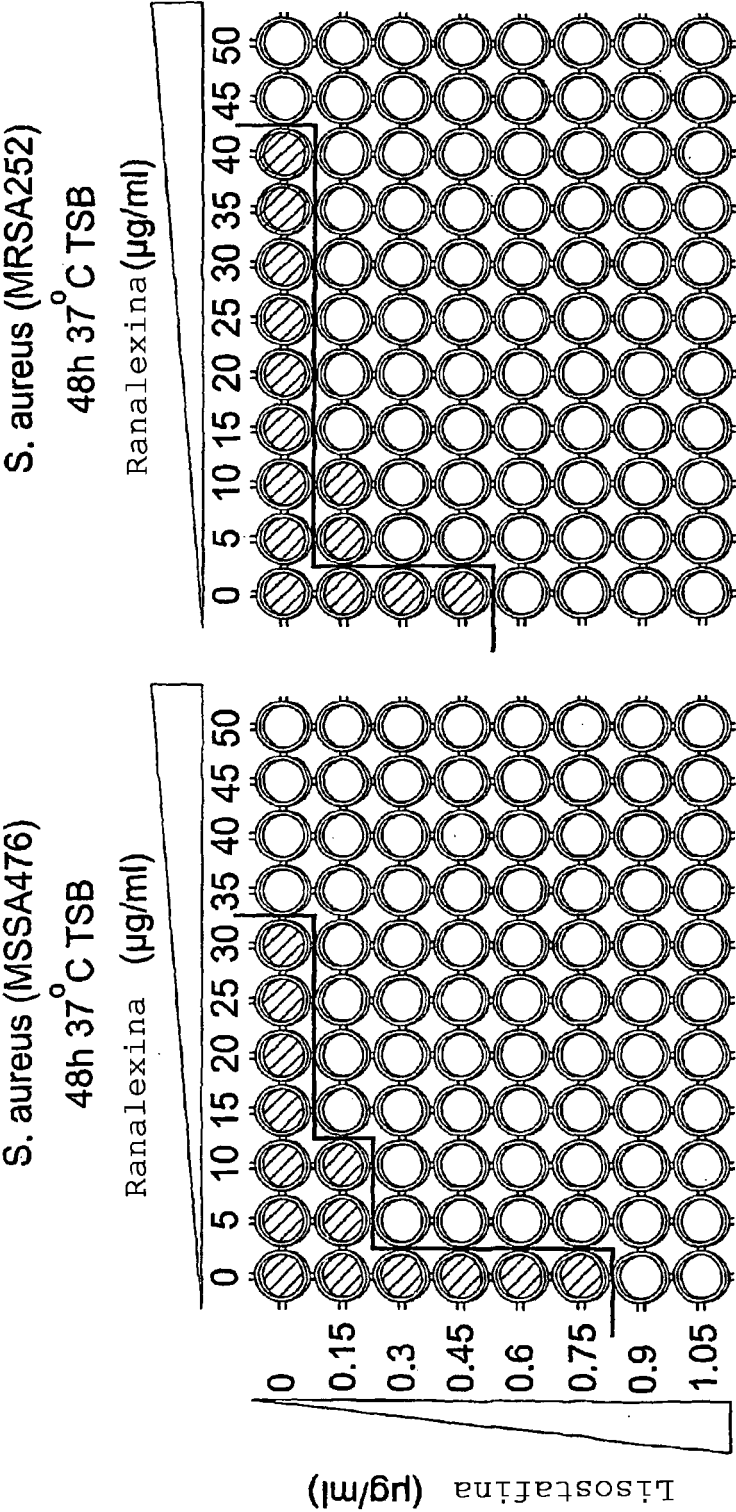


Fig. 1

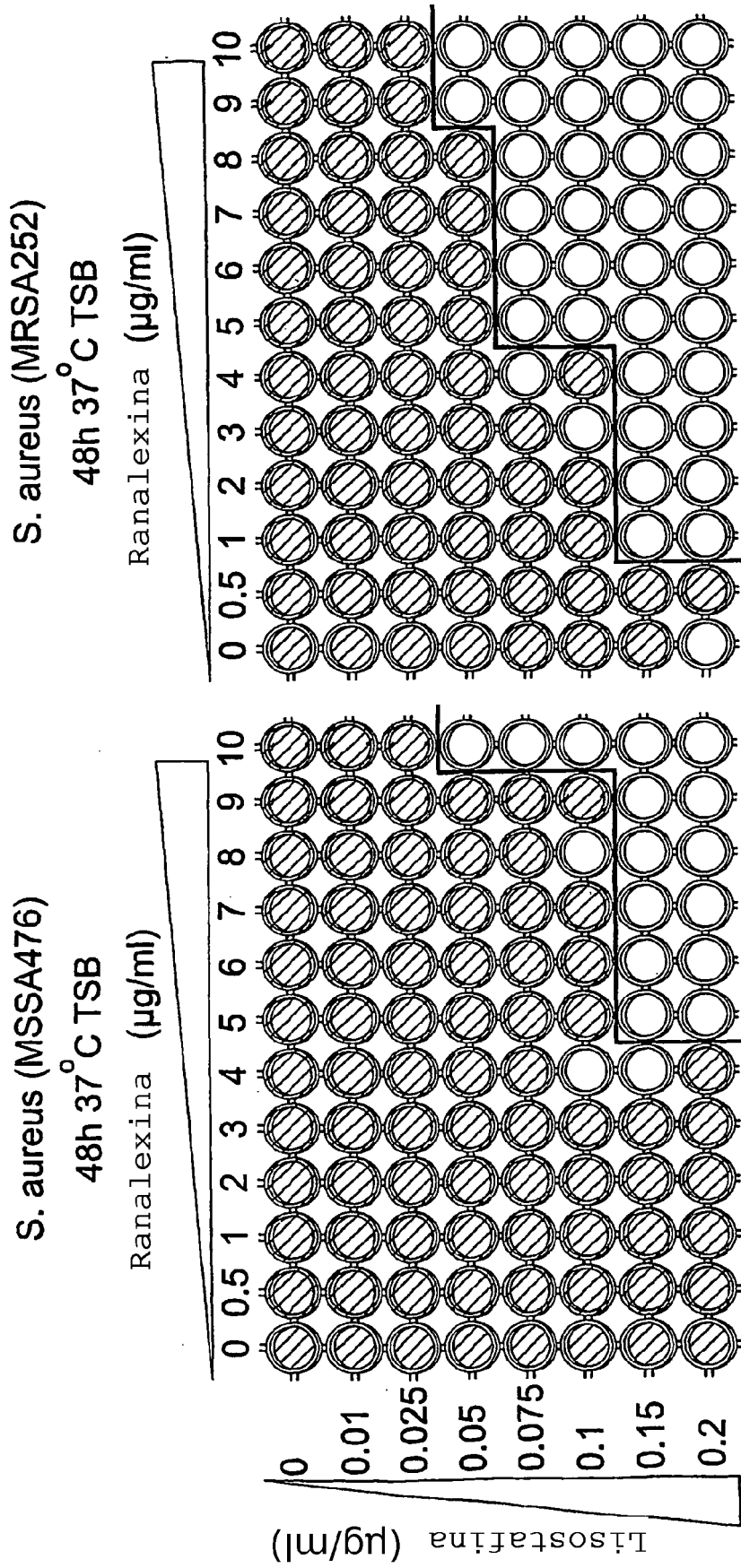


Fig. 2

