

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina en combinación con fumarato.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad de fumarato está entre 5 mM y 30 mM.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad de fumarato está entre 10 mM y 20 mM.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina está entre 20 mg/L y 320 mg/L, inclusive.

**COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTIBIÓTICO AMINOGLUCÓSIDO EN
COMBINACIÓN CON UN METABOLITO O COMPUESTO DE LA VÍA
METABÓLICA SELECCIONADA DEL GRUPO QUE CONSTA DE: FUMARATO,
SUCCINATO, CITRATO, OXALOACETATO, RIBOSA, ARABINOSA,
GLUCONATO O PROPIONATO**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 USC § 119 (e) de la Provisional U.S. No. 61/871.554, presentada el 29 de agosto, 2013, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] El campo de la invención se refiere a la eliminación de la persistencia bacteriana y el tratamiento de infecciones crónicas.

ANTECEDENTES

[0003] La persistencia bacteriana se refiere a una sub-población latente de células tolerantes al tratamiento con antibióticos y se considera una fuente importante de infección crónica y recurrente. La persistencia bacteriana se diferencia de la resistencia a antibióticos por el hecho que las persistentes no son diferentes genéticamente de las células susceptibles a antibióticos. En su lugar, la persistencia resulta de la heterogeneidad de la población fenotípica dentro de una población isogénica. Visto como parte de una estrategia de supervivencia epigenética, la persistencia pierde un rápido crecimiento con el fin de ganar la tolerancia a la diversidad de estrés, incluyendo antibióticos. Los estudios genéticos

han descubierto una serie de fenómenos celulares implicados en la persistencia bacteriana, incluyendo módulos de toxina-antitoxina y la respuesta estricta. Se necesitan composiciones y métodos para eliminar o reducir las persistencias bacterianas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] Las bacterias tienen la tendencia a reducir su tasa metabólica o introducir formas de latencia de varias intensidades, que influyen en su susceptibilidad a los antibióticos y hacen el tratamiento de las infecciones más difícil. La persistencia bacteriana es un estado en el que una sub-población de células latentes, denominadas aquí como "persistencias bacterianas", tolera el tratamiento con antibióticos. Las persistencias bacterianas han sido implicadas en las biopelículas y las infecciones crónicas y recurrentes. A pesar de esta relevancia clínica, actualmente no existen medios listos para erradicar las persistencias.

[0005] Las composiciones y métodos descritos en este documento se refieren, en parte, al descubrimiento de los metabolitos del ciclo tricarboxílico, así como metabolitos de la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos y el catabolismo de los lípidos que se pueden usar para potenciar la mortandad de las células de *P. aeruginosa* en varios estados metabólicos reducidos en combinación con aminoglucósidos. En los experimentos, descritos en este documento, entre las fuentes de carbón activo, el fumarato y el succinato han dado muy buenos resultados con respecto a la potenciación de la eficacia de los antibióticos. Los inventores también encontraron que la glucosa, el piruvato y el propionato también sensibilizan la bacteria a los antibióticos aminoglucósidos. Este descubrimiento puede producir nuevas estrategias de tratamiento para las

infecciones crónicas como las asociadas con la fibrosis quística y las infecciones inducidas por biopelícula de bacterias Gram-negativas. Una de las ventajas de los métodos como descritos en este documento es que los metabolitos o compuestos son relativamente fáciles de usar, que se toleran bien, y que se pueden administrar fácilmente utilizando diversas rutas (e.g., intravenosa, inhalación, tópica, oral, etc.). Por ejemplo, el fumarato ya se utiliza en combinaciones de inhalación con otras terapias pulmonares (e.g., beta agonistas) para el tratamiento del asma, por lo tanto conocemos los temas concernientes a la toxicidad. Otra ventaja es que el uso de compuestos metabólicos es barato.

[0006] El trabajo descrito en este documento establece nuevas estrategias con base en novedosos metabólicos para erradicar persistencias bacterianas y pone de relieve la importancia crítica del ambiente metabólico de eficacia de los antibióticos. Sin desear estar limitado por la teoría, los métodos descritos en este documento tienen en cuenta el requisito del consumo de aminoglucósidos en la generación de la fuerza protón-motriz, y que los metabolitos que inducen la fuerza protón-motriz en bacterias persistentes inducen a la mortandad de persistencias de una manera dependiente de consumo. También se contemplan los métodos descritos en este documento para uso con bacterias de fase planctónicas.

[0007] Por consiguiente, en algunos aspectos este documento proporciona métodos para el tratamiento de una infección bacteriana crónica o persistente, que comprende: administrar a un sujeto que tiene una infección bacteriana crónica o persistente y someterlo a un tratamiento con antibiótico aminoglucósido, una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz como un adyuvante, en el que el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz es un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que

consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la beta-oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, y el catabolismo de los lípidos.

[0008] En una implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, o tobramicina.

[0009] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina B, neomicina C, frameticina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina o lividomicina.

[0010] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo TCA es acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato, piruvato, lactato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0011] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de la β -oxidación es propionato, y análogos o derivados de los mismos.

[0012] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo de la urea es arginosuccinato, o análogos o derivados de los mismos.

