

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 030 207**

21 Número de solicitud: 202430806

51 Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)
A61K 31/133 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

08.10.2024

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.06.2025

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.06.2025

Fecha de concesión:

09.10.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

16.10.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(100.00%)
Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**CASALS CARRO, M^a Cristina;
DE TAPIA HERNÁNDEZ, Lidia Consuelo;
GARCÍA-FOJEDA GARCÍA-VALDECASAS, M^a
Belén y
CASTILLA ÁLVAREZ, Irina**

54 Título: **COMBINACIÓN QUE COMPRENDE POLIMIXINA B Y ESFINGOSINA**

57 Resumen:

Combinación que comprende polimixina B y esfingosina.
La presente invención se refiere a una combinación que comprende polimixina B (PMB) y esfingosina (Sph) para el tratamiento de infecciones bacterianas y, especialmente, de infecciones respiratorias causadas por microorganismos Gram negativos. El efecto sinérgico de esta combinación permite que se utilicen cantidades de ambos compuestos inferiores a las que se utilizarían si se administrara cada compuesto en solitario, así como el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes a los antimicrobianos.
La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una combinación de PMB y Sph para su administración por vía inhalatoria y/o intranasal.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 3 030 207 B2

DESCRIPCIÓN

Combinación que comprende polimixina B y esfingosina

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de la Biomedicina, en concreto en lo relacionado con combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas pulmonares causadas por bacterias multirresistentes a antibióticos.

10

Antecedentes de la invención

Las infecciones bacterianas constituyen una amenaza cada vez mayor para la salud mundial debido, sobre todo, a dos factores: en primer lugar, al aumento de la resistencia bacteriana a los tratamientos actuales, en segundo lugar, a la falta de desarrollo de nuevos antibióticos. Como consecuencia de esto, existe un número creciente de complicaciones sanitarias intratables y de muertes en todo el mundo (alrededor de 700.000 muertes por año, actualmente) cifra que se estima que alcanzará los 10 millones en el año 2050. Así pues, urge identificar nuevas estrategias antibacterianas para tratar eficazmente las enfermedades causadas por microorganismos multirresistentes.

20

En este contexto, las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas son un desafío importante, ya que este tipo de bacterias poseen un amplio espectro de factores de virulencia (factores de adhesión o invasión, endotoxinas y exotoxinas) y tienen una gran capacidad para adquirir resistencia a los antibióticos y, también, a factores del sistema inmunitario.

25

La reutilización y modificación de antibióticos conocidos, su combinación con otros péptidos o lípidos antimicrobianos o con proteínas antimicrobianas naturales pueden contribuir al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y en este sentido se han realizado diversos ensayos, como los ejemplos que se citan a continuación.

30

En Chan, BCL, *et al.* (2014) *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67: 107-116, se describe la identificación de dos principios activos de *Portulaca oleracea* L. que proporcionan sinergia con antibióticos contra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina y sus mecanismos de inhibición de la resistencia. En concreto, se refieren a dos ácidos grasos combinados con eritromicina.

35

Coya, JM, *et al.* (2022. *Frontiers in Immunology*, 13:927017) han descrito un estudio sobre la proteína SP-A humana utilizada en combinación con antibióticos frente a bacterias patógenas Gram-negativas. En este trabajo, describen la formación de agregados SP-A/polimixina B que tienen actividad bactericida sinérgica.

40

Los lípidos antimicrobianos constituyen una parte integral de los mecanismos de defensa del hospedador y se está estudiando su inclusión en nanotransportadores como alternativa para combatir las enfermedades infecciosas (Zhang, Q., *et al.* 2020. *Journal of drug targeting*, 28(3):271-281).

45

De manera semejante, los péptidos antimicrobianos funcionan como moléculas para la defensa del hospedador y se han descrito combinaciones de estas moléculas, o derivados suyos, con otras para actuar frente a las bacterias multirresistentes. Es el caso descrito en Rajasekaran G, *et al.* 2017. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1859:722-33, donde se describe una sinergia antimicrobiana al combinar derivados de péptidos antimicrobianos con cloranfenicol frente a

50

Staphylococcus aureus resistente a meticilina y frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.

5 WO2022105948A2 describe composiciones que incluyen péptidos sintéticos frente a microorganismos patógenos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos, multirresistentes a los antibióticos convencionales, combinando dichos péptidos sintéticos con un segundo péptido sintético o con un antibiótico β -lactámico.

10 También se dan combinaciones de varios antibióticos. Un ejemplo lo vemos en WO2024073443A1 donde se describe una nueva combinación de rifaximina y claritromicina para el tratamiento de enfermedades bacterianas, incluyendo enfermedades causadas por micobacterias patógenas.

15 Encontramos otro ejemplo en el documento WO2021130269A1 que se refiere a una combinación de un polímero catiónico y un antibiótico para el tratamiento de enfermedades bacterianas provocadas por Gram-negativas y, especialmente, de enfermedades provocadas por bacterias multirresistentes a los antibióticos.

20 Explicación de la invención

Combinación que comprende polimixina B y esfingosina

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a una combinación que incluye polimixina B (PMB) y esfingosina (Sph) para el tratamiento de infecciones bacterianas. Debido al efecto sinérgico de ambos compuestos, la cantidad de PMB que se incluye en esta combinación es menor que la cantidad que se consideraría suficiente para tratar la infección solo con PMB, es decir, la combinación contiene una cantidad de PMB que se consideraría subóptima si se utilizara sola. Por otro lado, la cantidad de Sph utilizada en dicha combinación también se consideraría subóptima si se utilizara sola. De hecho, la concentración más utilizada en los estudios *in vivo* es 30 de 10 – 60 $\mu\text{g/ratón}$ de PMB (pudiendo llegar a 3.6 mg/ratón) y de 10 - 100 $\mu\text{g/ratón}$, partiendo de una concentración de 125 μM de Sph, frente a las concentraciones utilizadas como ejemplos en esta solicitud (0.02 $\mu\text{g/ratón}$ de PMB y 0.03 $\mu\text{g/ratón}$ de Sph, a una concentración de 2 μM).

35 Esta combinación está especialmente indicada para el tratamiento de infecciones respiratorias como pueden ser: bronquitis aguda o neumonía, preferentemente causadas por bacterias Gram negativas y más aún las causadas por Gram negativas multirresistentes a antimicrobianos, como pueden ser las pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* o *Haemophilus*. La combinación que comprende PMB y Sph se utiliza principalmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias causadas por bacterias Gram negativas 40 pertenecientes a la especie *Klebsiella pneumoniae*.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la combinación de PMB y Sph descrita en los párrafos anteriores, junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Por otro lado, la composición se puede administrar de forma 45 simultánea o secuencial y se utiliza preferentemente para su administración por vía inhalatoria o intranasal. Preferentemente, la relación entre la cantidad de Sph y de PMB administradas es 1,5:1,0 en peso.