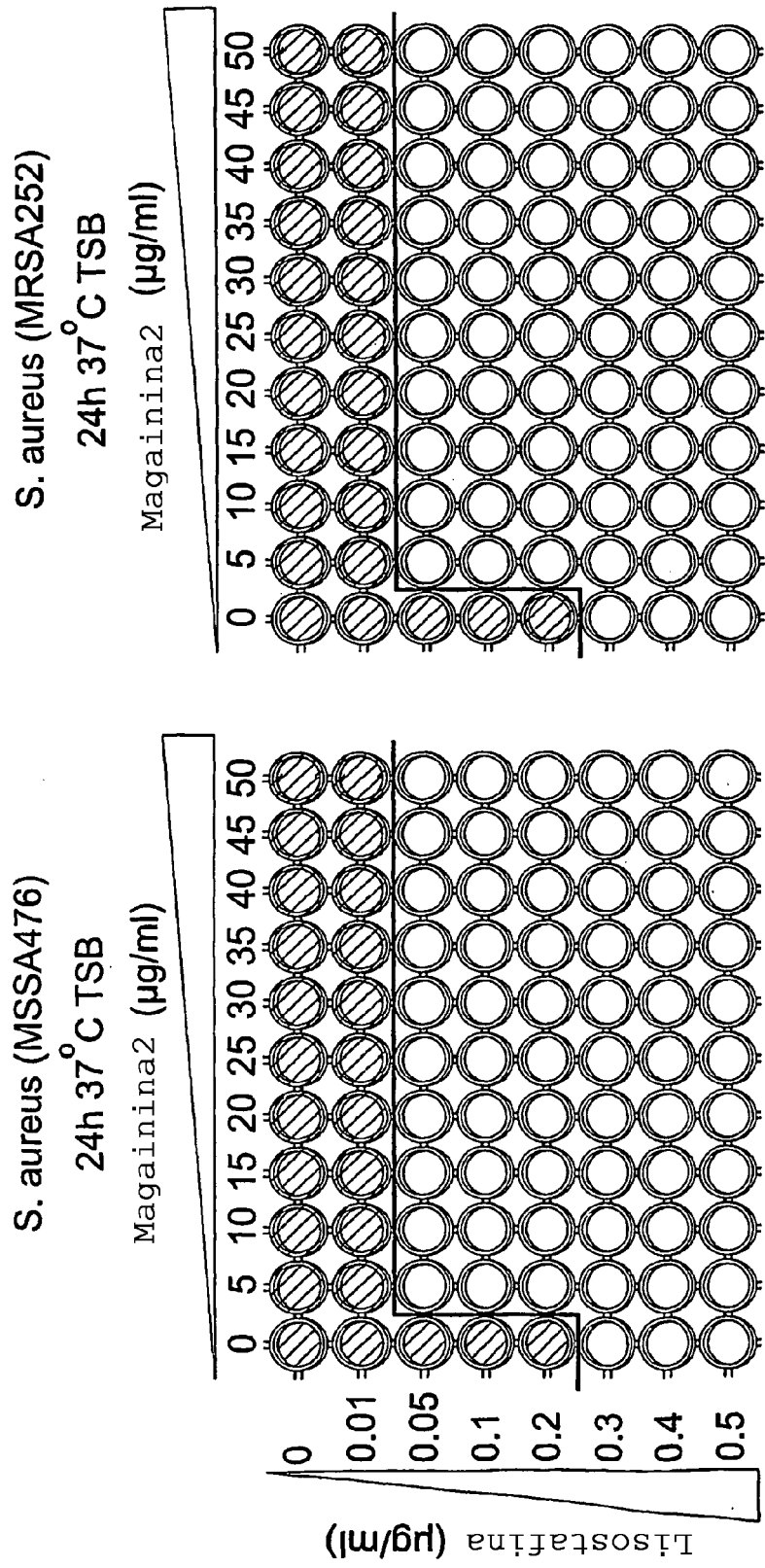


Fig. 3

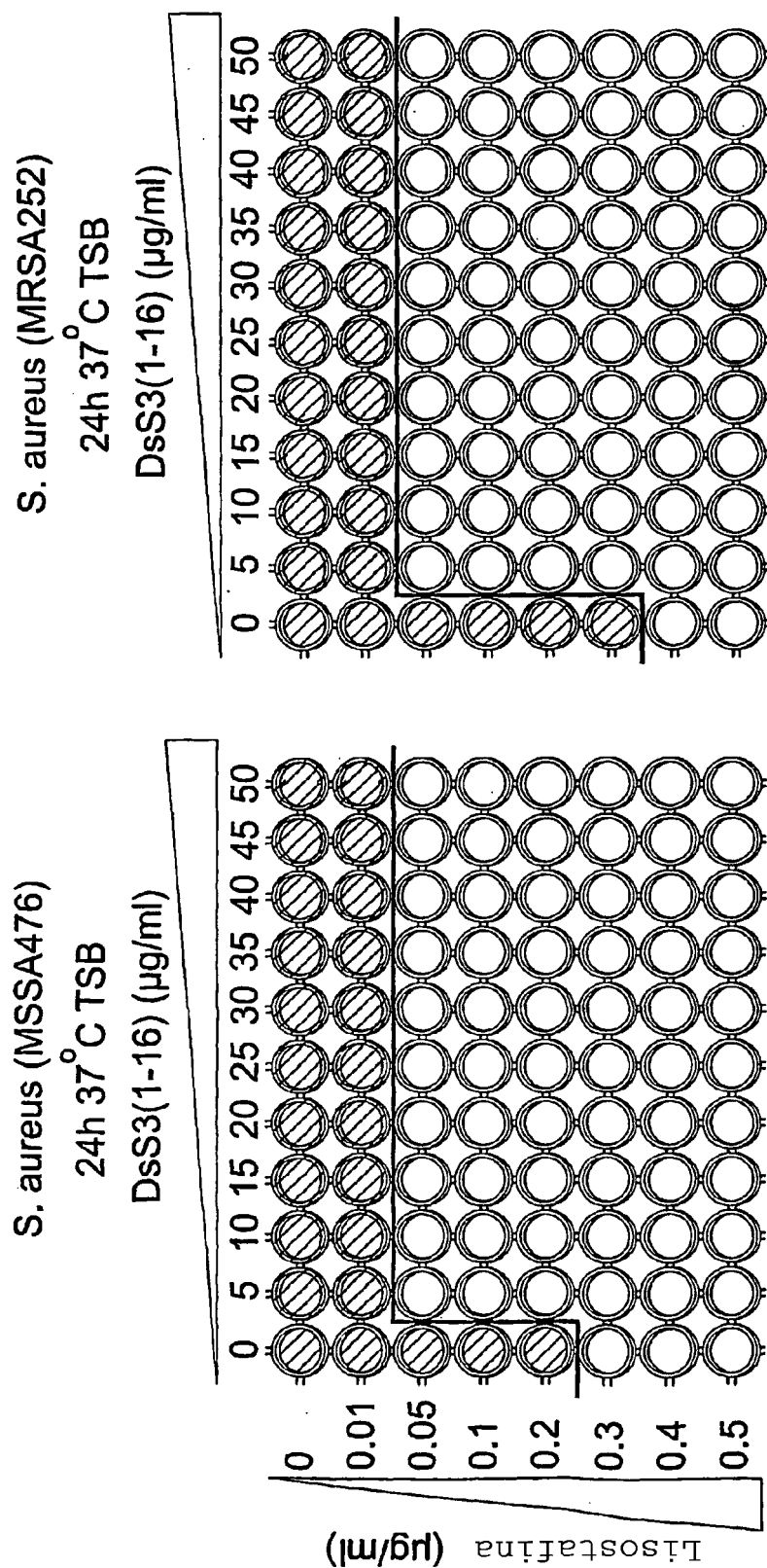


Fig. 4