[0013] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0014] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginina, lisina, glutamato, glutamina, asparagina, glicina, triptófano, leucina, histidina, y prolina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0015] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de lípidos es el ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0016] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, al menos dos compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz se administran como un adyuvante, en el que los compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz son cada uno un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la beta-oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos, o cualquier combinación de los mismos.

[0017] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es fumarato.

[0018] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

[0019] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende uno o más organismos Gram negativos o Gram positivos. En otras implementaciones de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más bacterias atípicas, tal como micoplasma, clamidia o *micobacterias*).

[0020] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*.

[0021] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más de las especies de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, o *Enterobacter*.

[0022] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana es una infección adquirida en el hospital.

[0023] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección adquirida en el hospital es causada por la meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* o resistente a múltiples fármacos *Pseudomonas aeruginosa*.

[0024] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana se caracteriza por la formación de biopelículas.

[0025] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección es recurrente.

[0026] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto tiene o está en riesgo de contraer una infección crónica o persistente; tiene una infección del tracto urinario; endocarditis infecciosa; una infección de la piel, la nariz, las orejas, y/o los ojos; quemaduras externas; una infección asociada a la fibrosis quística; una infección asociada con un dispositivo vascular; una infección asociada con una prótesis de hueso; una infección de la válvula protética; una infección de la válvula nativa; una infección asociada con la endometritis; infecciones asociadas con neutropenia febril; una infección intra-abdominal; meningitis; una infección asociada con osteomielitis; una infección asociada con la enfermedad inflamatoria de la pelvis; una infección asociada con peritonitis; una infección asociada con la neumonía; una infección asociada con pielonefritis; una infección asociada con la piel o del tejido blando; una infección asociada con la cirugía, o una infección asociada con la tularemia.

[0027] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente, es un sujeto inmunodeprimido.

[0028] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto inmunodeprimido es un humano con el virus de inmunodeficiencia positivo; un sujeto con fibrosis quística; o un sujeto que tiene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

[0029] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente ha tenido, está teniendo, o tendrá un procedimiento médico invasivo.

[0030] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente tiene un dispositivo médico interno.

[0031] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y un compuesto que estimula la PMF se administran por vía tópica.

[0032] En otra implementación del método de cajas y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y un compuesto que estimula la PMF se administran por vía intravenosa.

[0033] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y el compuesto estimulante de PMF se administran por vía intramuscular.

[0034] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y el compuesto estimulante de PMF se administran mediante inhalación.

[0035] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido no se administra por vía oral.

[0036] También se proporciona en este documento los métodos para inhibir o retardar la formación de biopelículas o la colonización sobre una superficie, el método comprende poner en contacto una superficie con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF, en el que el uno o más compuestos que estimulan la PMF son cada uno un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos, y combinaciones de los mismos.

[0037] En una implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, o tobramicina.

[0038] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina B, neomicina C, framisetina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, paromomicina sulfato, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina o lividomicina.

[0039] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo TCA es acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación en estos.

[0040] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de la β -oxidación es propionato, y análogos o derivados del mismo.

[0041] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo de la urea es arginosuccinato, o análogos o derivados del mismo.

[0042] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0043] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginina, lisina, glutamato, glutamina, asparagina, glicina, triptófano, leucina, histidina, y prolina, análogos o derivados de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

[0044] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de lípidos es el ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0045] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es fumarato.

[0046] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

[0047] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el biopelícula comprende uno o más organismos Gram positivos o Gram negativos. En otras implementaciones de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende uno o más bacterias atípicas, tal como micoplasma, clamidia o *Mycobacteria*.

[0048] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie de un dispositivo médico interno.

[0049] En otro aspecto también se proporciona en este documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un antibiótico aminoglucósido en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un metabolito o compuesto de una vía

metabólica seleccionada del grupo constituido por: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos y sus combinaciones.

[0050] En una implementación de esta composición y métodos de uso de la misma, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el metabolito o compuesto de la vía metabólica es fumarato.

[0051] En otra forma de implementación de las composiciones descritas en este documento y los métodos de uso de los mismos, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un metabolito o compuesto de la vía metabólica es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

Definiciones

[0052] Por conveniencia, ciertos términos empleados en este documento, en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen aquí. A menos que se indique lo contrario, o este implícito por el contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados indicados a continuación. A menos que se indique expresamente lo contrario, o sea aparente a partir del contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en el arte al cual pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar en la descripción de implementaciones particulares, y no están destinadas a limitar la invención reivindicada, porque el alcance de la invención está limitado solamente por las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo

significado que se entiende comúnmente por un versado de ordinario versado en el arte al que pertenece esta invención.

[0053] Tal como se utilizan aquí, los términos "que comprende" o "comprende" se usan en referencia a las composiciones, métodos y componente(s) respectivo(s) de los mismos, que son esenciales para la invención, pero abierto a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no.

[0054] Tal como se utiliza en este documento, el término "que consiste esencialmente de" se refiere a aquellos elementos requeridos para una implementación dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas o funcionales de esta implementación de la invención.

[0055] El término "que consiste de" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como descritos en este documento , que son exclusivos de cualquier elemento no citado en esa descripción de la implementación.

[0056] Tal como se utiliza en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento y/o que serán evidentes para los versados en el arte al leer esta descripción y así sucesivamente.