50 La combinación de PMB y Sph presenta un claro efecto sinérgico frente a bacterias Gram-negativas y la eficacia de esta combinación permite disminuir la dosis de ambos antimicrobianos (PMB y Sph) y con ello sus posibles efectos adversos. Los ejemplos *in vitro* que se muestran en esta memoria descriptiva, especialmente los ensayos de viabilidad y crecimiento bacterianos, demuestran un efecto antimicrobiano sinérgico de la mezcla PMB/Sph con una pérdida

significativa de la actividad metabólica, así como una disminución del crecimiento bacteriano en bacterias tratadas con la combinación de PMB/Sph, pero no con cada factor antimicrobiano por separado. En esta memoria descriptiva también se presentan datos que muestran un aumento significativo de la permeabilidad de las membranas bacterianas de *K. pneumoniae* con el tratamiento combinado PMB/Sph con respecto al inducido por PMB y que la Sph individualmente no afecta a la permeabilidad de membrana de *K. pneumoniae*.

In vivo, también hemos demostrado la eficacia del tratamiento con la combinación PMB/Sph en un modelo murino de infección respiratoria. La co-instilación del patógeno junto con la combinación PMB/Sph ha demostrado una reducción significativa de la carga bacteriana pulmonar a las 24h en comparación con ratones infectados no tratados o ratones infectados tratados con PMB o Sph por separado. Esta combinación promueve el reclutamiento eficaz de neutrófilos encargados de eliminar los patógenos, y promueve la respuesta inmune. La actividad antibacteriana de PMB/Sph en ratones infectados estuvo acompañada de un mayor reclutamiento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar a las 24 h promovido por la Sph, lo que supone una mayor defensa del huésped. Sin embargo, los ratones infectados no tratados o tratados sólo con PMB no muestran reclutamiento de neutrófilos ni cambios en los niveles de citoquinas proinflamatorias.

El tratamiento con PMB/Sph tiene un alto valor terapéutico puesto que reduce significativamente la carga bacteriana tras la infección, confiere una protección significativa frente a la infección por bacterias Gram negativas y reduce la cantidad de PMB necesaria para el tratamiento de la infección, cuestión importante debido a los graves efectos secundarios que puede suponer el tratamiento con este antibiótico.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Interacción molecular entre Sph/PMB.

Figura 2. Efecto de PMB y/o Sph sobre la permeabilidad de la membrana de *K. pneumoniae*.

Figura 3. Actividad antimicrobiana de PMB, Sph y su combinación PMB/Sph frente a *K. pneumoniae*.

Figura 4. Efecto de Sph y/o PMB sobre la ultraestructura y morfología de *K. pneumoniae* en tratamientos de 3h a 37°C.

Figura 5. Efecto del tratamiento con PMB, Sph, y la combinación PMB/Sph sobre la carga bacteriana en ratones infectados con *K. pneumoniae*.

Figura 6. Efecto del tratamiento con PMB, Sph, y la combinación PMB/Sph sobre el reclutamiento de neutrófilos en ratones infectados.

Figura 7. Efecto del tratamiento con PMB, Sph, y la combinación PMB/Sph sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en pulmón.

Figura 8. Evaluación de la citotoxicidad del tratamiento con PMB, Sph o ambas en ratones co-institados con *K. pneumoniae*, mediante ensayo TUNEL (micrografías (10X) de secciones pulmonares).

- 5 **Figura 9.** Evaluación del efecto terapéutico del tratamiento con PMB/Sph tras 24h en ratones con una infección establecida con *K. pneumoniae*.

Realización preferente de la invención

- 10 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Materiales utilizados

- 15 Se utilizó polimixina B (PMB) obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU). El stock se resuspendió en agua miliQ a una concentración de 2 mg/ml y las alícuotas se guardaron a -20°C. La D-esfingosina (Sph) se adquirió de Sigma-Aldrich y el stock se disolvió en etanol a una concentración de 0.4 mM. Posteriormente se evaporó bajo un flujo suave de nitrógeno y la película seca se hidrató en Tris 5mM, NaCl 150 mM en agitación continua 1h a 38°C, la solución
20 obtenida se sonicó durante 8 min a 390 W/cm² (pulsos de 0,6s, con 0,4s entre pulsos). Como esfingosina fluorescente se utilizó NBD-Sph de Sigma-Aldrich y el stock se resuspendió a una concentración de 210 µM en etanol. La esfingosina marcada con NBD se preparó mezclando D-sph con NBD-sph en una proporción molecular de 40:1 y se preparó como lo descrito anteriormente para la D-esfingosina. También se empleó una sonda fluorescente Sytox Green de Molecular Probes (Eugene, OR, EE. UU.). El reactivo de proliferación celular WST-1 se obtuvo de Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). El compuesto Tissue-Tek O.C.T. se obtuvo de Sakura Finetek (EE. UU). El kit de tinción H&E se obtuvo de Abcam (Cambridge, UK). El resto de los reactivos se obtuvieron de Sigma- Aldrich.

30 Ejemplo 2. Cepa bacteriana: medios y condiciones de crecimiento

- En los siguientes ejemplos se utilizó la cepa de *Klebsiella pneumoniae* 52145 (serotipo K2:O1) procedente de aislados clínicos y ya utilizada en estudios anteriores, que en adelante denominaremos *K. pneumoniae* K2. Su cultivo se realizó en medio Luria - Bertani (LB) a 37°C
35 con agitación continua hasta alcanzar la fase exponencial. A continuación, las bacterias en fase exponencial se precipitaron por centrifugación a 500g durante 10 minutos, se resuspendieron en PBS y se ajustaron a la concentración final deseada.

Ejemplo 3. Mediciones de fluorescencia *in vitro*

- 40 Para evaluar la unión de PMB a Sph, se usó la fluorescencia NBD de NBD-Sph para determinar la constante de disociación aparente (KD) de PMB/Sph a 25°C. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 5x5mm utilizando un espectrofluorímetro SLM-Aminco AB-2 equipado con un soporte de cubeta termostatizado ($\pm 0,1^\circ\text{C}$; Spectronic, Waltham, MA, EE. UU.). Los anchos de las rendijas fueron de 4 nm para los haces de excitación y emisión.
45 El espectro de emisión de fluorescencia NBD de Sph se registró de 500 a 600 nm con una longitud de onda de excitación de 467nm a 25°C en tampón Tris-HCl 5mM (pH 7,4). Posteriormente, se inició el experimento de titulación añadiendo cantidades crecientes de PMB a la solución Sph en la cubeta. Las lecturas de intensidad de fluorescencia se corrigieron según la dilución provocada por la adición de PMB. El cambio en la fluorescencia de Sph a la longitud de onda máxima de emisión de fluorescencia se monitoreó en función de la concentración de PMB, y los datos de titulación se analizaron mediante mínimos cuadrados no lineales ajustados a la ecuación de Hill:
50

$$\Delta F / \Delta F_{max} = \frac{[L]^{nH}}{([L]^{nH} + K_D)}$$

donde ΔF es el cambio en la intensidad de la fluorescencia a 539 nm con respecto a la intensidad de Sph libre; ΔF_{max} es el cambio en la intensidad de la fluorescencia en concentraciones saturadas de PMB; K_D es la constante de disociación de equilibrio aparente; $[L]$ es la concentración molar de PMB libre; y nH es el coeficiente de Hill.

