

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 497 766**

51 Int. Cl.:

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2005** **E 05857259 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 1965779**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de sensibilizar a oxacilina Staphylococcus aureus resistente a meticilina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2014

73 Titular/es:

MITSUI NORIN CO., LTD (50.0%)
Hibiya Central Building, 1-2-9, Nishi-Shinbashi
Minato-ku, Tokyo 105-8427, JP y
THE SCHOOL OF PHARMACY (50.0%)

72 Inventor/es:

STAPLETON, PAUL;
HARA, YUKIHIKO y
TAYLOR, PETER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 497 766 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 y procedimientos de sensibilizar a oxacilina *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina

Campo de la invención

5 El campo de la invención es el de las composiciones de tratamiento antibiótico y procedimientos para su uso en terapia, en particular el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) que incluye combinaciones sinérgicas de catequinas seleccionadas.

Antecedentes de la invención

10 El galato de epigallocatequina (EGCG) y otras catequinas del té se han usado previamente como agentes antibacterianos y ejemplos de dicha actividad son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Jpn. J. Bacteriol. (1991); 46: 839 - 845). Por ejemplo, el documento EP1504754A enseña el uso de galato de galocatequina como potenciador de la actividad antimicrobiana de las catequinas en productos de cuidados alimentarios y orales sin que afecte al sabor. No obstante, para exhibir un efecto antibacteriano significativo, generalmente las dosis son muy altas y, por tanto, normalmente no se alcanzan en condiciones fisiológicas o *in vivo*. Shimamura notificó altas concentraciones similares en el patente de EE.UU. Nº 5.358.713 usando catequinas seleccionadas para prevenir la transmisión del MRSA a otra persona.

15 Para reducir la concentración mínima inhibitoria de determinados fármacos antibióticos, los fármacos antibióticos se combinaron con determinadas catequinas y se ha comunicado que determinadas catequinas son agentes sensibilizantes para amikacina, cloranfenicol y varios antibióticos beta-lactámicos, como ha descrito Shimamura en el documento U.S. 5.807.564. De un modo similar, se ha indicado que los polifenoles rosas reducen la concentración mínima inhibitoria de varios antibióticos beta-lactámicos (véase, por ejemplo, Microbiol Immunol. 2004; 48(1):67 - 73.). También se ha divulgado que el galato de epicatequina (ECG), un constituyente del té verde, reduce marcadamente la CMI de algunos antibióticos frente a algunas cepas de MRSA (Biol. Pharm. Bull. 22(12) 1388 - 1390 (1999)). También se sabe que proporcionan este efecto mediante la inhalación de catequinas (p. ej., J. of Hospital Infection (2003) 53:229 - 231)). El documento EP443090A2 enseña la prevención de la infección con estafilococos resistentes usando polifenoles de té, de modo que se usan las composiciones como formulaciones administradas por vía oral o como desinfectantes de manos. No obstante, y al menos para algunas de las catequinas, las concentraciones eficaces requeridas todavía eran relativamente altas. En otros intentos para tratar las infecciones por MRSA, determinadas catequinas también se combinaron con compuestos de teaflavina específicos como se describe en el documento EP 0 761 226 para producir una composición antimicrobiana. Desgraciadamente, existían las mismas dificultades con respecto a determinadas catequinas. También en otras combinaciones conocidas de catequinas seleccionadas, Morree et al divulgaron en la patente de EE.UU. Nº 6.652.890 una mezcla de EGC y EC que era eficaz en la inhibición de la NADH oxidasa de células neoplásicas que expresan NOX para tratar de este modo el cáncer. No obstante, el efecto de dicha combinación en las bacterias no se indicó en dicha referencia.

35 En intentos adicionales conocidos para usar las catequinas como fármacos antibióticos se modificaron químicamente varias catequinas como describen Stapleton et al en los documentos WO 2005/034976, US5.879.683 y en Int. J. Antimicrobial Agents 23 (2004) 462 - 467. Aunque dichas catequinas modificadas proporcionaron un efecto antibacteriano importante en comparación con sus homólogas no modificadas, la síntesis y la purificación aumentan los costes y la administración a un ser humano todavía no se ha demostrado que sea segura ni eficaz.

40 Por tanto, aunque en la técnica se conocen numerosas composiciones y procedimientos para erradicar y/o sensibilizar al MRSA a varios antibióticos, todos o casi todos sufren una o más desventajas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de mejores agentes farmacéuticos para el tratamiento y/o la quimioprevención de infecciones por MRSA.

Sumario de la invención

45 La presente invención está dirigida al descubrimiento de que algunas catequinas no galoiladas aumentarán la sensibilización del MRSA a determinados antibióticos, en el que el antibiótico seleccionado ya está combinado con una catequina galoilada.

50 En un aspecto de la materia objeto de la invención, un procedimiento de uso en la terapia de reducción de la CMI (concentración mínima inhibitoria) de un fármaco antibiótico en una cepa de *S. aureus* resistente a metilicina incluye una etapa de exponer a *S. aureus* a una catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la CMI del fármaco antibiótico hasta un primer nivel. En una etapa adicional, se reconoce que la aplicación de una catequina no galoilada disminuye sinérgicamente la CMI del fármaco antibiótico desde el primer nivel hasta un segundo nivel, y en otra etapa más, se expone al *S. aureus* a la catequina no galoilada en presencia de la catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la CMI del fármaco antibiótico al segundo nivel.