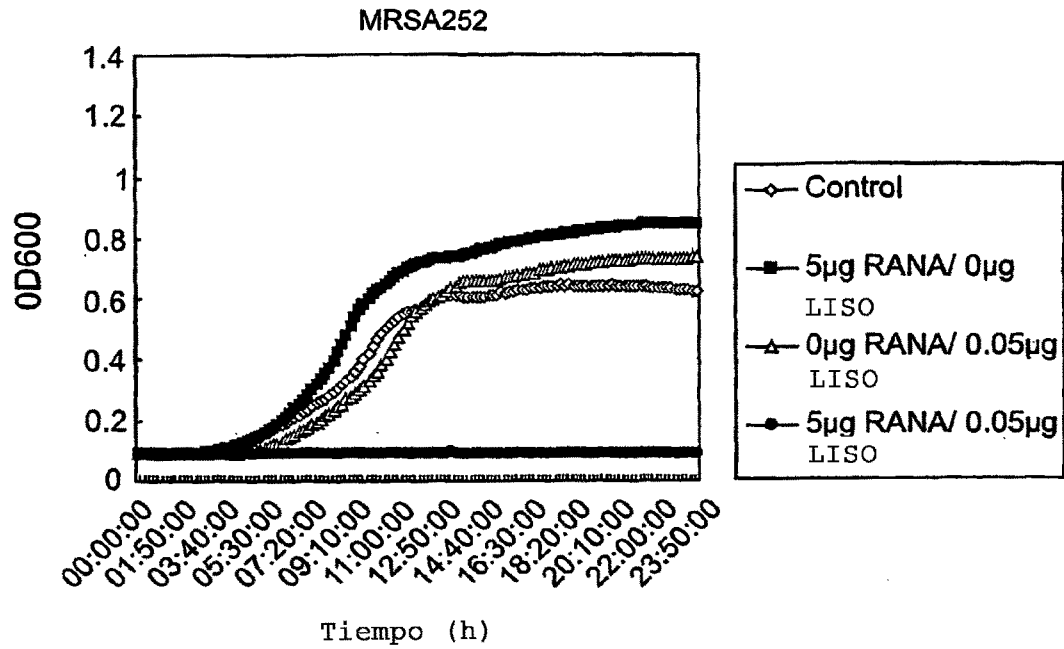


Fig. 5a

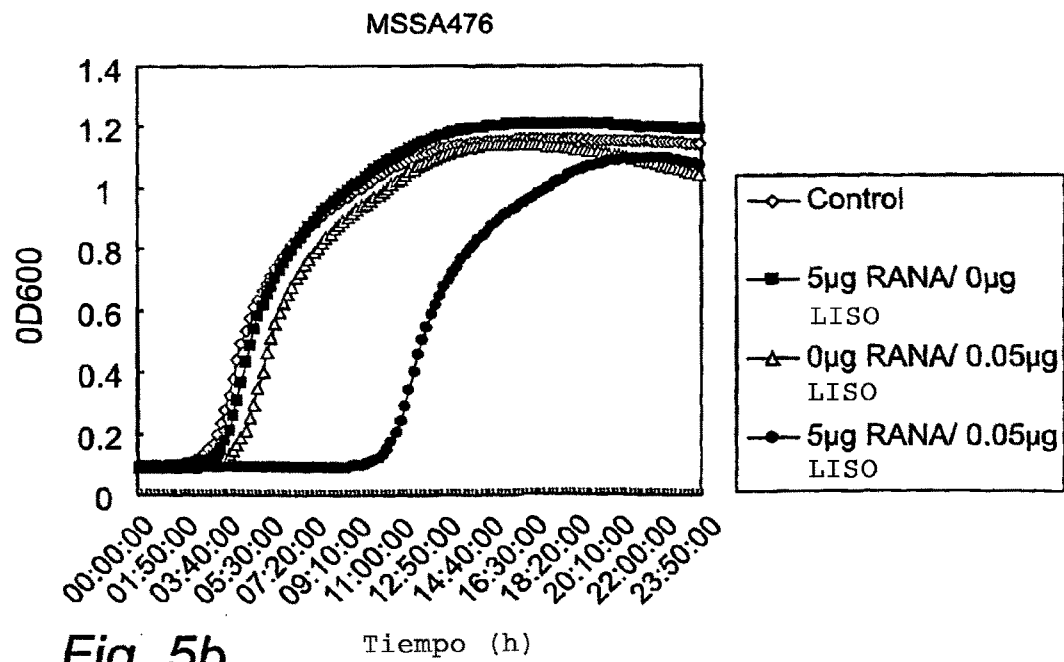


Fig. 5b

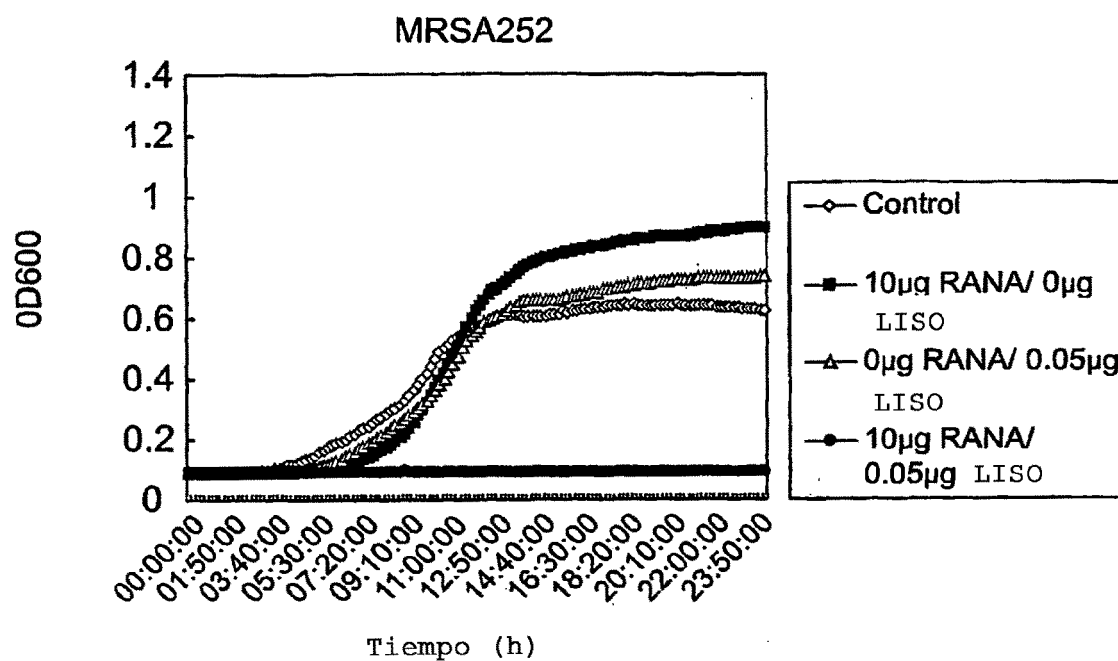