Ejemplo 4. Permeabilización de membrana

La capacidad de PMB, Sph y la combinación de ambas para permeabilizar las membranas bacterianas (externa y citoplasmática) se estudió en bacterias vivas cuantificando la internalización de la sonda impermeable Sytox Green, la cual es fluorescente al unirse al ADN una vez que la membrana bacteriana ha sido permeabilizada. La sonda Sytox Green (1 μ M) se añadió a 1 ml de suspensión bacteriana (2×10^7 CFU/ml) en PBS y la muestra se incubó durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de la suspensión bacteriana-Sytox Green a una placa de 96 pocillos y fondo oscuro MicroWell™ FluoroNunc™ (NUNC®) y se monitorizó durante 20 minutos la fluorescencia con excitación a 485 nm y emisión a 520 nm en un lector de microplacas FLUOstar Galaxy (BMG Lab Technologies, Alemania) para establecer la línea base de fluorescencia. A continuación, se añadieron 100 μ l de los tratamientos PMB (2 μ g/ml, 1.4 μ M), Sph (3 μ g/ml, 10 μ M) y la combinación de ambas, y la variación de la fluorescencia de la mezcla se monitorizó durante 4 horas a 25°C. Se utilizó PBS como control negativo y bacterias no marcadas como fluorescencia de fondo.

Ejemplo 5. Actividad metabólica bacteriana por WST-1

La suspensión bacteriana en fase exponencial se diluyó en medio LB y se ajustó a una concentración de 10^7 CFU/ml. La suspensión microbiana (100 μ l) se añadió a cada pocillo (placa de cultivo TPP de 96 pocillos) y se trató con PMB (0.1 μ g/ml, 72 nM), Sph (3 μ g/ml, 10 μ M) y su combinación. Posteriormente, se añadió a cada pocillo el reactivo WST-1 (10 μ l), que consta de un mediador electrónico y sal de tetrazolio, y se incubó a 37°C. La escisión de la sal de tetrazolio en formazán por parte de las bacterias metabólicamente activas, se midió como absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (lector de placas RT-6100, Rayto Life and Analytical Sciences, Shenzhen, China) a diferentes tiempos de incubación.

Ejemplo 6. Ensayo de viabilidad por crecimiento bacteriano

El ensayo de viabilidad basado en el crecimiento bacteriano permite determinar la cantidad relativa de bacterias viables mediante el estudio de las variaciones en las curvas de crecimiento. Las bacterias en fase exponencial se diluyeron en medio LB a una concentración de 10^6 CFU/ml y se añadieron 200 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos. Posteriormente las bacterias se trataron con PMB (0.1 μ g/ml, 72 nM), Sph (3 μ g/ml, 10 μ M) y su combinación, utilizando como control bacterias sin tratar. La placa se incubó a 37°C y se midió la absorbancia a 630 nm, utilizando un lector de placas (RT-6100 plate reader, Rayto Life and Analytical Sciences, Shenzhen, China), a los tiempos de incubación indicados.

Ejemplo 7. Microscopia electrónica de transmisión

El efecto de PMB, Sph y su combinación sobre la morfología y ultraestructura de *K. pneumoniae* 52145 se visualizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Las bacterias *K. pneumoniae* en fase de crecimiento logarítmico (2×10^8 CFU/ml) se trataron con PMB (2 μ g/ml, 1.4 μ M), Sph (3 μ g/ml, 10 μ M) y la combinación de ambas a 37°C durante 30 minutos en tampón

PBS. Las células se centrifugaron y se eliminó el tampón PBS. A continuación, los *pellets* de bacterias se fijaron químicamente con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% durante 4 h a 4°C y se lavaron tres veces con PBS. Las bacterias se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante 1 h. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con agua bidestilada y se deshidrataron mediante la exposición secuencial a concentraciones crecientes de acetona, que oscilaban entre el 30% y el 100%, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizó la infiltración e incrustación con resina de Spurr. Las muestras se seccionaron utilizando un ultramicrotomo con una cuchilla de diamante y se montaron en rejillas de cobre. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico JEOL JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japón). Los cortes y la toma de imágenes se realizaron en el Centro de Apoyo de Investigación (CAI) e Instalación Científico Tecnológica Singular (ICTS) Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Ejemplo 8. Animales, modelo murino de infección y tratamiento con antimicrobianos

Ratones machos WT FVB/N de entre cinco y seis semanas se adquirieron de Charles River Laboratories (Barcelona, España). Todos los ratones se alojaron en instalaciones libres de patógenos en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), UCM. En primer lugar, se estableció 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* K2 como la dosis óptima para causar inflamación pulmonar con mínima mortalidad en ratones WT FVB/N. Para evaluar la acción *in vivo* de PMB, Sph y la combinación de ambas, a los ratones previamente sedados se les co-administró por vía intranasal la suspensión de *K. pneumoniae* K2 y los distintos tratamientos. Las dosis de PMB y Sph fueron de 0,02 µg/ratón (0.74 µg PMB/Kg) y 0,03 µg/ratón (1.1 µg Sph/Kg), respectivamente. Los ratones fueron sacrificados a las 6 y 24 horas posteriores a la infección, los pulmones se recolectaron para la realización de estudios de carga bacteriana, inflamación y citotoxicidad. Los grupos de animales de estudio fueron: (i) Control; ii) Infectado no tratado; iii) Infectado tratado con PMB; iv) Infectado tratado con Sph; y v) Infectado tratado con la combinación PMB/Sph. Cada grupo experimental de 6h incluyó 5-6 ratones y para los ensayos de 24h se incluyeron 6-13 ratones.

Para el análisis de efecto terapéutico de la combinación PMB/Sph, los animales se infectaron con 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* K2 y 24 horas más tarde se trataron con la combinación PMB/Sph. Los ratones fueron sacrificados a las 48 horas después de la infección y los pulmones se recolectaron para determinar de carga bacteriana.

Ejemplo 9. Ensayo de muerte bacteriana *in vivo*

El pulmón izquierdo de cada ratón de cada grupo de animales descritos en el Ejemplo 8 se homogeneizó en 1 ml de PBS. Las diluciones de los homogenizados se sembraron en placas de LB-agar y posteriormente tras 16h de incubación a 37°C se determinó el número de CFUs mediante la técnica de recuento de colonias en placa. Cada grupo experimental incluyó 5-6 ratones y los datos se expresaron como CFUs/ratón $\pm$ error estándar.

Ejemplo 10. Recuento de células inmunitarias en lavado broncoalveolar

El pulmón derecho de los ratones controles e infectados (sin tratar y tratados con PMB y/o Sph) se lavó cuatro veces con alícuotas de 300 µl de PBS estéril. Una alícuota de 15 µl fue teñida con un volumen igual de 0,4% azul tripán (Life Technologies) para el recuento total de células en un hemocitómetro. El lavado broncoalveolar (BAL) restante se centrifugó a 300 g durante 5 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Thermo Fisher) y se incubó 8 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 9 ml de PBS estéril a cada uno de los tubos, las muestras se centrifugaron a 300 g 5 min a 4°C, y el *pellet* de cada uno de los tubos se resuspendió en 300 µl de PBS estéril. El

recuento celular diferencial se realizó sembrando una alícuota de 100 µl de la suspensión celular en portaobjetos SuperFrost (Thermo Scientific) y su posterior tinción Giemsa. La toma de imágenes se realizó en el Centro de Apoyo de Investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid utilizando el microscopio AxioPlan-2, Zeiss.