[0057] Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de

reacción usadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con los porcentajes puede significar $\pm 1\%$.

[0058] A menos que se defina lo contrario en este documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que se entienden comúnmente por los versados en el arte al que pertenece esta descripción. Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descritos en este documento y como tal puede variar. La terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente implementaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones. Las definiciones de términos comunes en inmunología y biología molecular se pueden encontrar en el Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter *et al* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Luttmann Werner Immunology, published by Elsevier, 2006. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Los genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew *et al*. (Eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (Ed), Maniatis *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1982); Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1989); Davis *et al*, Basic Methods in

Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, U.S.A. (1986); o Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger y A. R. Kimmerl Eds, Academic Press Inc., San Diego, U.S.A. (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, *et al.* Ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, *et al.* ed., John Wiley y Sons, Inc.) y Current Protocols in Immunology (CPI) (John Coligan, *et al.*, ed. John Wiley and Sons, Inc.), que se incorporan en el presente por referencia en su totalidad.

[0059] Se entiende que la siguiente descripción detallada y los ejemplos siguientes son ilustrativos solamente y no se deben tomar como limitaciones del alcance de la invención. Los diversos cambios y modificaciones a las implementaciones descritas, que serán evidentes para los versados en el arte, se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Además, todas las patentes, solicitudes de patentes, y publicaciones identificadas se incorporan expresamente aquí como referencia con el propósito de describir y revelar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que podrían ser utilizadas en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido se debe interpretar como una admisión que los inventores no tienen derecho a anteceder a dicha divulgación, en virtud de la invención previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones relativas a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para las solicitantes y no constituyen admisión alguna sobre la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060] Las Figs. 1A-1B muestran los datos que indican que diversas fuentes de carbono permiten la mortandad de *P. aeruginosa* persistentes por tobramicina. La *P. aeruginosa* persistentes se seleccionaron por selección quinolona. Las persistentes luego se sometieron a diversas fuentes de carbono de la vía de Entner-Doudoroff, vía de la fosfato pentosa y el ciclo del ácido tricarboxílico, así como también la molécula puente entre la β -oxidación y el ciclo TCA (e.g, propionato). La FIG. 1A muestra la supervivencia de las persistentes a las 4 horas de incubación en presencia de la fuente de carbono y tobramicina. La FIG. 1B muestra el porcentaje en el tiempo de persistentes después del tratamiento con fumarato y diferentes clases de antibióticos.

[0061] Las Figs. 2A-2B muestran los datos que indican que el fumarato permite la mortandad de *P. aeruginosa* en fase estacionaria por tobramicina. La FIG. 2A muestra la potenciación de la tobramicina con dosis crecientes de fumarato. La concentración de la tobramicina de 40mg/L es una concentración sérica máxima típica lograda por administración i.v. La FIG. 2B muestra las dosis crecientes de la tobramicina que alcanzaron la mortandad más alta cuando se administra con fumarato.

[0062] Las figuras. 3A-3F demuestran la potenciación a base de metabolitos de los aminoglucósidos en células en fase estacionaria de la *P. aeruginosa*. La FIG. 3A muestra que la selección de los compuestos del metabolismo intermediario se hizo para evaluar la potenciación de la tobramicina (TBR), incluyendo la glicólisis, la vía de Pentosa, el ciclo del ácido tricarboxílico, que comprende la derivación del glioxilato y los compuestos fuera de él, así como un enlace con la β -oxidación. La FIG. 3B muestra la supervivencia en CFU por ml

para las células no tratadas (sin AB) y las células tratadas con tobramicina (TBR) en una concentración de 40 [mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RIB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), alfa-cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP), mpmtese en fase estacionaria, las concentraciones de fuentes de carbono fueron emparejados para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 3C** muestra los efectos de fumarato (FMR) y glioxilato (GLX) que fueron comparados sin fuente de carbono con una dosis más alta de tobramicina (320 [mg/l]). **La FIG. 3D** muestra la cinética de potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina sola, el fumarato solo o sin tratamiento. **La FIG. 3E** muestras las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40mg/L] se graficaron para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 3F** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[0063] Las figuras. 4A-4E demuestran la potenciación a base de metabolito de aminoglucósidos en *P. aeruginosa* persistentes. **La FIG. 4A** muestra el establecimiento de persistencia por selección de la ciprofloxacina; las condiciones incluyen, sin tratamiento (línea de color negro, ◻), 5 mg/l (▼), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (■), 40 mg/l (●) de ciprofloxacina. **La Fig. 4B** muestra un panel de metabolitos que también se ensayó para la potenciación de la tobramicina (TBR) en una concentración de [40 mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RLB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), alfa-cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP). Las concentraciones de las fuentes de carbono fueron emparejadas para tener 60

mM de carbono. **La FIG. 4C** muestra la cinética de la potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina. **La FIG. 4D** muestra las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40 mg/L] graficadas para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 4E** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[0064] Las **FIG. 5A-5E** demuestran la potenciación en contextos clínicos relevantes. **Las Figs. 5A-5B Muestran** las curvas de mortandad para células en fase estacionaria de pacientes CF derivadas de cepas no mucoides tratadas con dosis crecientes de la tobramicina y sin fuentes de carbono (CTRL), el fumarato (FMR) o piruvato (PRV). **La FIG. 5C** muestra las mismas curvas de mortandad con un paciente CF derivada de cepas no mucoides. **La FIG. 5D** muestra las mismas curvas de mortandad con una cepa derivada de pacientes CF con un alto perfil de resistencia a los antibióticos. **La FIG. 5E** muestra la mortandad antibiótica de biopelículas con tobramicina (TBR) sin fuente de carbono adicional (CTRL) o fumarato (FMR).