Fig. 5c

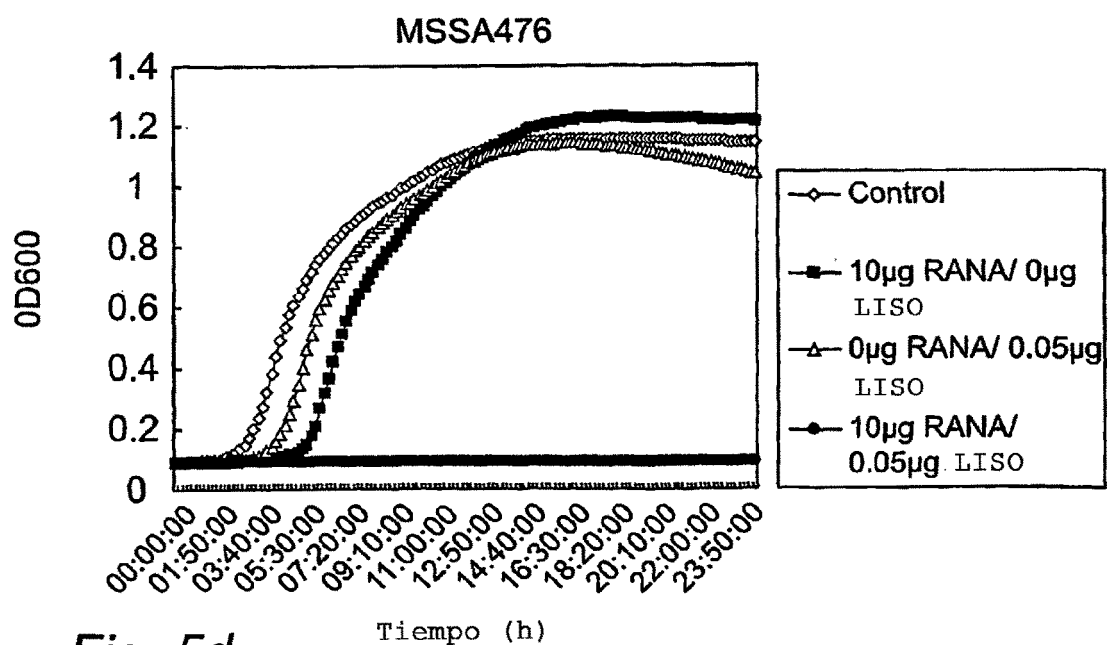


Fig. 5d

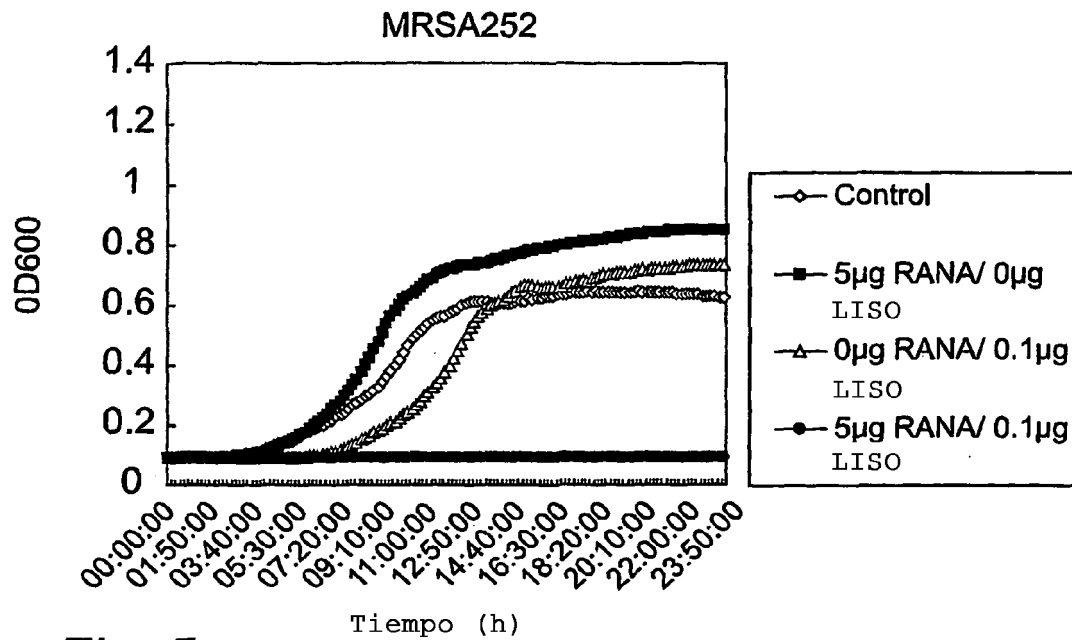