Ejemplo 11. Evaluación de los niveles de citoquinas en homogenizado de pulmón

Tras los experimentos de 6 y de 24 horas de la inoculación bacteriana y administración o no de antimicrobianos, se evaluaron los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α y MIP-2) en homogenizados de pulmón mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Ejemplo 12. Evaluación de la citotoxicidad (mediante ensayo TUNEL)

Se colocaron, en portaobjetos SuperFrost (Thermo Scientific), secciones de tejido pulmonar de 10 µm, se fijaron 15 min con PFA al 4% a 37°C y se realizaron dos lavados de 5 min con PBS estéril. Para evaluar la citotoxicidad se utilizó un kit TUNEL de detección *in situ* de apoptosis (Thermo Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. El control positivo se obtuvo incubando una sección de tejido con DNAsa durante 30 min a temperatura ambiente. Los cortes se incluyeron en ProLong Diamond con DAPI (Thermo Fisher Scientific) y se tomaron micrografías con un microscopio confocal Olympus FV1200 Olympus.

Ejemplo 13. Análisis estadístico

Los datos que se muestran en este trabajo se representan como medias ± error estándar. Las diferencias entre las medias de distintos grupos se evaluaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Bonferroni. Para comparar dos grupos, se utilizó la prueba t de Student. Se consideró significativo un nivel $\alpha \leq 5\%$ ($p \leq 0.05$).

Ejemplo 14. Efectos cooperativos de PMB y Sph *in vitro*

Interacción molecular

Para evaluar la posible interacción molecular entre PMB y Sph se registraron los cambios en la fluorescencia de la NBD-esfingosina a la longitud de onda de máxima de emisión de fluorescencia (539 nm) en presencia de concentraciones crecientes de PMB. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de NBD-Sph (20 µM) en presencia de concentraciones crecientes de PMB a 25°C en tampón Tris-HCl 5 mM, pH 7.4. Las muestras de Sph (en presencia y ausencia de PMB) y las muestras en blanco (PMB) se excitaron a 467 nm y se registraron los espectros de emisión de 500 a 600 nm. La Figura 1 muestra los valores del incremento de fluorescencia del NBD-Sph en presencia de concentraciones crecientes de PMB. Los resultados se expresan como el incremento corregido de intensidad de fluorescencia (ΔF) a la longitud de onda de máxima emisión. Los resultados son medias ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

Se puede observar que no hay cambios significativos tras la titulación de NBD-esfingosina con concentraciones crecientes de PMB, lo que significa que no hay interacción. Por lo tanto, el mecanismo de acción de ambas tendría lugar de forma independiente y no formando un complejo o agregado molecular.

Permeabilidad de la membrana

Se estudió el efecto de PMB y Sph, tanto juntas como por separado, sobre la permeabilidad de las membranas de *K. pneumoniae in vitro*. Para ello, se realizaron ensayos de incorporación de la sonda fluorescente impermeable Sytox Green que aumenta su fluorescencia cuando se une al DNA bacteriano una vez que la membrana bacteriana ha sido comprometida. Las bacterias se incubaron con PMB (2 µg/ml, 1.4 µM) en presencia y ausencia de Sph (3 µg/ml, 10 µM). Se registró el cambio en la fluorescencia de Sytox Green (1µM) a 520 nm en función del tiempo (min). Los resultados que se muestran en la Figura 2 son la media ± error estándar (n=3, cada uno de los experimentos se han realizado por triplicado). Los resultados se evaluaron mediante el análisis ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Bonferroni. ***p < 0,001 cuando se compararon las bacterias tratadas con PMB+Sph con respecto a las bacterias tratadas con PMB sola.

La Figura 2 muestra que la adición de Sph por sí sola, a la dosis utilizada, no afectó a la fluorescencia del Sytox Green, por lo que Sph a la concentración de 10 µM (3 µg/ml) no afecta a la permeabilidad de las membranas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, la PMB aumentó significativamente la fluorescencia de la sonda, lo que concuerda con la capacidad de la PMB de permeabilizar las membranas de bacterias Gram-negativas. Por otro lado, las bacterias tratadas con la mezcla PMB/Sph mostraron una permeabilización de Sytox Green significativamente mayor que las tratadas sólo con PMB, lo que indica una actividad microbiciada sinérgica de Sph/PMB.

Capacidad antimicrobiana

Con el objetivo de determinar la capacidad antimicrobiana de la mezcla PMB/Sph se realizaron ensayos de viabilidad por WST-1 así como de crecimiento bacteriano por densidad óptica (Figura 3). Como en el experimento anterior, se eligieron concentraciones subóptimas de PMB y Sph que por sí solas no presentaban un efecto antimicrobiano sobre *K. pneumoniae* K2. Las bacterias se incubaron con PMB (0.1 µg/ml, 72 nM) en presencia y ausencia de Sph (3 µg/ml, 10 µM) en medio L B a 37°C.

La Figura 3A muestra la viabilidad celular (viabilidad relativa expresada como %) basada en la actividad metabólica de las bacterias capaces de reducir las sales de tetrazolio a formazán. Los cambios en la absorbancia a 450nm en presencia de WST-1 se registraron en función del tiempo (3h) y los resultados se muestran como el porcentaje de supervivencia relativa con respecto a las bacterias sin tratar. La cantidad de formazán obtenida está relacionada con el número de bacterias metabólicamente activas. En este caso el complejo PMB/Sph actúa disminuyendo drásticamente, de manera significativa, el número de bacterias metabólicamente activas a las 3h con relación al efecto producido por cada factor por separado durante el mismo periodo de tiempo (h). Los resultados indican que la mezcla PMB/Sph actúa de forma sinérgica, provocando una disminución significativa de la viabilidad bacteriana.

En cuanto a la densidad óptica, la Figura 3 B muestra que la combinación de PMB/Sph presenta absorbancias menores que los tratamientos de PMB y Sph por separado, lo que se traduce en que las bacterias se encuentran muertas o metabólicamente inactivas. La densidad óptica medida a 630 nm se monitorizó durante 24 h. Los datos son medias ± error estándar de cuatro (A) o tres (B) experimentos independientes, cada uno por triplicado. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. **p < 0,01 y ***p < 0,001 cuando se comparan las bacterias tratadas con PMB con las tratadas con PMB/Sph y ### p < 0,001 cuando se comparan las bacterias tratadas con Sph con las tratadas con PMB/Sph.

Se analizó también el efecto de PMB, Sph y de la mezcla PMB/Sph en la ultraestructura y morfología de las bacterias mediante microscopía electrónica de transmisión. Las bacterias *K. pneumoniae* no tratadas mostraron una morfología y ultraestructura intactas (Figuras 4A, 4E y 4I), al igual que las tratadas con Sph (3 µg/ml, 10 µM) (Figuras 4B, 4 F y 4J) que tampoco presentan cambios morfológicos visibles, mientras que la adición de PMB (2 µg/ml, 1.4 µM) (Figuras 4C, 4 G y 4K) o de PMB/Sph (mismas cantidades) (Figuras 4D, 4H y 4L) produjo cambios morfológicos significativos con respecto a las bacterias no tratadas o tratadas sólo con Sph.

En ambos casos (bacterias tratadas con PMB y con PMB/Sph) se observó la presencia del efecto "blebbing", es decir, protuberancias que aparecen en la membrana externa de la célula bacteriana tras el tratamiento. En caso del complejo PMB/Sph (Figuras 4D, 4H y 4L) se puede observar que el efecto "bebbing" es mayor que cuando se utiliza PMB (Figuras 4C, 4 G y 4K) y también es mayor la proporción de células que han sufrido la liberación del contenido citoplasmático. Esto se puede deducir de la pérdida de contraste en el interior celular y la falta de distinción entre las membranas externa e interna.