55 Más preferentemente, el fármaco antibiótico se puede caracterizar como antibiótico beta-lactámico (p. ej., oxacilina, metilicina, penicilina), como antibiótico de tipo tetraciclina (p. ej., tetraciclina, cuatrimicina, epitetraciclina etc.) y/o como fármaco antibiótico de tipo cloranfenicol (p. ej., cloranfenicol, dextramicina, 1-desoxicloranfenicol etc.), la catequina galoilada es ECG o EGCG y/o la catequina no galoilada es EC o EGC. Dependiendo de la combinación concreta, se

contempla que el primer nivel es igual o inferior al 50% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada y/o el segundo nivel es igual o inferior al 5% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada.

- 5 En otros aspectos contemplados, el primer nivel es igual o inferior al 5% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada y el segundo nivel es igual o inferior al 0,5% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada. Por tanto, en al menos algunos ejemplos, se expone a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada a una concentración inferior a 10 microgramos/ml y a la catequina no galoilada a una concentración igual o inferior a 50 microgramos/ml.
- 10 Desde una perspectiva diferente, los inventores también contemplan un procedimiento de uso en terapia de suprimir el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (p. ej., BB568, EMRSA-16 o EMRSA-15), en el que en una etapa se expone a *Staphylococcus aureus* a una combinación de una catequina galoilada y a un fármaco antibiótico, en el que la catequina galoilada y el fármaco antibiótico está presente a una concentración ineficaz para suprimir el crecimiento. En otra etapa, se expone a *Staphylococcus aureus* a una catequina no galoilada en presencia de la combinación a una concentración eficaz para suprimir el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.
- 15 Similar al procedimiento anterior, se prefiere que en dichos procedimientos el fármaco antibiótico es un antibiótico beta-lactámico a una concentración de 60 microgramos/ml y en el que la catequina galoilada es ECG a una concentración de 5 microgramos/ml y/o la catequina no-galoilada (p. ej., EC o ECG) está presente a una concentración de al menos 25 microgramos/ml y, más típicamente, al menos 50 microgramos/ml.
- 20 Por tanto, en otro aspecto de la materia objeto de la invención, una composición de fármaco antibiótico (p. ej., antibiótico beta-lactámico) incluye una catequina galoilada y una catequina no galoilada, en la que la catequina no galoilada está presente a una concentración para reducir sinérgicamente una CMI del fármaco antibiótico con respecto a la catequina galoilada. Las composiciones contempladas incluyen adicionalmente una información asociada con la composición de que la catequina galoilada y la catequina no galoilada están presentes en una combinación sinérgica eficaz para reducir la CMI del fármaco antibiótico con respecto a la catequina galoilada.
- 25 Lo más preferentemente, la catequina galoilada es ECG o EGCG, mientras que la catequina no galoilada es EC o EGC. Normalmente, la catequina no galoilada y la catequina galoilada están presentes en una proporción en peso de al menos 3:1 e incluso más normalmente en una proporción en peso de al menos 6:1. Aunque debe apreciarse que la composición se puede formular de varias formas, particularmente preferidas son las formulaciones tópicas (p. ej., pulverización, crema, pomada etc.).
- 30 Varios objetos, características, aspectos y ventajas de la presente invención serán más evidentes mediante la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que representa los efectos sinérgicos de la combinación de EC y ECG sobre la CMI de la oxacilina para EMRSA-16.

- 35 La Figura 2A es una tabla que resume los efectos de EC, EGC y EGCG sobre la capacidad de ECG para sensibilizar determinadas cepas de *S. aureus* a la oxacilina.

La Figura 2B es una tabla que resume los efectos de EC y EGC sobre la capacidad de ECG para sensibilizar cepas de *S. aureus* a la oxacilina.

Descripción detallada

- 40 Los inventores han descubierto inesperadamente que la sensibilización mediada por catequina de MRSA contra varios fármacos antibióticos usando catequinas galoiladas puede potenciarse adicionalmente combinando la catequina galoilada con una catequina no galoilada y lo más preferentemente, con la correspondiente catequina no galoilada. Extraordinariamente, las catequinas no galoiladas que estimulan la sensibilización a un fármaco antibiótico parecen tener poco o ningún efecto sobre la concentración mínima inhibitoria del fármaco cuando se usan por separado.
- 45 Como se usa en el presente documento, las expresiones "MRSA", "cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina" y "*Staphylococcus aureus* resistente a metilicina" se usan de forma intercambiable en el presente documento y hacen referencia a *S. aureus* que es resistente a numerosos y, más típicamente, a todos los fármacos antibióticos beta-lactámicos. También puede haber resistencia adicional con respecto a las cefalosporinas y/o los carbapenem. Los aislados de MRSA intrahospitalarios a menudo tienen resistencias múltiples a otros agentes antimicrobianos de uso habitual, incluyendo eritromicina, clindamicina y tetraciclina, mientras que los aislados de MRSA asociados con la comunidad a menudo son resistentes únicamente a fármacos antibióticos beta-lactámicos y a eritromicina. La resistencia se confirma siguiendo los protocolos del NCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) y normalmente se refleja en una CMI igual o superior a 4 microgramos/ml en la prueba de la CMI a oxacilina, una difusión en disco igual o inferior a 10 mm o a 19 mm en las pruebas de difusión en disco con oxacilina o la prueba de difusión en disco con cefoxitina, respectivamente. Como también se usan en el presente documento, las expresiones
- 55

“concentración mínima inhibitoria” y “CMI” se usan de forma intercambiable y hacen referencia a la concentración mínima de un fármaco antibacteriano en un medio de cultivo dado por debajo del cual no se inhibe el crecimiento bacteriano.