Fig. 5e

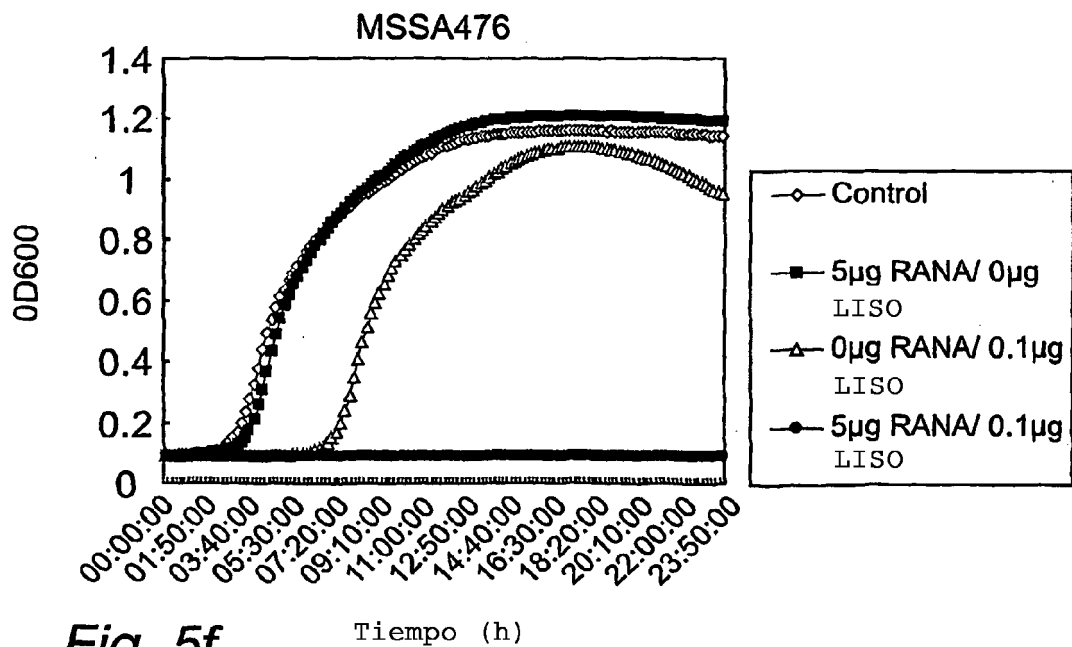
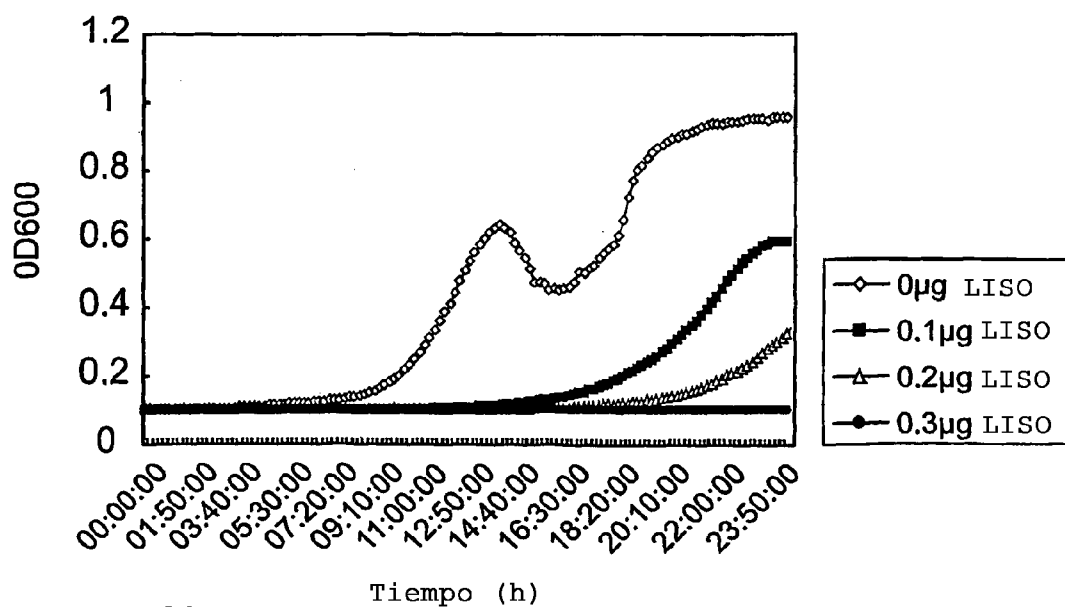