Ejemplo 15. Efectos cooperativos de PMB y Sph *in vivo*

Efecto del tratamiento con PMB y Sph sobre la viabilidad de *K.pneumoniae*

Se realizó la coadministración intranasal de 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* K2 en ausencia y presencia de PMB (0,02 µg/ratón, 0.74 µg PMB/Kg), Sph (0,03 µg/ratón, 1.1 µg Sph/Kg) o la combinación PMB/Sph, en las mismas cantidades, en ratones WT FVB/N. Se evaluó la carga bacteriana a las 6 y 24 horas posteriores a la infección (Figuras 5A y 5B, respectivamente): los animales se sacrificaron y el pulmón izquierdo de cada ratón se homogeneizó para evaluar la carga bacteriana. La cantidad de bacterias viables se cuantificó mediante recuento de colonias en placa y los resultados se expresaron como CFUs/ratón ($n=5$ ratones por grupo para 6 h de infección, y $n=13$ ratones por grupo para 24 h de infección). Los resultados se expresan como las medias $\pm$ error estándar. Para el análisis estadístico se realizó el ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni *** $p < 0,001$ frente al grupo infectado no tratado.

Como se muestra en la Figura 5A, tras 6 h, la carga bacteriana de los ratones tratados solo con PMB o Sph no mostró una disminución en comparación con los ratones sin tratar. La mezcla de PMB/Sph logró reducir un 26% del número de CFUs con respecto al grupo de ratones infectados no tratados, aunque no de manera estadísticamente significativa. Sin embargo, a las 24h posteriores a la infección (Figura 5B), el tratamiento de la combinación PMB/Sph disminuyó significativamente la carga bacteriana (76%; $p < 0,001$) con respecto al grupo infectado no tratado. En contraste, el tratamiento con cada factor antimicrobiano por separado a las dosis utilizadas (Figura 5B) no redujo la carga bacteriana a las 24h post-infección. Estos resultados confirman *in vivo* efecto antimicrobiano sinérgico de la combinación PMB/Sph en un modelo murino de infección respiratoria por *K. pneumoniae*.

Efecto del tratamiento con PMB y/o Sph en la respuesta inflamatoria en ratones infectados

Se coinstilaron ratones WT FVB/N con 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* K2 o con suero en el caso del grupo control sin infectar (Sin inf.) en presencia y ausencia de PMB (0,02 µg/ratón, 0.74 µg PMB/Kg), Sph (0,03 µg/ratón, 1.1 µg Sph/Kg) o la combinación de ambas. Se sacrificaron los ratones a las 6h y 24h posteriores a la coinstilación y se evaluó el recuento total de neutrófilos en el BAL. El análisis de los tipos de células en el BAL de ratones infectados tratados con PMB/Sph reveló que las células reclutadas consistían predominantemente en neutrófilos. El reclutamiento de neutrófilos fue significativamente mayor en los ratones infectados tratados con Sph y PMB/Sph a las 24h en comparación con los ratones infectados tratados con PMB y los ratones infectados no tratados (Figura 6). Sin embargo, a las 6h mostraron una mayor presencia

de neutrófilos en pulmón los ratones que habían sido infectados y tratados sólo con Sph en comparación con el resto de tratamientos o ratones infectados no tratados. Por lo tanto, la Sph está implicada en aumentar el reclutamiento de neutrófilos para defensa del huésped. Los resultados se expresaron como el % de neutrófilos con respecto al total de células $\pm$ error estándar de un total de ratones (para el grupo de las 6h) o de 13 ratones (para el grupo de las 24h). Para el análisis estadístico se realizó el ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ en comparación con el grupo de ratones infectados y no tratados.

El reclutamiento de neutrófilos en BAL se correlacionó con niveles elevados de TNF- α , IL-1 β y MIP-2 en pulmón (Figura 7). En las Figuras 7A, 7 B y 7 C se observa un incremento de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β y MIP-2) en pulmón de ratones infectados tratados con Sph a las 6h posteriores a la co-instilación, siendo este incremento transitorio, y a que los niveles disminuyeron a las 24h posteriores a la infección y tratamiento. A los ratones W T FVB/N se les instiló PBS (control) o 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* en presencia y ausencia de PMB (0,02 μ g/ratón, 0.74 μ g PMB/Kg), Sph (0,03 μ g/ratón, 1.1 μ g Sph/Kg) o la combinación de ambos factores. Los pulmones se recogieron a las 6 y 24h posteriores a la infección. Se evaluó la concentración de TNF- α (Figura 7A), IL-1 β (Figura 7B) y MIP-2 (Figura 7C) en homogenizados de pulmón mediante ELISA ($n = 5$ ratones para el grupo de las 6h, $n = 7$ para el grupo de las 24h). Los resultados obtenidos indican que la Sph está implicada en aumentar la defensa inmune innata del huésped de forma controlada, ya que los niveles de citoquinas proinflamatorias bajan a las 24h. La combinación de PMB/Sph mantiene cierto nivel de inflamación a las 24h con aumento significativo de TNF- α (Figura 7A) pero no de IL-1 β y MIP-2 (Figuras 7 B y 7C). Los ratones infectados con *K. pneumoniae*, no tratados con antimicrobianos (o sólo tratados con PMB) tienen un nivel bajo de inflamación, lo que es consistente con el hecho de que uno de los mecanismos de defensa de *K. pneumoniae* es subvertir la respuesta inflamatoria del huésped para su propio beneficio. Para el análisis estadístico se realizó el ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$.

Determinación de la citotoxicidad de los tratamientos con PMB, Sph y PMB/Sph en el tejido pulmonar.

Con el fin de determinar el potencial efecto citotóxico de los distintos tratamientos en el tejido pulmonar, se realizó un ensayo TUNEL, que permite visualizar los núcleos de células apoptóticas. Se tiñeron secciones de 10 μ m de pulmones de ratones infectados/no tratados e infectados/tratados con PMB (0,02 μ g/ratón, 0.74 μ g PMB/Kg), Sph (0,03 μ g/ratón, 1.1 μ g Sph/Kg) y PMB/Sph (0,02 μ g/0,03 μ g). Previamente habíamos determinado que no hay diferencias en el ensayo TUNEL entre ratones control no infectados y aquellos infectados con 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* durante 24h. En la Figura 8, en azul, se observan los núcleos de las células viables (DAPI). En rojo, los núcleos de las células apoptóticas. Como se ve en la figura 8, las imágenes no mostraron un aumento de células en apoptosis en los cortes de pulmones entre ratones infectados con *K. pneumoniae* y ratones infectados y tratados con PMB, Sph o la combinación PMB/Sph a las 24h.