La expresión “catequina galoilada”, como también se usa en el presente documento, hace referencia a un compuesto en el que el anillo C del compuesto (para la nomenclatura, véase la Fórmula 1, siguiente) se modifica con un radical de ácido benzoico sustituido o no sustituido; y, lo más típicamente, un radical éster de ácido gálico. Lo más típicamente, el radical éster de ácido benzoico sustituido o no sustituido está unido covalentemente al anillo C en la posición 3. Los sustituyentes contemplados sobre dichos ácidos benzoicos sustituidos incluyen uno o más grupos hidroxilo y sus respectivos radicales éster, varios radicales alquileter, grupos amino, grupos nitro, grupos sulfato y/o fosfato, cada uno de los cuales puede estar sustituido adicionalmente.

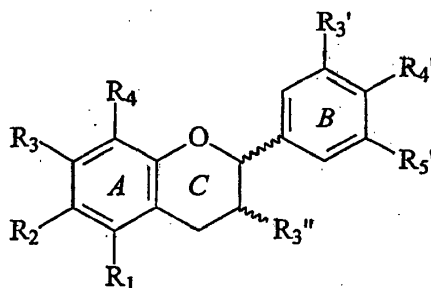
Además, la expresión “catequina no galoilada”, como se usa en el presente documento, hace referencia a un compuesto en el cual el anillo C puede o no estar modificado con un sustituyente, pero en el que dicho sustituyente, cuando está presente en la posición 3 del anillo C, no es un radical éster de ácido gálico. Por tanto, y entre otros numerosos sustituyentes adecuados, la posición 3 del anillo C sobre las catequinas no galoiladas será un hidrógeno o un grupo hidroxilo.

En un aspecto preferido de la materia objeto de la invención, los inventores incubaron una cepa EMRSA-16 de *Staphylococcus aureus* con concentraciones variables de la catequina galoilada galato de epicatequina (ECG) de entre 0 mcg/ml and 12,5 mcg/ml para aumentar la sensibilidad de la cepa frente a la oxacilina. Las CMI se registraron después y los experimentos se repitieron en presencia de la catequina no galoilada epicatequina a concentraciones variables entre 0 mcg/ml y 50 mcg/ml. Extraordinariamente, la adición de la catequina no galoilada redujo la CMI de un modo significativo y sinérgico. Se obtuvieron resultados similares cuando se sustituyó la epicatequina por la epigalocatequina no galoilada. Por el contrario, cuando se usó la galato de epigalocatequina galoilada no se obtuvieron efectos sustancialmente no significativos y sinérgicos.

Aunque sin desear quedar ligado a teoría o hipótesis alguna, los inventores contemplan que las concentraciones nanomolares de catequinas pueden ser capaces de modular la estructura y la función de membranas biológicas a través de su capacidad para repartir en la empalizada de fosfolípidos. Se piensan que las catequinas galoiladas penetran más profundamente en las bicapas de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina que sus análogas no galoiladas. Por tanto, cabe esperar que ECg y EGCg ocupen una localización más profunda en la membrana y que EC y EGC se localicen en un lugar poco profundo (más cerca de la interfaz fosfolípidos-agua). Estas diferencias en la penetración en la membrana igualan la capacidad de estas moléculas para modificar la resistencia de estafilococos a los beta-lactámicos. De forma interesante, las cantidades de ECg y EGCg que se incorporan en las bicapas lipídicas están marcadamente aumentadas en presencia de EC, lo que plantea la posibilidad de que la capacidad de los galatos de catequina reduzcan el nivel de resistencia de los estafilococos a los beta-lactámicos podría potenciarse por acción de las catequinas no galoiladas.

En otros aspectos contemplados de la materia objeto de la invención debe apreciarse que numerosas catequinas galoiladas aparte del galato de epicatequina (ECG) también se consideran adecuadas para su uso en el presente documento. Entre otras catequinas galoiladas se contempla que compuestos adecuados incluyen galato de catequina (CG), galato de galocatequina (GCG), galato de epigalocatequina (EGCG), monogalato de teaflavina A, monogalato de teaflavina B y digalato de teaflavina. Adicionalmente, cabe destacar que las catequinas (galoiladas y no galoiladas) contempladas en el presente documento incluyen isómeros ópticos, centros quirales y/o estereoisómeros y que todas estas formas (y mezclas de las mismas) se contemplan en el presente documento. De un modo similar, las catequinas no galoiladas pueden incluir numerosos compuestos alternativos, incluyendo catequina (C), galocatequina (GC) y epigalocatequina (EGC).

Por tanto, las catequinas galoiladas y no galoiladas preferidas contempladas en el presente documento tendrán una estructura de acuerdo con la fórmula 1.



Formula 1

en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_3' , R_4' , y R_5' son, de forma independiente, H, OH, o M; en la que M es OC(O)R, OC(S)R, OC(NH)R, OR, o R, en la que R es alquilo, alquenilo, alquinilo, alcarilo o arilo opcionalmente sustituido (y, lo más preferentemente, un radical de ácido benzoico mono, di o trihidroxilado); en la que A, B, y C en la estructura denotan los respectivos anillos; y

5 en la que la catequina es una catequina galoilada, R_3'' es un radical éster de ácido gálico; y

en la que la catequina es una catequina no galoilada, R_3'' es M con la condición de que R no sea un radical de ácido gálico en OC(O)R.

10 Con respecto a concentraciones adecuadas de la catequina galoilada, generalmente se contempla que todas las concentraciones se consideran adecuadas siempre que dicha concentración alcance al menos algún nivel de sensibilización (es decir, reduce la CMI e un fármaco antibiótico en comparación con el crecimiento en las mismas condiciones sin catequina galoilada). Además, debe reconocerse que diferentes catequinas galoiladas exhibirán distintas reducciones de la CMI en condiciones comparables. Todavía más, una concentración adecuada de catequinas galoiladas también puede determinarse en parte mediante una concentración predeterminada de catequinas no galoiladas. Por tanto, se contemplan varias concentraciones de catequinas galoiladas (incluyendo EGC) y, 15 generalmente, estarán entre 0 mcg/ml y 50 mg/ml (e incluso superiores), pero, más típicamente, entre 1 mcg/ml y 1 mg/ml, y, lo más típicamente, entre 5 mcg/ml y 100 mcg/ml.