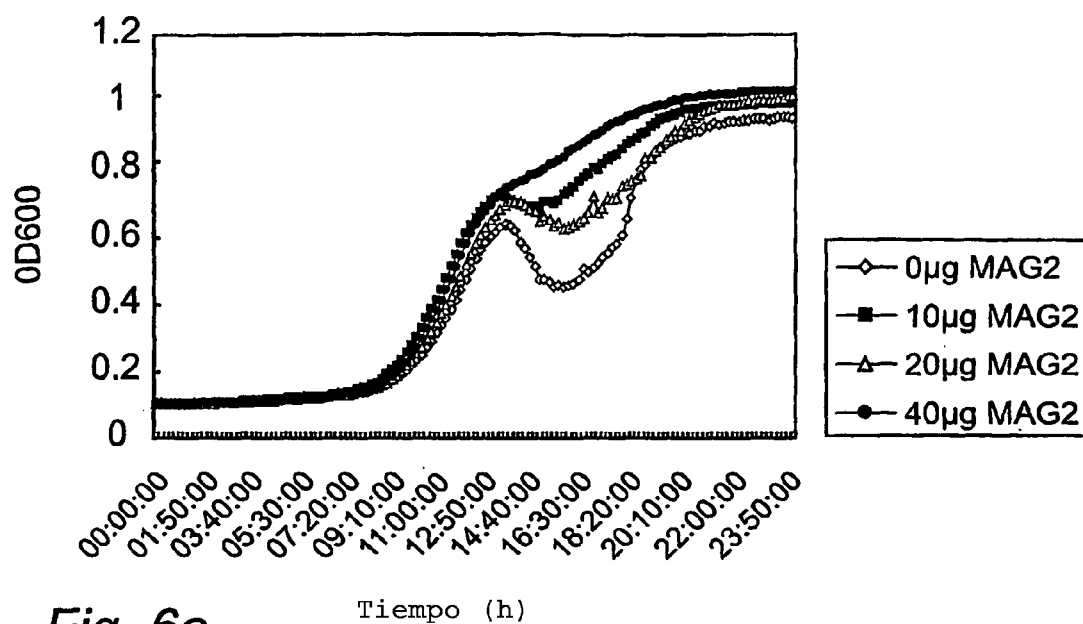
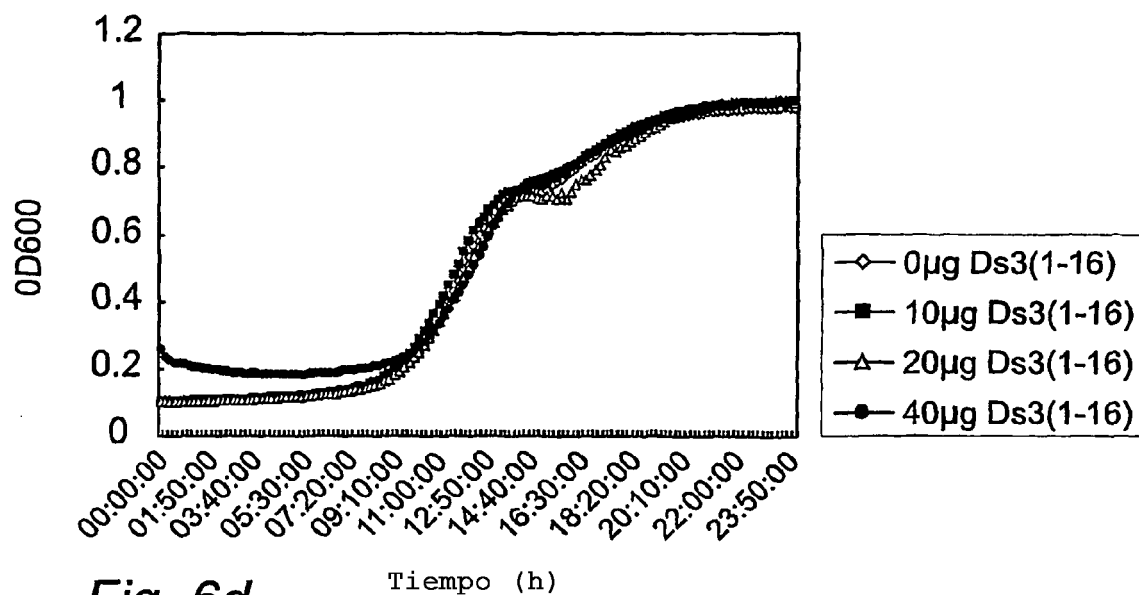
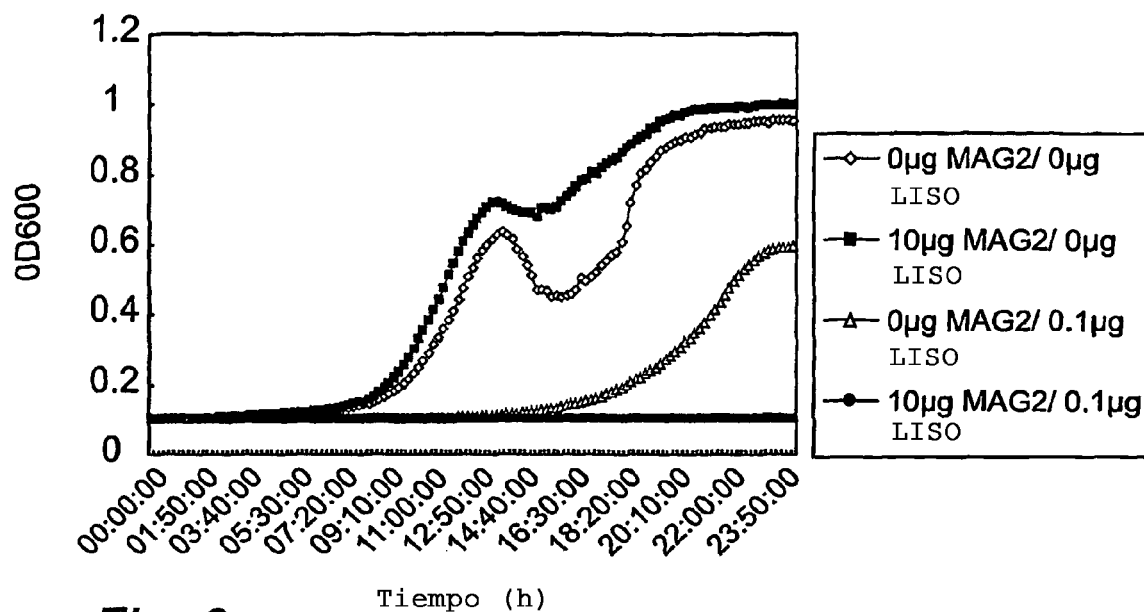