Efecto terapéutico del tratamiento con PMB/Sph en ratones con una infección establecida

Para evaluar el potencial terapéutico del tratamiento con PMB/Sph, primero se infectaron ratones WT FVB/N con *K. pneumoniae* K2 y, 24h después del inicio de la infección, los ratones se trataron con la combinación PMB/Sph durante 24 horas más, lo que simularía una infección real donde los pacientes son tratados cuando la infección respiratoria y a está establecida. En concreto, los ratones fueron instilados con 10^4 CFUs de *K. pneumoniae* K2. Tras 24 h, los ratones infectados fueron tratados con la combinación PMB (0,02 μ g/ratón, 0.74 μ g PMB/Kg) y Sph (0,03 μ g/ratón, 1.1 μ g Sph/Kg) y se sacrificaron a las 48h posteriores a la infección para evaluar la carga bacteriana pulmonar. La Figura 9 muestra que se produce una reducción drástica de la carga

- 5 bacteriana en los pulmones de los ratones tratados con PMB/Sph en comparación con el grupo control de ratones infectados no tratados (Sin tto). La cantidad de bacterias viables se analizó mediante el recuento de colonias en placa y los resultados se expresaron como número de CFU/ratón. Los resultados son medias $\pm$ error estándar (n=6 ratones para cada grupo). Para el análisis estadístico se realizó el ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni *** $p < 0,001$ cuando se comparó con el grupo no tratado.

REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende polimixina B (PMB) y esfingosina (Sph) para su uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.
- 5 2. Combinación según la reivindicación 1 en la que la PMB está presente en una cantidad que se consideraría subóptima si se utilizara sola.
3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la que la Sph está presente en una cantidad que se consideraría subóptima si se utilizara sola.
- 10 4. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que las infecciones son infecciones respiratorias.
- 15 5. Combinación según la reivindicación 4 en la que las infecciones respiratorias pertenecen al grupo formado por: neumonía y bronquitis aguda.
6. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que las infecciones están causadas por bacterias Gram negativas.
- 20 7. Combinación según la reivindicación 6 en la que las bacterias Gram negativas son multirresistentes a antimicrobianos.
8. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 en la que las bacterias Gram negativas pertenecen a los géneros *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* o *Haemophilus*.
- 25 9. Combinación según la reivindicación 8 en la que las bacterias Gram negativas pertenecen a la especie *Klebsiella pneumoniae*.
- 30 10. Composición farmacéutica que comprende una combinación como la definida en cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10 donde dicha composición se administra de forma simultánea o secuencial.
- 35 12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10-11 para su administración por vía inhalatoria y/o intranasal.
- 40 13. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10-12 en la que la relación entre la cantidad de Sph y de PMB administradas es 1,5/1,0 en peso.