20 De un modo similar, la concentración de las catequinas no galoiladas contempladas variará y dependerá de numerosos factores, incluyendo la estructura química de la catequina no galoilada, la concentración y el tipo de la catequina galoilada, la cepa bacteriana y/o el fármaco antibiótico. No obstante, generalmente se contempla que la concentración de la catequina no galoilada está entre 0 mcg/ml y 50 mg/ml (e incluso superiores), más típicamente, entre 1 mcg/ml y 1 mg/ml, y, lo más típicamente, entre 5 mcg/ml y 100 mcg/ml. Adicionalmente, se prefiere (aunque no necesariamente) que la catequina no galoilada esté presente en al menos cantidades equimolares, más preferentemente en exceso molar de 1,1 - 2,0 a 1, incluso más preferentemente en exceso molar de 2,0 - 4,0 a 1, y, lo más preferentemente, en 25 exceso molar de 2,0 - 10,0 a 1, con respecto a la catequina galoilada.

Además, se prefiere que la catequina no galoilada sea la correspondiente catequina de la catequina galoilada. Por ejemplo, cuando la ECG efectúa la sensibilización hasta un primer nivel, se prefiere que la catequina no galoilada sea EC. En otros ejemplos, cuando la EGCG efectúa la sensibilización hasta un primer nivel, se prefiere que la catequina no galoilada sea EGC. No obstante, debe apreciarse que se puede usar más de una catequina (galoilada y/o no galoilada) 30 en combinaciones contempladas. Por ejemplo, la sensibilización hasta un primer nivel la puede efectuar una mezcla de catequinas que incluye al menos una catequina galoilada y, por consiguiente, la sensibilización a un segundo e inferior nivel la puede efectuar una única catequina no galoilada. Por otro lado y cuando sea deseable, la sensibilización hasta un primer nivel la puede efectuar una única catequina y la sensibilización a un segundo e inferior nivel la puede efectuar una mezcla que incluye al menos una catequina no galoilada.

35 Cuando se usan las mezclas de catequina, es particularmente preferido que la mezcla se aísle de una planta (p. ej., planta de té, uva, arándano azul, etc.). Dichos aislados de catequina se pueden normalizar a una formulación específica en la que se predetermina la proporción entre catequinas galoiladas y no galoiladas. Por ejemplo, un porcentaje típico de catequinas individuales en un extracto de té verde con una proporción dominante de catequina galoilada puede ser 10 - 15 % de EGCg, 2 - 3 % de ECG, 2 % de EC y 2 - 3 % de EGC (p. ej., Suganuma et al., 1999, Can. Res. 59:44 - 47). 40 Por otro lado, los extractos se pueden preparar o modificar para que tengan, predominantemente, catequinas no galoiladas (p. ej., con 10 - 20 % de EGC y EC, 2 - 3 % de ECG, y 5 % de EGCG). Además, también puede haber cafeína, teobromina, teofilina y ácidos fenólicos, tales como ácido gálico, como constituyentes de extractos de té verde; y normalmente están presentes en cantidades menores que los polifenoles. Entre otros extractos contemplados, los extractos de polifenol particularmente adecuados incluyen polifenol E y polifenol B, ambos disponibles comercialmente 45 en Mitsui Norin Japan (1 - 2-9 Nishishinbashi, Minatoku, Tokyo, 105 - 8427, Japón), y que se pueden usar como material base adicional para preparaciones específicas.

Con respecto a los fármacos antibióticos, generalmente se contempla que las catequinas no galoiladas pueden incrementar adicionalmente la sensibilidad (es decir, reducir la CMI) de MRSA sensibilizado previamente a numerosos fármacos antibióticos, incluyendo todos o casi todos los antibióticos beta-lactámicos, tetraciclinas y/o fármacos de tipo cloranfenicol. Por tanto, y entre otros fármacos antibióticos, los antibióticos contemplados incluyen varias penicilinas (p. 50 ej., benzatina, penicilina, bencilpenicilina (penicilina G), fenoximetipenicilina (penicilina V), dicloxacilina, flucloxacilina, amoxicilina, ampicilina etc.), varias cefalosporinas (p. ej., cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefamandol, ceftriaxona, cefotaxima, etc.), varios carbapenem (p. ej., imipenem, meropenem, ertapenem, etc.), monobactámicos (p. ej., aztreonam), varias tetraciclinas (p. ej., tetraciclina, cuatrimicina, epitetraciclina, etc.), y varios fármacos antibióticos 55 de tipo cloranfenicol (p. ej., cloranfenicol, dextramicina, 1-desoxicloranfenicol, etc.).

Dependiendo del tipo de fármaco antibiótico y de la concentración de la catequina galoilada, debe apreciarse que el incremento de la sensibilidad usando la catequina no galoilada puede variar considerablemente. No obstante, generalmente se contempla que el incremento de la sensibilidad (es decir, la reducción de la CMI) es de al menos 2

veces (p. ej., de 20 mcg/ml a 10 mcg/ml), más típicamente al menos 3 veces, incluso más típicamente 4 - 6 veces y, lo más típicamente, al menos 5 - 10 veces (p. ej., de 50 mcg/ml a 10 mcg/ml).