Fig. 5f





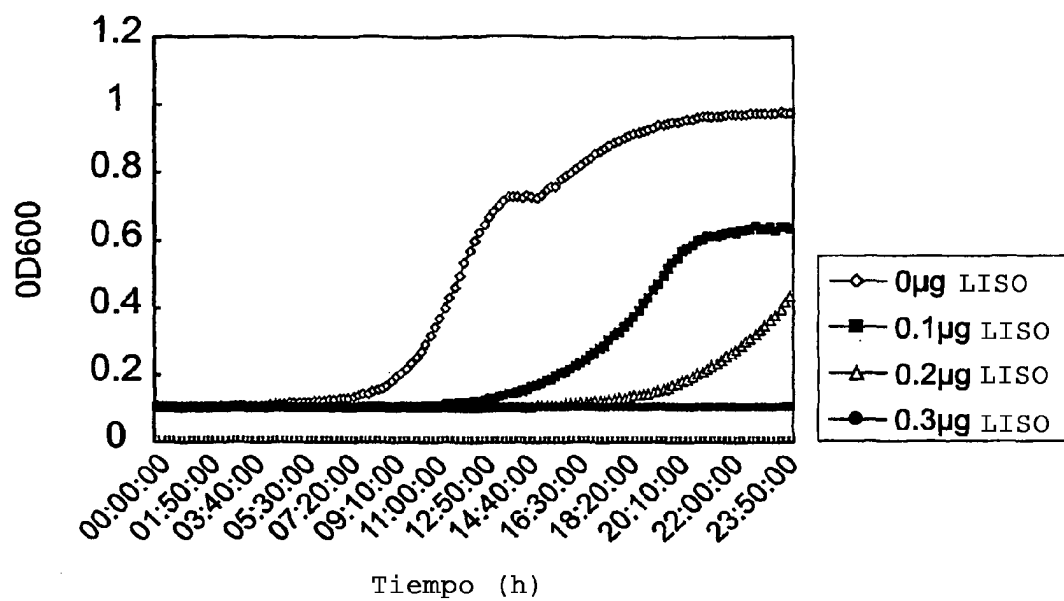


Fig. 6e

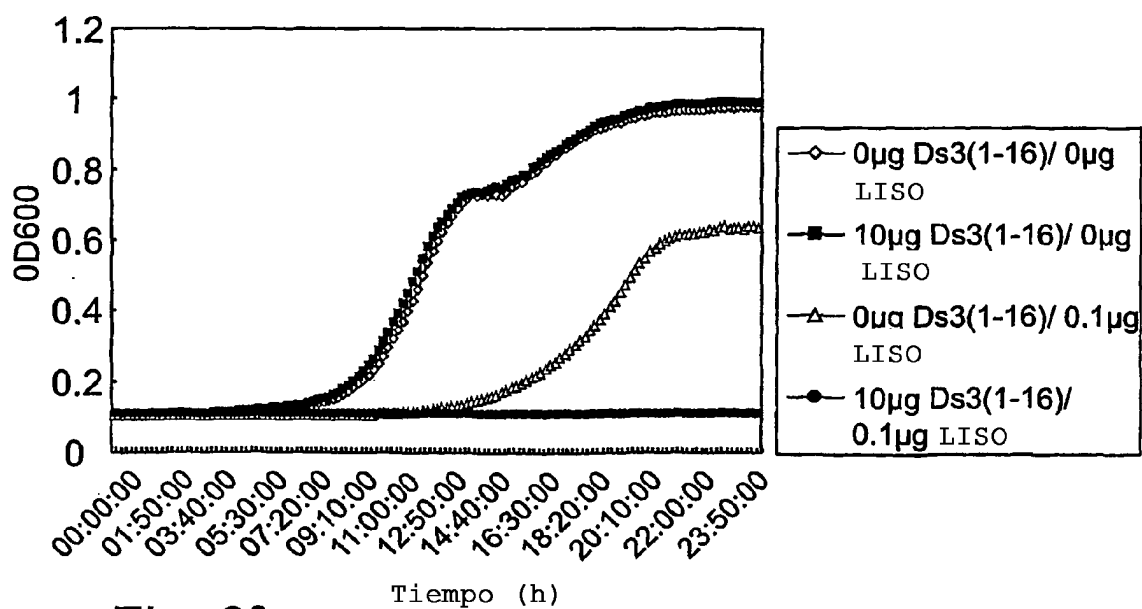