[0065] Las **figuras. 6A-6D** demuestran la potenciación de las fuentes de carbono que provocan aumento en la absorción de la tobramicina a través de la acumulación PMF. **La FIG. 6A** muestra las medidas con base en la citometría de flujo de la tobramicina etiquetada con fluorescencia en células PAO1, tratadas respectivamente, con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6B** muestra la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células PAO1 tratadas respectivamente con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6C** muestra la evaluación de la criometría de flujo de la absorción de la tobramicina en

ausencia o presencia de un inhibidor de PMF (NaN₃). La **FIG. 6D** muestra la evaluación mediante el ensayo de supervivencia del impacto de varios inhibidores de PMF en la letalidad de la tobramicina en fase estacionaria tratada con fuentes de carbono.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0066] Las composiciones, enfoques y métodos descritos en el presente documento proporcionan métodos económicos y eficientes para mejorar el tratamiento de las infecciones crónicas y reducir, retrasar o inhibir la formación de biopelículas. Estos métodos novedosos se adaptan fácilmente a los entornos clínicos puesto que la toxicidad y la eficacia de los antibióticos y metabolitos utilizados ya han sido estudiados *in vivo*, y puesto que ya han sido establecidas las dosificaciones tanto para los antibióticos y metabolitos. Estos enfoques y métodos terapéuticos también son útiles con productos químicos no metabólicos que inducen la fuerza protón-motriz en bacterias. Además, los enfoques y métodos descritos en este documento de inducción de la fuerza protón-motriz se pueden utilizar para potenciar otras clases de antibióticos que también requieren fuerza protón-motriz para la captación.

[0067] Hay algunos métodos para eliminar las bacterias persistentes. El campo antimicrobiano se centra principalmente en el desarrollo de nuevos antibióticos, que es lento y costoso, ya que requiere el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas y posteriores experimentos *in vivo* de toxicidad y eficacia para los antibióticos candidatos. Los enfoques y métodos descritos en este documento mejoran los antibióticos existentes, a través de comprender el mecanismo de su actividad, y el desarrollo de adyuvantes que estimulan la PMF o variantes de estos, tal como, por ejemplo, acetato, citrato, isocitrato, α -

cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, que inducen la fuerza protón-motriz.

[0068] En consecuencia, el presente documento proporciona combinaciones novedosas de los aminoglucósidos y adyuvantes que estimulan la fuerza protón-motriz para uso en las composiciones y métodos terapéuticos, como el tratamiento por vía intravenosa y tópica de infecciones crónicas, incluyendo, por ejemplo, la formación de biopelículas durante o después de las intervenciones quirúrgicas. Además de tales usos terapéuticos, las combinaciones de los aminoglucósidos y los adyuvantes que estimulan la PMF descritos en este documento son útiles para composiciones y métodos de la eliminación y la reducción de biopelículas y bacterias persistentes en lugares sin tratamiento, tal como, por ejemplo, superficies contaminadas de bacterias, bacterias en fase planctónica y líquidos.

Aminoglucósidos y compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz

[0069] En algunos aspectos este documento proporciona, composiciones, tal como composiciones terapéuticas, que comprende una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF o adyuvantes que estimulan la fuerza protón-motriz.

[0070] Tal como se utiliza en este documento, el término "antibiótico aminoglucósido" se refiere a cualquier fármaco de origen natural, o un derivado semi-sintético o sintético, que comprende un anillo de aminociclitol altamente conservados (anillo II), que es una estructura central que está unida a varios restos de azúcar amino-modificados, que tiene actividad antibiótica, según se

define el término en este documento. La capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de, o mortandad de, uno o más microorganismos se denomina aquí como "actividad antibiótica". El anillo aminociclitol está compuesto principalmente de 2-deoxiestreptamina (2-DOS) y tiene funcionalidad 1,3-diamino y tres o cuatro grupos hidroxilo que proporcionan puntos de anclaje para los restos de aminoazúcar. Los aminoglucósidos se pueden dividir en 3 subclases dependiendo del patrón de sustitución: 4 monosustituídos, o 4,5- o 4,6- disustituídos. Los aminoglucósidos en cada subclase muestran una estrecha semejanza estructural. Los aminoglucósidos tienen varios mecanismos de actividad antibiótica, incluyendo, pero no limitado a, la inhibición de la síntesis de proteínas; la interferencia con los procesos de corrección durante la traducción, y causan un aumento en la tasa de error en la síntesis con la terminación prematura; inhiben la translocación ribosomal cuando el peptidil-tRNA se mueve del sitio-A al sitio-P; rompen la integridad de la membrana celular bacteriana; y/o se unen a la subunidad 30S ribosomal bacteriana.