Se contempla además que la exposición del MRSA a la catequina galoilada y/o no galoilada se realiza, preferentemente, aunque no necesariamente, en presencia del fármaco antibiótico. Típicamente (aunque, de nuevo, no necesariamente), la catequina galoilada y no galoilada se administran juntos en el ambiente en el que hay MRSA. Por ejemplo y especialmente cuando la administración se realiza *ex vivo* o una administración tópica (p. ej., pulverizador desinfectante, cultivo *in vitro*, pomada tópica etc.), la combinación de catequinas se puede mezclar con la solución de antibióticos. En otro ejemplo y especialmente cuando la combinación se administra a un mamífero, la combinación de catequina también se puede administrar por vía oral y por separado de la preparación de antibióticos (que puede o no administrarse por vía oral o parenteral).

Por tanto, debe reconocerse que la catequina galoilada y/o no galoilada se puede administrar en numerosas formulaciones y las formulaciones especialmente preferidas incluyen formulaciones orales en forma sólida (p. ej., catequina aislada o polvo de polifenol de extractos de té) o forma líquida (p. ej., preparación de catequina líquida o extracto de té). Formulaciones particularmente preferidas adicionales incluyen formulaciones tópicas (p. ej., como crema pomada, gel, loción etc.). En la técnica se conocen numerosas formulaciones disponibles comercialmente y todas ellas se consideran adecuadas para su uso en el presente documento. La concentración de la catequina galoilada y/o no galoilada en dichas formulaciones normalmente será tal que la aplicación en una única unidad de dosis tendrá como resultado una concentración local inferior a 1 mg/ml.

En base a estas y otras consideraciones, los inventores contemplan un procedimiento para usar en terapia de reducción de la CMI de un fármaco antibiótico en MRSA en el que el *Staphylococcus aureus* se expone a una catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la CMI del fármaco antibiótico hasta un primer nivel. En otra etapa, se reconoce (p. ej., mediante información escrita o visualizada) que la aplicación de una catequina no galoilada disminuye sinérgicamente la CMI del fármaco antibiótico desde el primer nivel hasta un segundo nivel, y en otra etapa más, se expone al *S. aureus* a la catequina no galoilada en presencia de la catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la CMI del fármaco antibiótico al segundo nivel. Por ejemplo, en una aplicación típica, primeros niveles adecuados son iguales o inferiores al 50% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada y segundos niveles adecuados son iguales o inferiores al 5% de la CMI del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada. En estos ejemplos, los inventores han descubierto que se había expuesto el MRSA a la catequina galoilada a una concentración inferior a 10 microgramos/ml y a la catequina no galoilada a una concentración igual o inferior a 50 microgramos/ml. En otros ejemplos, los inventores hallaron que el primer nivel era igual o inferior al 5% de la CMI y que el segundo nivel era igual o inferior al 0,5% de la CMI.

Por tanto, procedimientos adecuados para usar en terapia también incluyen procedimientos de suprimir el crecimiento de MRSA en el que el MRSA se expone a una combinación de una catequina galoilada y un fármaco antibiótico, en el que la catequina galoilada y el fármaco antibiótico están presentes a una concentración (p. ej., ECG a una concentración de 5 microgramos/ml y antibiótico beta-lactámico a una concentración de 60 microgramos/ml) ineficaz para suprimir el crecimiento. En otra etapa, el MRSA se expone después a una catequina no galoilada (p. ej., EC o EGC a una concentración de al menos 25 mcg/ml, y, más típicamente, al menos 50 mcg/ml) en presencia de la combinación a una concentración eficaz para suprimir el crecimiento del MRSA. Dichos procedimientos son particularmente deseables para convertir un MRSA (p. ej., BB568, BMRSA-16, y EMRSA-15) de un carácter resistente o intermedio (con respecto a un fármaco antibiótico concreto) a un carácter sensible.

En otros aspectos contemplados adicionales, de este modo se contemplan composiciones farmacológicas que incluyen una catequina galoilada (p. ej., ECG o EGCG), una catequina no galoilada (EC o EGC) y, opcionalmente, un fármaco antibiótico (p. ej., un antibiótico beta-lactámico), en el que la catequina no galoilada está presente a una concentración para reducir sinérgicamente una concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico con respecto a la catequina galoilada. Dichas composiciones normalmente se asocian adicionalmente con una información de que la catequina galoilada y la catequina no galoilada están presentes en una combinación sinérgica que reduce la CMI del fármaco antibiótico con respecto a la catequina galoilada. Entre otras proporciones adecuadas, la catequina no galoilada y la catequina galoilada están presentes en una proporción en peso de al menos 1:1, más normalmente de al menos 3:1 e incluso más típicamente al menos 6:1. Como ya se ha tratado anteriormente, debe reconocerse que la composición se puede formular de numerosas formas, incluyendo formulaciones orales y tópicas. No obstante, es particularmente preferido que la formulación sea una formulación tópica.

Experimentos

Unión potenciada de ECG a las membranas mediada por EC

Dado que las membranas de *S. aureus* están compuestas exclusivamente por fosfatidilglicerol (63 - 74 %), lisilfosfatidilglicerol (17 - 22 %), y cardiolipina (5 - 15 %), los inventores determinaron la capacidad de las catequinas no galoiladas para potenciar la unión de ECG a *S. aureus* usando el ensayo de HPLC descrito por Kajiya et al (Kajiya, K., S. Kumazawa, y T. Nakayama. 2001. Steric effects on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2638 - 2643). Tokyo Food Techno Co. Ltd., Tokyo, Japón, proporcionó EC, EGC, ECG y EGCG. *S. aureus* BB568 es un productor constitutivo de PBP2a (proporcionado por B. Berger-Bachi, University of

Zürich) y EMRSA-15 and EMRSA-16 eran aislados clínicos procedentes del Royal Free Hospital, Londres. EC potenció la unión de ECG a células semilogarítmicas de EMRSA-16 a concentraciones de 25 mcg/ml. El 13% del conjunto de EC unido tras 20 minutos de incubación a 35°C y el 22% de ECG se asoció con las células. En presencia de EC, la unión de ECG se elevó hasta el 41%. La unión de EC también se potenció por la presencia de ECG (35,5 %). Por tanto, parece que EC facilita la unión de ECG a las células de estafilococos, así como a liposomas de PC y PE.