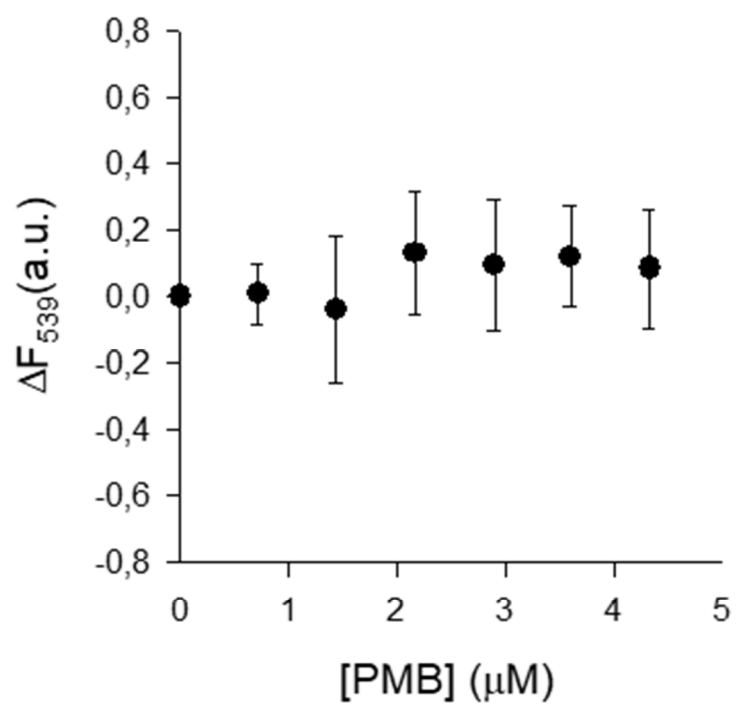


Fig. 1

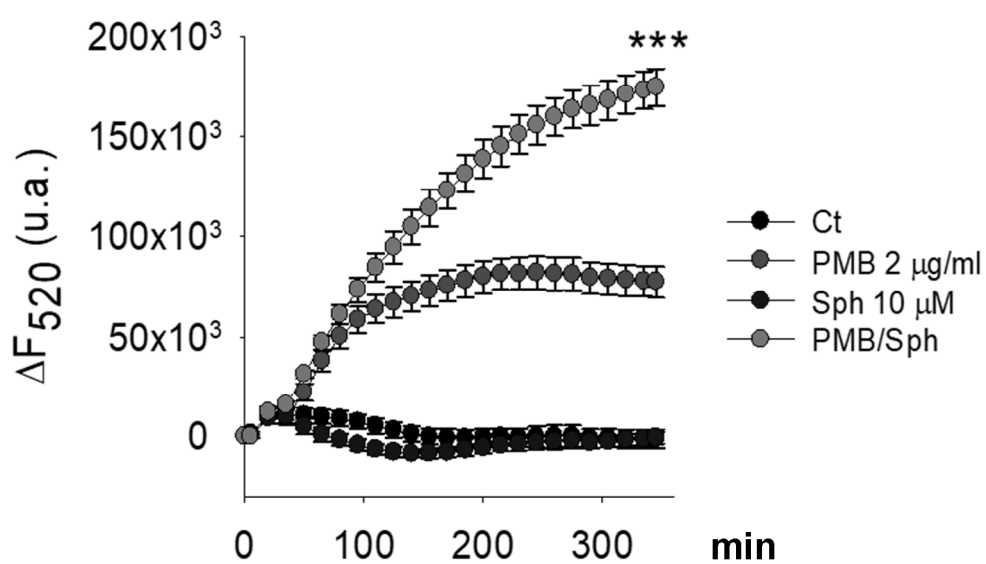


Fig. 2

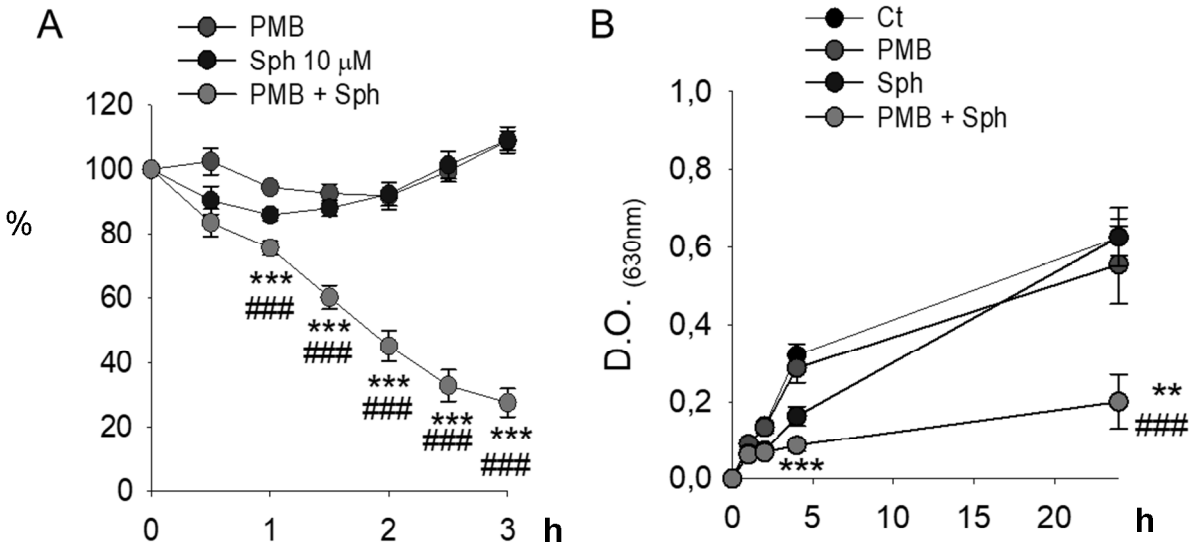


Fig.3

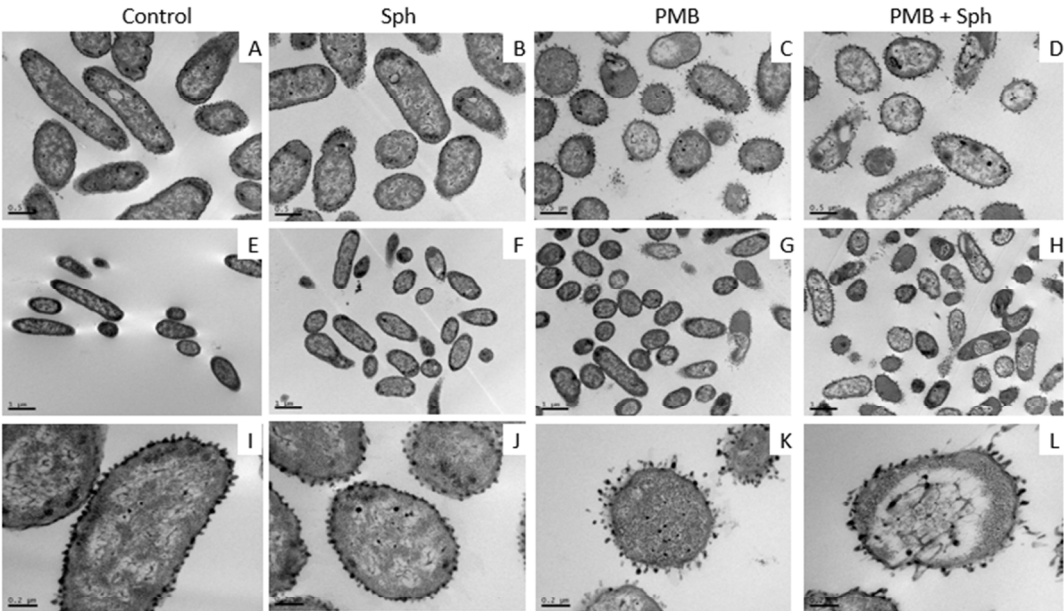


Fig. 4

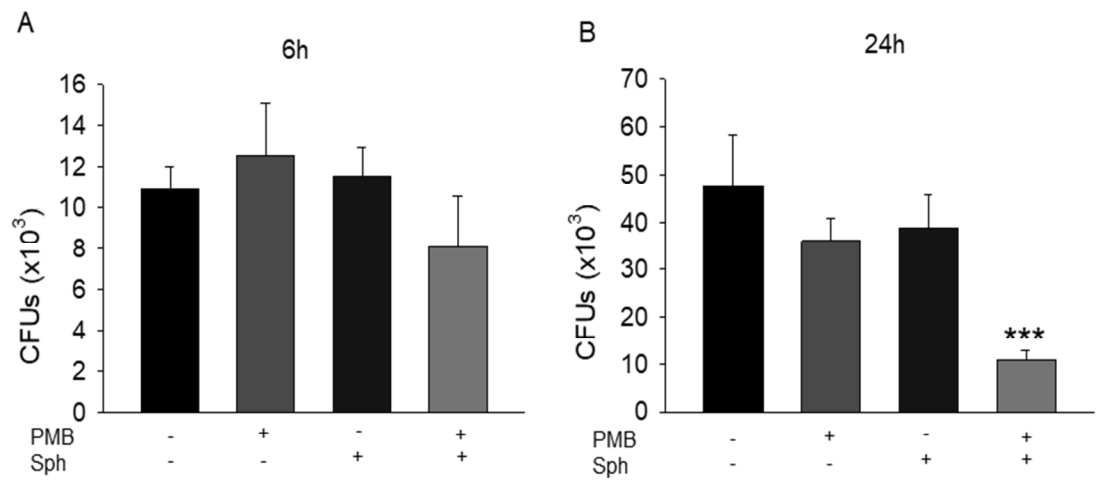