[0071] Los aminoglucósidos tiene actividad antibiótica contra las infecciones que implican, bacterias aeróbicas Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*. Además, algunas micobacterias, incluyendo las bacterias que causan la tuberculosis, son susceptibles a los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos también son útiles para el tratamiento empírico de las infecciones graves, como, por ejemplo, la septicemia, infecciones intra-abdominales, infecciones del tracto urinario, e infecciones del tracto respiratorio, incluyendo las infecciones de las vías respiratorias nosocomiales. Las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y bacterias atípicas (e.g., micoplasma, clamidia y micobacterias) también se pueden tratar con aminoglucósidos, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de los aminoglucósidos

útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, tobramicina, neomicina B, neomicina C, framisetina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina, lividomicina, y derivados de los mismos de cada uno de estos antibióticos aminoglucósidos, incluyendo derivados sintéticos y semi-sintéticos. Las estructuras químicas de las tres clases representativas de los antibióticos aminoglucósidos ejemplares y sus sitios de sustitución para uso en los métodos y composiciones descritos en este documento se proporcionan a continuación. Tal como se entiende por un versado en el arte, cualquier compuesto o derivado que tenga variaciones de las estructuras químicas proporcionadas más adelante, y que tengan actividad antibiótica, son adecuados para uso en las implementaciones de los métodos y composiciones proporcionados en este documento (ver, por ejemplo, "Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and aminoglycoside Mimics," Chittapragada M. *et al*, Perspectives in Medicinal Chemistry, 2009: 3 21-37, los contenidos de los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad).

Sustitución	Anillo I	Anillo II	Anillo III, IV; V	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Aminoglucósido
4-monosustituido				NH ₂	OH	H	H	Neamina Paromamina
4,5-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Apramicina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Ribostamicina Butirosin B
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Neomicina B Paromomicina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Lividomicina A
4,6-disustituido				NH ₂	OH	OH	H	Kanamicina A Kanamicina B Kanamicina C Tobramicina Amikacina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Gentamicina C1 Gentamicina C2 Gentamicina C1A Geneticina

[0072] Por consiguiente, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina. La estreptomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas, y se une a la subunidad pequeña 16S rRNA de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, interfiriendo con la unión del formil-metionil-tRNA a la subunidad 30S. Esto conduce a la mala interpretación de codones, la eventual inhibición de la síntesis de proteínas y en última instancia, la mortandad de las células microbianas a través de mecanismos que todavía no se entienden. La estreptomicina es un antibiótico que inhibe las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y por lo tanto es un antibiótico de amplio espectro útil. Las infecciones

crónicas a modo de ejemplo que pueden ser tratadas utilizando las composiciones y métodos descritos en este documento que comprende la estreptomicina como el antibiótico aminoglucósido incluyen, pero no se limitan a, la endocarditis infecciosa causada por *Enterococcus* cuando el organismo no es sensible a gentamicina, tuberculosis en combinación con otros fármacos anti-TB, y la peste (*Yersinia pestis*). La estreptomicina también es útil en las composiciones y métodos descritos en este documento para uso en aplicaciones de medicina veterinaria, como en los tratamientos contra las bacterias Gram-negativas en animales de gran tamaño (e.g, caballos, vacas, ovejas, etc.). La estreptomicina también se puede utilizar, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, como un pesticida, para combatir el crecimiento de bacterias, hongos y algas. La estreptomicina inhibe/reduce las enfermedades bacterianas y fúngicas de determinadas frutas, verduras, semillas y cultivos ornamentales, e inhibe/reduce las algas en estanques ornamentales y acuarios, así como también inhibe/reduce el fuego bacteriano en arboles de manzanas y peras.

[0073] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la kanamicina o la kanamicina A. La kanamicina interactúa con la subunidad 30S de los ribosomas procariotas. La kanamicina A induce cantidades sustanciales de error de traducción e indirectamente inhibe la translocación durante la síntesis de proteínas. La kanamicina A está disponible en formas orales, intravenosas, e intramusculares; se pueden administrar a través de la formulación de aerosol o de riego, y se puede utilizar para tratar una amplia variedad de infecciones; y se utiliza en forma del sulfato.

[0074] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la gentamicina. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido, utilizado para tratar muchos tipos de infecciones bacterianas, especialmente las causadas por organismos Gram-negativos. La gentamicina es un antibiótico bactericida que funciona, en parte, por unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, interrumpiendo la síntesis de proteínas. Al igual que otros aminoglucósidos, cuando la gentamicina se administra por vía oral, no es activa sistémicamente. Esto se debe a que no se absorbe de una manera apreciable desde el intestino delgado. La gentamicina se puede administrar por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía tópica para tratar infecciones, en diferentes implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento. Parece ser eliminada por completo sin cambios en la orina. La gentamicina es uno de los pocos antibióticos termoestables que permanecen activas incluso después de la esterilización en autoclave, lo que hace que sea particularmente útil en la preparación de algunos medios de crecimiento microbiológico. Se puede utilizar, por ejemplo, durante la cirugía ortopédica cuando se requieren altas temperaturas para el establecimiento de cementos (e.g, prótesis de cadera). La gentamicina es activa contra una amplia gama de infecciones bacterianas humanas, incluyendo la mayoría de las bacterias Gram-negativas, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, y las especies de *Staphylococcus* Gram-positivos. La gentamicina también es útil contra *Yersinia pestis*, sus parientes, y *Francisella tularensis* (el organismo responsable de la tularemia visto a menudo en los cazadores y/o tramperos).