Prueba de sensibilización con *S. aureus*

Para investigar si esta unión cooperadora potenciaba la actividad biológica, se determinó la capacidad de EC y EGC para aumentar el grado de sensibilización de *S. aureus* a la oxacilina. Se realizaron ensayos de CMI de Checkerboard en placas de microtitulación e 96 pocillos con un inóculo de 10^4 UFC en 200 µl de caldo de Mueller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 2% de NaCl. Los valores de CMI se obtuvieron tras incubación a 35 °C durante 24 horas. Se usó la cepa de *S. aureus* ATCC29213 como la cepa susceptible patrón. Los índices de la concentración inhibitoria fraccional (FIC) para combinaciones triples se calcularon del siguiente modo. $\Sigma FIC = FIC_{OXA} + FIC_B + FIC_C = [C^{comb}_{OXA}/CMI_{OXA}] + [C^{comb}_B/CMI_B] + [C^{comb}_C/CMI_C]$, en las que C^{comb}_B y C^{comb}_C son las concentraciones de las catequinas analizadas. C^{comb}_{OXA} es la concentración más baja de oxacilina en la combinación que inhibió el crecimiento y CMI_{OXA} , CMI_B y CMI_C son las CMI de los compuestos cuando se usan solos. Para las combinaciones de dos compuestos se omitió el término (C^{comb}_C/CMI_C) . Un índice FIC $\leq 0,5$ indica sinergia.

Los inventores determinaron el efecto de EC, EGC and EGCG sobre la capacidad de ECG para sensibilizar EMRSA-16, EMRSA-15 y BB568 a oxacilina y los resultados de estos experimentos se enumeran en la Figura 2A. Las CMI de la oxacilina para BB568, EMRSA-16 y EMRSA-15 fueron 256.512 y 16 mg/ml, respectivamente. Los compuestos de catequina tenían poca o ninguna actividad antiestafilocócica intrínseca, con CMI variables de 64 - 512 mg/ml. Una concentración de ECG de 12,5 mg/ml redujo la CMI de oxacilina para *S. aureus* BB568 y EMRSA-16 a un valor inferior al valor crítico de sensibilidad; se consiguió un efecto similar para EMRSA-15 con la menor concentración de 3,12 mg/ml. Extraordinariamente, las catequinas no galoiladas EC y EGC no pudieron reducir la CMI de la oxacilina contra estos aislados. No obstante, estos compuestos potenciaron marcadamente la capacidad de ECG para reducir la resistencia a oxacilina. Una concentración de 3,12 mg/ml de ECG redujo las CMI a 64 y 128 mg/ml para BB568 y EMRSA-16, respectivamente. En combinación con 6,25 mg/ml de EC, la sensibilidad a oxacilina aumentó a 8 mg/ml para estos aislados; el incremento de la concentración de EC a 25 mg/ml produjo valores de 2 mg/ml en presencia de 3,12 mg/ml de ECG. Se observaron reducciones similares cuando se usó EGC en combinación con ECG. Los índices FIC indicaron una fuerte sinergia entre oxacilina, ECG y EC o EGC contra los tres aislados de *S. aureus*. A concentraciones altas, una combinación de ECG ($\geq 12,5$ mg/ml) con EC y EGC (≥ 50 mg/ml) inhibió el crecimiento de EMRSA-16 en ausencia de oxacilina.

La potenciación por EC y EGC de la sensibilización mediada por ECG a la oxacilina era, claramente, dependiente de la concentración, como se ilustra en la **Figura 1** (que representa el efecto de ECG y EC sobre las CMI de la oxacilina para EMRSA-16). La catequina galoilada EGCG fue significativamente menos eficaz en la reducción de la CMI para oxacilina en presencia de ECG. Por ejemplo, con 3,12 mg/ml de ECG, 25 mg/ml de EGCG redujeron la CMI únicamente por dos. A la concentración de ECG más alta de 12,5 mg/ml, la EGCG comprometió la capacidad de ECG para reducir las CMI para las cepas BB568 y EMRSA-16. La EGCG también pudo sensibilizar BB568, EMRSA-16 y EMRSA-15 a la oxacilina (véase la **Figura 2B**) pero el efecto fue mucho menos pronunciado que el asociado con ECG. Tanto EC como EGC pudieron potenciar la sensibilización (como se muestra en la Figura 2B), pero el efecto fue correspondientemente menor en comparación con las combinaciones [EC/EGC - ECG - oxacilina], como se muestra en la Figura 2A.

Por tanto, los inventores contemplan que la capacidad de catequinas no galoiladas, tales como EC y EGC, potencian la susceptibilidad a la oxacilina de las cepas de MRSA mediante las catequinas de galoilo ECG y EGC apuntando a la membrana citoplásmica de estafilococos. Dicha hipótesis se confirmaría por la unión de ECG a la membrana incrementada en presencia de EC o EGC si hubiera una relación causal entre la unión a la membrana y la sensibilidad. Como soporte adicional de dicha hipótesis se encuentra el hecho de que las catequinas generalmente no entran en las células, lo que hace más probable que puedan modular la resistencia a los beta-lactámicos en *S. aureus* mediante la alteración de las propiedades biofísicas de la membrana (p. ej., comprometiendo la función de las proteínas asociadas con la bicapa y, por tanto, afectando al transporte de los materiales a través de la membrana).