Fig. 5

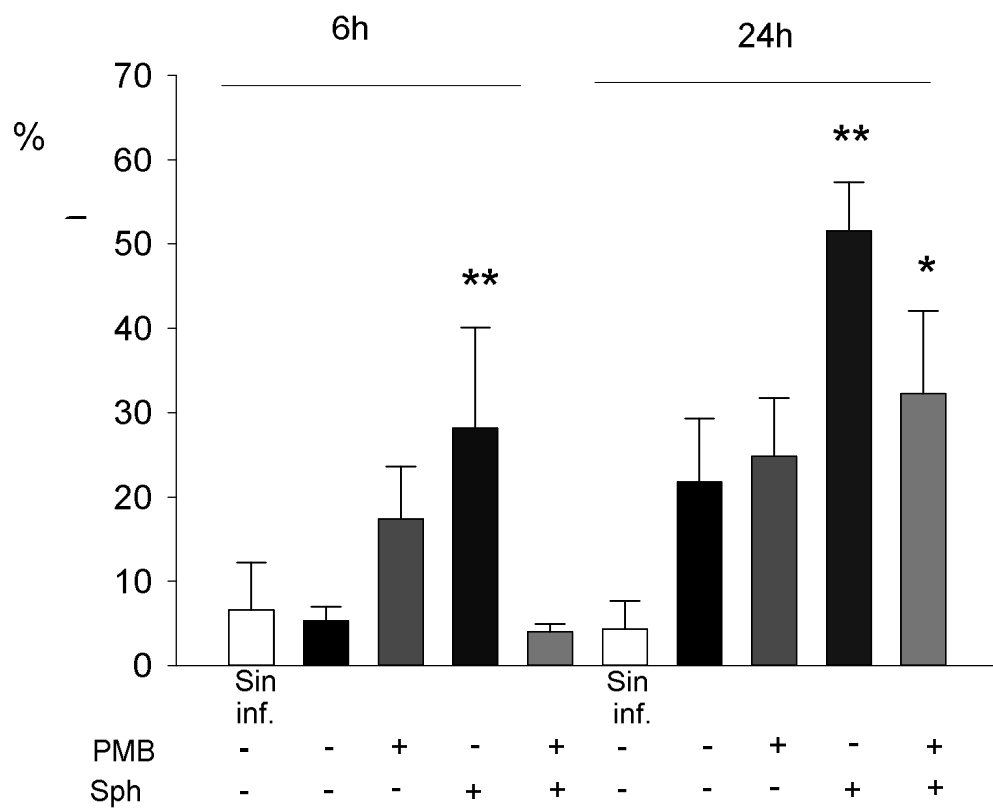


Fig. 6

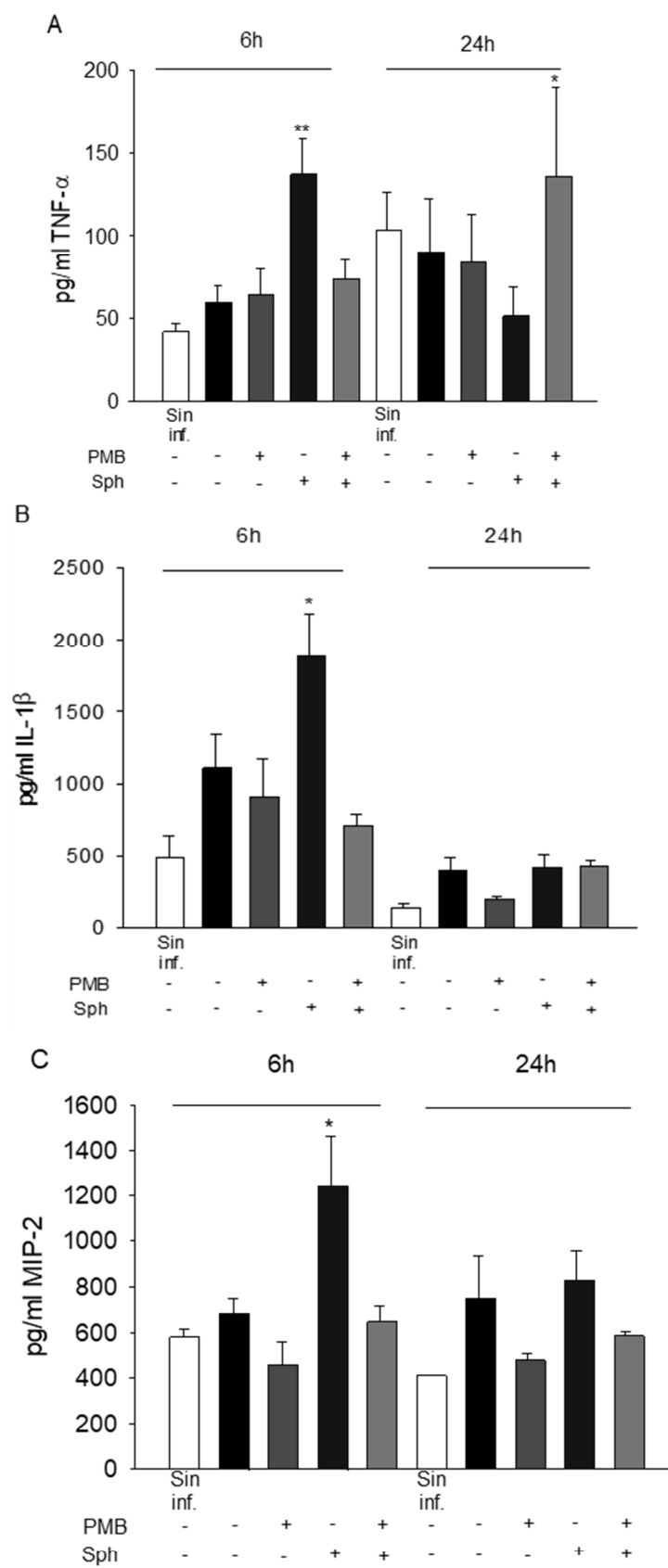


Fig. 7

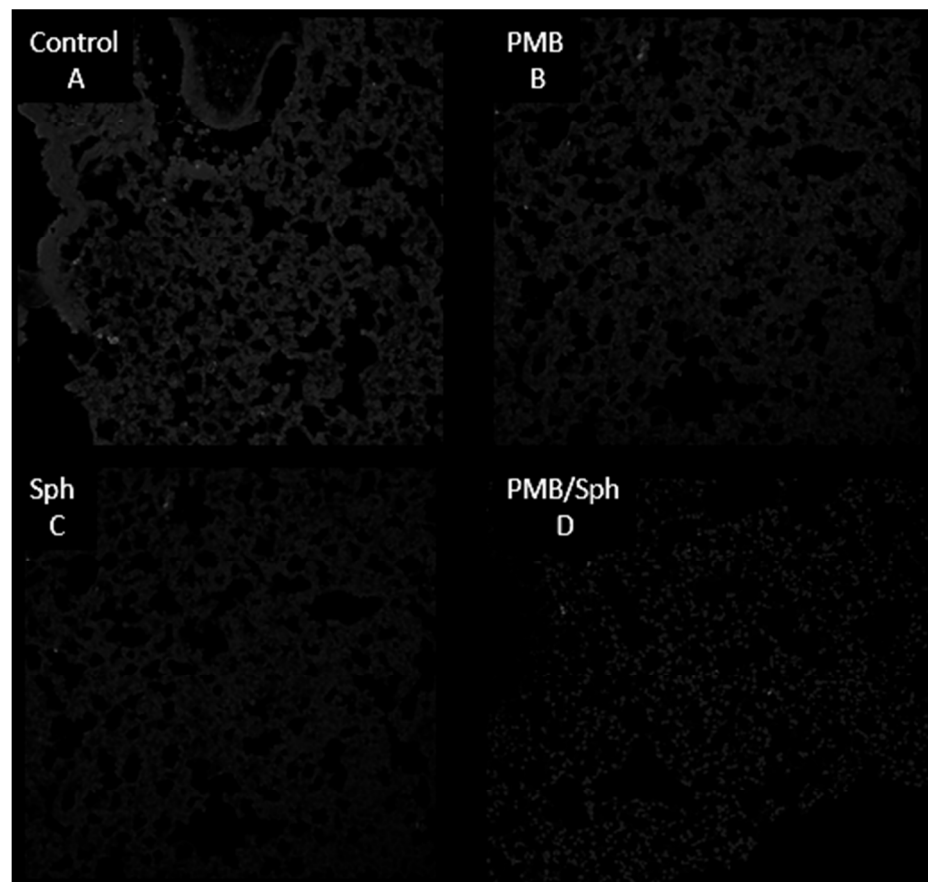


Fig. 8

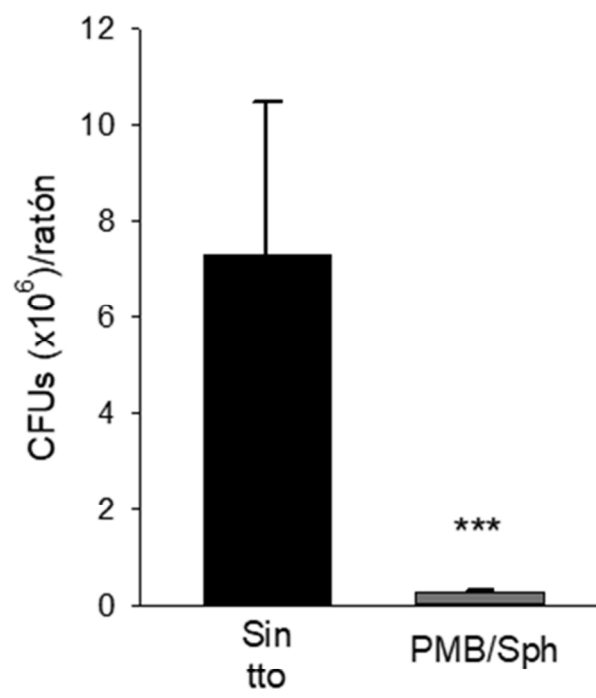


Fig. 9