[0075] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina. La tobramicina es un antibiótico aminoglucósido con actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La tobramicina actúa inhibiendo la síntesis de

proteínas en las células bacterianas. Se ha demostrado que la tobramicina es activa contra la mayoría de las cepas de los siguientes organismos tanto *in vitro* como en infecciones clínicas: microorganismos Gram-positivo aeróbicos y facultativos, incluyendo, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*; microorganismos Gram negativos aeróbicos y facultativos, incluyendo, por ejemplo, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella morgan ii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp.*, y *Serratia sp.*

[0076] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es netilmicina. La netilmicina no se absorbe en el intestino y por lo tanto se puede administrar por inyección o infusión. Se puede utilizar en el tratamiento de infecciones graves en particular las resistentes a la gentamicina.

[0077] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es Sisomicina (BACTOCEAZE o ENSAMYCIN), aislado de especies de caldo de fermentación de una del género *Micromonospora*, Es un nuevo aminoglucósido de amplio espectro, la mayoría estructuralmente relacionado con la gentamicina. La sisomicina es un aminoglucósido predeciblemente activo contra bacterias Gram-positivas. Al igual que otros aminoglucósidos, la sisomicina es bactericida para los aislados clínicos sensibles. Las Concentraciones Bactericida Mínimas (MBC) para la Sisomicina se ha encontrado que son equivalentes o muy cercanas a las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (MIC). La mayoría de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* siguen siendo susceptibles a la sisomicina.

[0078] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es arbekacina, un antibiótico aminoglucósido semisintético. Se utiliza principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes, incluyendo el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La Arbekacina fue originalmente sintetizada a partir de la dibecacina en 1973. Se ha registrado y comercializado en Japón desde 1990 bajo el nombre comercial HABEKACIN. Las versiones genéricas del fármaco también están disponibles bajo nombres comerciales tal como DECONTASIN y BLUBATOSINE. La Arbekacina se utiliza para el tratamiento a corto plazo de las infecciones bacterianas multi-resistentes, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), así como las bacterias entéricas y otras eubacterias. La Arbekacina funciona mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S bacterianas, provocando la mala interpretación del t-RNA lo cual, en consecuencia, deja a la bacteria incapaz de sintetizar proteínas vitales para su crecimiento. Específicamente, la arbekacina se une a cuatro nucleótidos de 16S rRNA y un solo aminoácido de la proteína S12. Esto interfiere con el sitio de decodificación en el entorno del nucleótido 1400 en 16S rRNA de la subunidad 30S. Esta región interactúa con la base oscilante en el anticodón de tRNA. Esto conduce a la mala interpretación del mRNA por lo tanto se insertan los aminoácidos incorrectos en el polipéptido que conduce a los péptidos no funcionales o tóxicos y la ruptura de los polisomas en monosomas no funcionales. La Arbekacina, como otros aminoglucósidos, no se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Su absorción se mejora notablemente por la administración parenteral. La duración normal de la terapia con el antibiótico aminoglucósido arbekacina IM o IV es de 7-10 días, aunque algunas veces puede ser necesaria una duración mayor.

[0079] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la amikacina, un antibiótico aminoglucósido utilizado para tratar diferentes tipos de infecciones bacterianas. La Amikacina funciona mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S bacterianas, provocando lectura errónea del mRNA y dejando a la bacteria incapaz de sintetizar proteínas vitales para su crecimiento. La amikacina se utiliza a menudo para las bacterias Gram-negativas tal como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento de infecciones graves, adquiridas en el hospital con resistencia a múltiples fármacos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*. También se incluyen en el espectro la *Serratia marcescens* y la *Providencia stuartii*. La Amikacina también se puede utilizar para tratar las infecciones de micobacterias no tuberculosas y la tuberculosis, cuando los fármacos de primera línea no pueden controlar la infección. La amikacina se puede combinar, en algunas formas de implementación, con un antibiótico de beta-lactama para el tratamiento empírico de las personas con neutropenia y fiebre. En algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento, la amikacina puede combinarse o administrarse con fosfomicina (también conocido como fosfomicina, fosfonomicina y los nombres comerciales Monurol y MONURIL), para el tratamiento de ciertas infecciones, tal como, por ejemplo, infección del tracto urinario.

[0080] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es neomicina. La neomicina se utiliza mayoritariamente como una preparación tópica, tal como NEOSPORIN. También puede, en algunas implementaciones, administrarse por vía oral. La neomicina no se absorbe desde el tracto gastrointestinal y se ha utilizado como una medida preventiva para la encefalopatía hepática e

hipercolesterolemia. La mortandad bacteriana en el tracto intestinal, mantiene los niveles de amoníaco bajos y evita la encefalopatía hepática, especialmente antes de la cirugía GI. También se ha utilizado para tratar la proliferación bacteriana del intestino delgado. Similar a otros aminoglucósidos, la neomicina tiene una excelente actividad frente a bacterias Gram-negativas, y tiene actividad parcial contra las bacterias Gram-positivas. No se administra por vía intravenosa, puesto que la neomicina es extremadamente nefrotóxica (provoca daño renal), especialmente en comparación con otros aminoglucósidos. La excepción es cuando se incluye la neomicina, en cantidades muy pequeñas, como conservante en algunas vacunas - típicamente 0.025 mg por dosis.