Los datos anteriores demuestran claramente el carácter significativo y sinérgico de la interacción entre las catequinas galoiladas y no galoiladas en presencia de un antibiótico con respecto a su efecto antimicrobiano. Dicho hallazgo es particularmente sorprendente, ya que en estudios previos se ha sugerido que el grupo galato es esencial para la actividad del galato de epicatequina (Stapleton, P. D., S. Shah, J. C. Anderson, Y. Hara, J. M. T. Hamilton-Miller, and P. W. Taylor. 2004. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. International J. Antimicrob. Agents 23:462 - 467). Adicionalmente, es improbable que las catequinas no galoiladas actúen como inhibidor de la esterasa, ya que estos compuestos carecen de un grupo éster). Además, los derivados estables a esterasa de la ECG tienen actividades similares cuando se usan en combinación con oxacilina contra *S. aureus*, lo que sugiere que la actividad esterasa no es un factor crucial *in vitro* (Anderson, J. C., C. Headley, P. D. Stapleton, and P. W. Taylor. 2005. Synthesis and antibacterial activity of a hydrolytically stable (-)-epicatechin gallate analogue for the modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 15:2633 - 2635). No obstante, cabe destacar que no se pueden destacar otras formas de inactivación, y, en particular, la modificación del resto de catequina, en el que EC y ECG podrían actuar como posibles inhibidores.

- Por tanto, se han divulgado realizaciones y aplicaciones específicas de composiciones y procedimientos para usar en la terapia de sensibilizar el MRSA a la oxacilina. No obstante, debería ser evidente para los expertos en la técnica que son posibles muchas más modificaciones además de las ya descritas sin desviarse de los conceptos de la invención en el presente documento. Por tanto, la materia objeto de la invención no debe quedar restringida excepto en el espíritu de las reivindicaciones adjuntas. Además, al interpretar la memoria descriptiva y las reivindicaciones, todos los términos se interpretarán del modo más amplio posible coherente con el contexto. En particular, los términos “comprende” y “que comprende” se interpretarán como que hacen referencia a elementos, componentes o etapas de un modo no exclusivo, que indica que los elementos, componentes o etapas a los que se ha hecho referencia pueden estar presentes, o usarse, o combinarse con otros elementos, componentes o etapas a los que no se ha hecho referencia expresa.
- Además, cuando una definición o uso de un término en una referencia que se incorpora por referencia en el presente documento es inconsistente o contrario a la definición de dicho término proporcionada en el presente documento, se aplica la definición de dicho término proporcionada en el presente documento y no se aplica la definición de dicho término en la referencia.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una catequina galoilada, una catequina no galoilada y un fármaco antibiótico en la fabricación de un medicamento para reducir la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico en una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina seleccionada del grupo que consiste en BB568, EMRSA-15, y EMRSA-16, que comprende:
 - una etapa de proporcionar una catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico hasta un primer nivel, en el que la catequina galoilada es ECG o EGCG y en el que el fármaco antibiótico es oxacilina;
 - en una etapa adicional, añadir una catequina no galoilada seleccionada del grupo que consiste en EC y EGC a una concentración eficaz para disminuir adicional y sinérgicamente la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico desde el primer nivel hasta un segundo nivel.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la catequina galoilada es ECG y en el que la catequina no galoilada es EC y/o EGC, respectivamente.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que el primer nivel es igual o inferior al 50% y en el que el segundo nivel es igual o inferior al 5% de la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico sin exponer *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que el primer nivel es igual o inferior al 5% de la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada y en el que el segundo nivel es igual o inferior al 0,5% de la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico sin exponer a *Staphylococcus aureus* a la catequina galoilada.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que la catequina galoilada está presente a una concentración inferior a 10 microgramos/ml y la catequina no galoilada presente a una concentración igual o inferior a 50 microgramos/ml.
6. Uso de una combinación de una catequina galoilada, una catequina no galoilada y un fármaco antibiótico en la fabricación de un medicamento para suprimir el crecimiento de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina seleccionada del grupo que consiste en BB568, EMRSA-15, y EMRSA-16, que comprende:
 - una etapa de combinar la catequina galoilada y el fármaco antibiótico, en la que la catequina galoilada y el fármaco antibiótico están presentes a una concentración ineficaz para suprimir el crecimiento y en la que la catequina galoilada es ECG o EGCG y en el que el fármaco antibiótico es oxacilina; y
 - en una etapa adicional, añadir a la combinación una catequina no galoilada seleccionada del grupo que consiste en EC y EGC a una concentración eficaz para suprimir adicionalmente el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el fármaco antibiótico está a una concentración de 60 microgramos/ml y en el que la catequina galoilada es ECG a una concentración de 5 microgramos/ml.
8. El uso de la reivindicación 7, en el que la catequina no galoilada es EC o EGC a una concentración de al menos 25 microgramos/ml o de al menos 50 microgramos/ml.
9. El uso de la reivindicación 6, en el que el *Staphylococcus aureus* esta seleccionado del grupo que consiste en EMRSA-16 y EMRSA-15.
10. Una combinación triple de una catequina no galoilada, una catequina galoilada y un fármaco antibiótico para su uso sinérgico en un procedimiento de reducción de una concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico en una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina seleccionada del grupo que consiste en BB568 y EMRSA-15 y EMRSA-16, en el que:
 - en una etapa, el *Staphylococcus aureus* se expone a la catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico hasta un primer nivel; y
 - en otra etapa, el *Staphylococcus aureus* está expuesto a la catequina no galoilada en presencia de la catequina galoilada a una concentración eficaz para reducir adicionalmente sinérgicamente la concentración mínima inhibitoria del fármaco antibiótico hasta un segundo y menor nivel;
 y en el que
 - el fármaco antibiótico comprende oxacilina;
 - la catequina galoilada comprende ECG o EGCG;
 - la catequina no galoilada comprende EC o EGC; y
 - un índice de concentración inhibitoria fraccional de la combinación triple es inferior o igual a 0,5.
11. La combinación triple de la reivindicación 10, en la que la catequina galoilada es ECG y en la que la catequina no galoilada es EC.