Fig. 6f

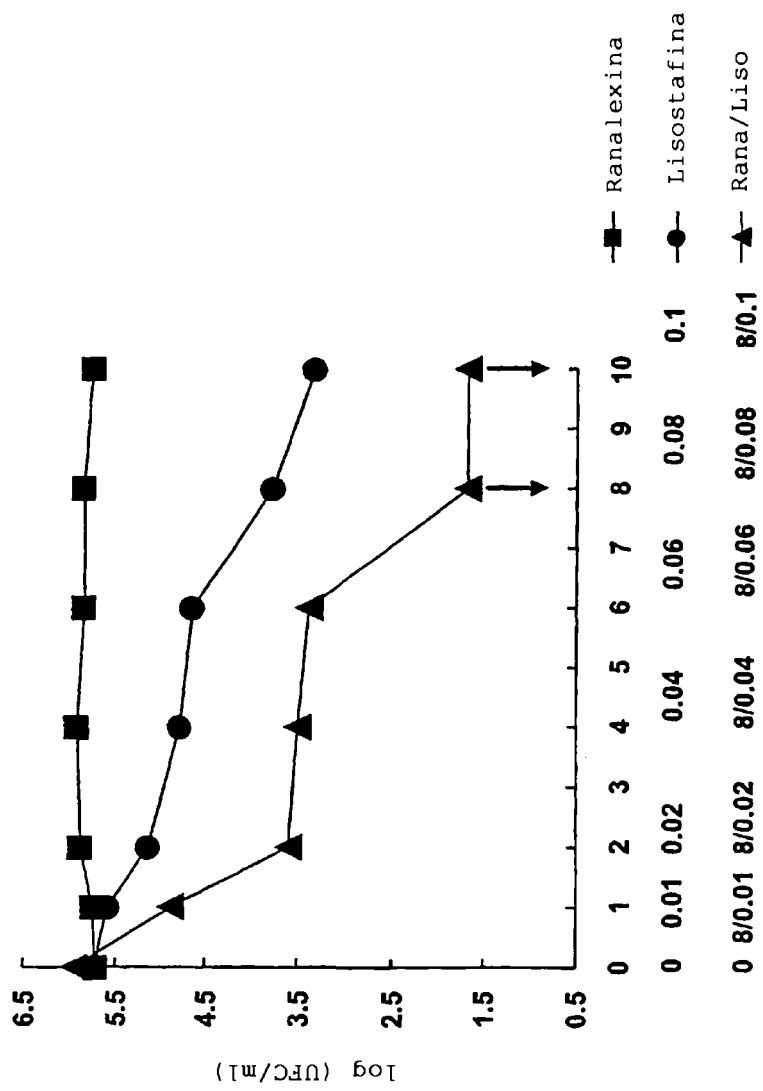


Fig. 7

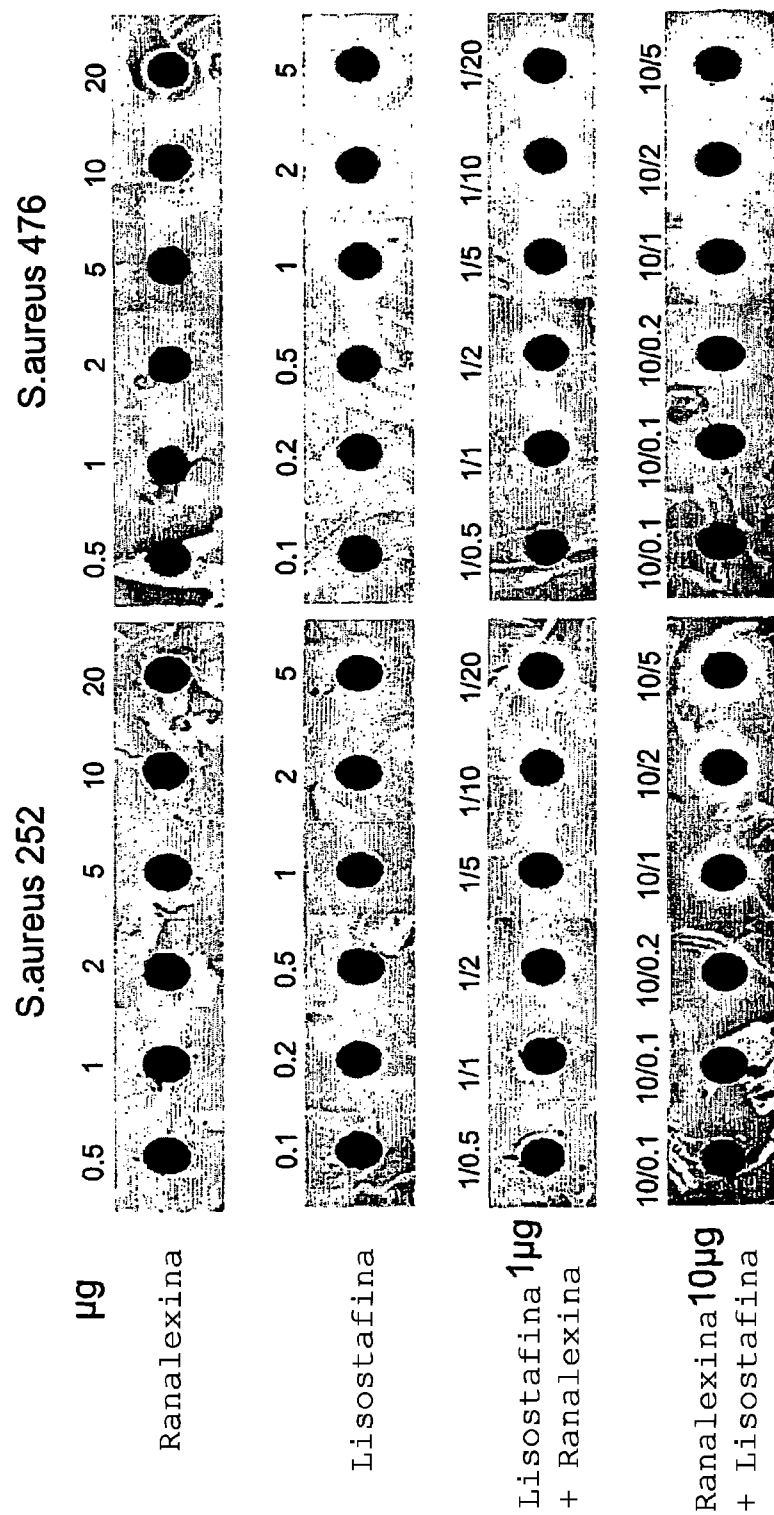


Fig. 8