[0081] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es framicitina. La Framicitina se vende comúnmente como SOFRAMYCINA y SOFRA-TULLE. También existe en productos veterinarios, como framicitina sulf. Al igual que la neomicina, la framicitina tiene mala absorción sistémica. Se puede utilizar en las preparaciones tópicas para las infecciones de la piel, nariz, oídos y los ojos, por ejemplo, en combinación con otros fármacos antibacterianos y corticosteroides, en algunas implementaciones. También se puede utilizar para las infecciones gastrointestinales, en algunas implementaciones.

[0082] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es paromomicina (nombre de marca HUMATIN), primer aislado de *Streptomyces krestomuceticus* en la década de 1950. También se le llama monomicina y aminosidina. La paromomicina es un antibiótico diseñado para combatir las infecciones intestinales tal como la criptosporidiosis, la amebiasis, y leishmaniasis. La vía de

administración de la paromomicina puede ser la inyección intramuscular y la cápsula, en algunas implementaciones.

[0083] En este documento se proporcionan, en algunas implementaciones, combinaciones de antibióticos aminoglucósidos y otros antibióticos para la potenciación de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Tal como se usa en este documento, el término "antibiótico" se refiere a cualquier compuesto conocido por un versado en el arte que inhibirá o reducirá el crecimiento de, o la mortandad a, uno o más microorganismos, incluyendo especies bacterianas y especies de hongos. Muchos compuestos antibacterianos son relativamente pequeñas moléculas con un peso molecular de menos de 2000 unidades de masa atómica. El término "antibiótico" incluye modificaciones semi-sintéticas de diversos compuestos naturales, tal como, por ejemplo, los antibióticos beta-lactámicos, que incluyen penicilinas (producidas por hongos del género *Penicillium*), las cefalosporinas, las monobactamas, y los carbapenems. En consecuencia, el término "antibiótico" incluye, pero no se limita a, aminoglucósidos (e.g, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β -lactamas (e.g., penicilinas, cefalosporinas, monobactams, y carbapenems), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g, eritromicina), lincosamidas (e.g, clindomicina), cloranfenicoles, tetraciclinas, anfotericinas, cefazolinas, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos. El antibiótico utilizado en adición al antibiótico aminoglucósido en las diversas implementaciones de las composiciones terapéuticas y métodos descritos en el presente documento dependerá del tipo de infección bacteriana.

[0084] Como se ha demostrado en este documento, los inventores han descubierto que los compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz, tal como

altas concentraciones locales (e.g, al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos, 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias) de determinados metabolitos, inesperadamente mejora la eficacia de los antibióticos aminoglucósidos conocidos, proporcionando de este modo una combinación novedosa de las mismas composiciones y métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes. Los métodos y composiciones descritos en este documento se formulan para asegurar que una cantidad efectiva de un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) alcance el sitio de la infección, superando así, por ejemplo, las cantidades disminuidas significativamente conocidas de la glucosa en la sangre que normalmente se encuentran en el sitio de una infección. De acuerdo con ello, las composiciones y métodos descritos en la presente invención comprenden una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) o adyuvantes, en adición al antibiótico aminoglucósido.

[0085] Las frases "compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)", "adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)" o "adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)", como se usa en este documento, se refieren a un agente o compuesto, que incluye un metabolito, que causa o facilita un aumento cualitativo o cuantitativo en o estimula gradientes de protones utilizados para generar energía potencial quimiosmótica en células conocida como una "fuerza protón-motriz", donde se utiliza la energía potencial para la síntesis de ATP por la

fosforilación oxidativa. Sin desear estar limitado por la teoría, mediante el aumento de la fuerza protón-motriz en bacterias persistentes, los inventores han descubierto que esto aumenta o potencia la absorción de antibióticos aminoglucósidos y la mortandad de las bacterias a través del catabolismo de las fuentes de carbono y aumento de la oxidación de NADH.

[0086] De acuerdo con ello, un compuesto o adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) puede aumentar o estimular la PMF en una célula, tal como una célula bacteriana, por aproximadamente al menos 10% o más, al menos 20% o más, al menos 30% o más, al menos 40% o más, al menos 50% o más, al menos 60% o más, al menos 70% o más, al menos 80% o más, al menos 90 % o más, al menos 95% o más, al menos 100%, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 25 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor y todas las cantidades en el medio, en comparación con un nivel PMF de referencia o control en ausencia del compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF), o en presencia del antibiótico aminoglucósido solo. Los métodos y ensayos para identificar tales compuestos que estimulan la PMF se pueden basar en cualquier método conocido para un versado en el arte, se encuentran en todo el documento, en los dibujos, y en la sección de Ejemplos, tal como los ensayos de potenciación de metabolitos descritos en las Figuras 1A-1B y 2A-2B, por ejemplo.

[0087] Tal como se utiliza en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un agente que mejora el efecto farmacéutico de otro agente, tal como un antibiótico aminoglucósido. Los compuestos que estimulan la PMF como se describen en este documento funcionan como adyuvantes de los antibióticos aminoglucósidos, mediante el mejoramiento del efecto de los antibióticos aminoglucósidos por aproximadamente al menos 10% o más, al menos 20% o

más, al menos 30% o más, al menos 40 % o más, al menos 50% o más, al menos 60% o más, al menos 70% o más, al menos 80% o más, al menos 90% o más, al menos 95% o más, al menos 100%, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 25 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor y todas las cantidades en el medio, en comparación con el uso del antibiótico aminoglucósido solo.