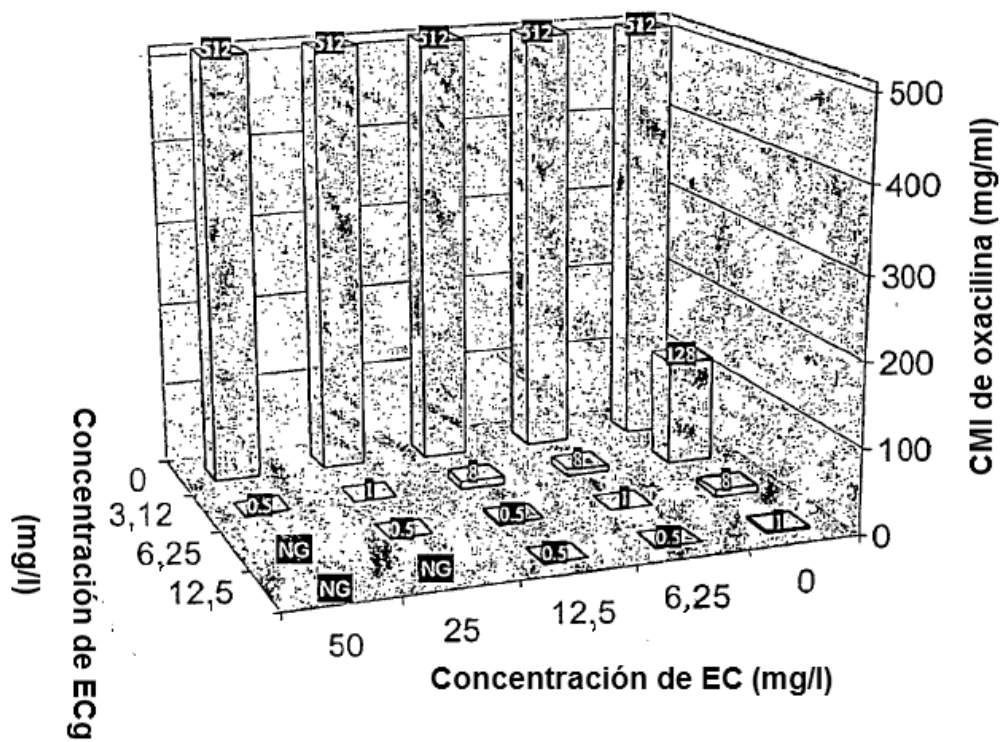


Figura 1

Compuesto ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. aureus</i> BB568					<i>S. aureus</i> EMRSA-16					<i>S. aureus</i> EMRSA-15				
	CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$)					CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$)					CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$)				
	determinada en presencia de ECg ($\mu\text{g/ml}$)					determinada en presencia de ECg ($\mu\text{g/ml}$)					determinada en presencia de ECg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	3,12	6,25	12,5	25	0	3,12	6,25	12,5	25	0	3,12	6,25	12,5	25
BC	256	64	8	1	0,5	512	128	8	1	0,5	16	1	0,5	0,25	0,25
	256 ^c	8	1	0,5	0,5	512	8	1	0,5	0,5	16	0,5	0,25	0,25	0,25
	256	4	0,5	0,5	0,5	512	8	0,5	0,5	0,5	16	0,5	0,25	0,25	0,25
	256	2	0,5	0,5	0,5	512	1	0,5	NG ^b	NG ^b	16	0,5	0,25	0,12	0,12
	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	512	0,5	NG ^b	NG ^b	NG ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
EGC	256	32	1	0,5	0,5	512	32	1	0,5	0,5	16	0,5	0,25	0,25	0,25
	256	8	1	0,5	0,5	512	16	1	0,5	0,5	16	0,5	0,25	0,12	0,12
	128	4	0,5	0,5	0,5	512	8	0,5	NG ^b	NG ^b	8	0,25	0,12	0,12	0,12
	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	512	2	NG ^b	NG ^b	NG ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
EGCg	128	32	16	8	8	256	128	32	16	16	4	1	1	0,5	0,5
	64	32	32	8	8	128	128	32	32	32	1	1	1	1	1
	32	16	16	8	8	64	32	8	4	4	1	1	1	1	0,5

Figura 2A

Compuesto ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. aureus</i> BB568					<i>S. aureus</i> EMRSA-16					<i>S. aureus</i> EMRSA-15				
	CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$) determinada en presencia de					CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$) determinada en presencia de					CMI de oxacilina ($\mu\text{g/ml}$) determinada en presencia de				
	EGCg ($\mu\text{g/ml}$)					EGCg ($\mu\text{g/ml}$)					EGCg ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	6,25	12,5	25		0	6,25	12,5	25		0	6,25	12,5	25	
EC	256	128	64	32		512	256	128	64		8	4	1	1	
	256	64	64	16		512 ^a	256	256	128		16	4	2	0,5	
	256	64	32	16		512	256	256	128		16	4	2	0,5	
	256	64	32	8		512	256	256	128		16	2	1	0,5	
EGC	256	64	32	16		512	256	128	64		16	2	1	0,50	
	256	64	32	8		512	128	64	16		16	2	0,5	0,25	
	128	32	16	1		512	64	8	2		8	2	0,5	0,125	

Figura 2B