[0088] Los términos "agente" y "compuestos que estimula la PMF" se usan indistintamente en este documento y se refieren a cualquier compuesto o sustancia tal como, pero no limitados a, una molécula pequeña, ácido nucleico, un aminoácido, un metabolito o análogo de la misma, polipéptido, péptido, fármaco, ion. etc. Un "agente" puede ser cualquier producto químico, entidad, o resto, incluyendo, sin limitación entidades proteináceas y no proteináceas, sintéticas y de origen natural. En algunas implementaciones, un agente es un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una proteína, un anticuerpo, un péptido, un aptámero, un oligómero de ácidos nucleicos, un aminoácido, o un carbohidrato, e incluye, sin limitación, proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, enzimasDNA, glicoproteínas, siRNAs, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos, etc. En ciertas implementaciones, como descritos en este documento, los agentes son metabolitos. Los compuestos pueden ser conocidos por tener una actividad y/o propiedad deseada, por ejemplo, potenciar la actividad aminoglucósida, o pueden ser seleccionados de una biblioteca de diversos compuestos, el uso de métodos de detección conocido por alguien de ordinario versado en el arte.

[0089] Tal como se utiliza en este documento, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que puede incluir, pero no se limita a, un péptido,

un peptidomimetico, un aminoácido, un análogo de aminoácido, un polinucleótido, un análogo de polinucleótido, un aptámero, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un compuesto orgánico o inorgánico (e.g, incluyendo compuestos heteroorganicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

[0090] Por consiguiente, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) es un metabolito intermedio o un estímulo metabólico, tal como, por ejemplo, un compuesto o una de sus variantes asociadas al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la vía β -oxidativa, la vía catabólica de aminoácidos, el ciclo de la urea, y las vías de catabolismo de los lípidos. Los metabolitos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, azúcares y sus análogos, tal como, glucosa, manitol, y fructosa, y análogos de los mismos. Por ejemplo, estos pueden ser utilizados en combinación con los metabolitos, tal como acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato. En algunas formas de implementación, los metabolitos para uso como compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido

propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, y análogos o derivados de los mismos.

[0091] En algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento, la concentración efectiva de un compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) que se usa (e.g, la concentración local logrado por la administración) es al menos 2,5 mM, al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 40 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 70 mM o mayor, al menos 80 mM o mayor, al menos 90 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias. En algunas implementaciones, las concentraciones citadas a lo largo de la descripción del documento son concentraciones locales (e.g., en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF a administrar. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto es bien conocida dentro de las habilidades de un versado en el arte.

[0092] En algunas implementaciones, las concentraciones de metabolitos y estímulos metabólicos para ser entregados como se ha indicado anteriormente son aún más normalizadas por el número de moléculas de carbono que entran en el ciclo TCA. En un ejemplo, la cantidad de moléculas de carbono que entran en el

ciclo de TCA se normaliza a 60 mM de carbono. Para este ejemplo, el metabolito isoleucina, que contiene 6 moléculas de carbono, se administra a una concentración de aproximadamente 10 mM. Como otro ejemplo, el metabolito ácido metilmalónico, que contiene 4 moléculas de carbono, se administra a una concentración de aproximadamente 15 mM. Una persona versada en el arte puede calcular fácilmente la concentración normalizada a administrar con base en el número de moléculas de carbono en el metabolito a administrar.

[0093] Los análogos de glucosa que se pueden usar en algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento son conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, derivados de glucosa, tal como D - (+) - 2-desoxiglucosa, D - (+) - 2-amino-2-desoxi-glucosa o N-acetil D - (+) - 2-amino-2-desoxiglucosa; derivados de D-manosa y manosa; D-glucosa y derivados de D-glucosa, incluyendo, pero no limitado a D-3-amino-3-desoxi-glucosa y D-2-amino-2-desoxi-glucosa; y D-galactosa y derivados de galactosa incluyendo, pero no limitado a D-2-desoxi-D-galactosa, D-4-amino-4-desoxi-galactosa y D-2-amino-2-desoxi-galactosa. La glucosa o restos de glucosa por lo tanto, se pueden diferenciar de la D-glucosa o un derivado tal como 2-DG y 2-glucosanina que es un epímero de la misma. Además, la glucosa o el resto análogo de la glucosa puede ser un derivado fluorado de cualquiera de los compuestos anteriores. Por otra parte, el oxígeno en el anillo de cualquiera de los compuestos anteriores puede estar sustituido con un isómero seleccionado del grupo que consiste de S, sulfona, y los similares. Por ejemplo, el análogo de la glucosa puede ser 5-tio D-glucosa o un derivado del mismo. El término "análogo de la glucosa" incluye también los derivados de glucosa, incluyendo, pero no limitado a, derivados que tienen grupos acilo (C1-C12) o grupos alquilo (C1-C12) unidos vía grupos --O-- o -NH- a las posiciones 3- y 4- moléculas de glucosa.

Además, el derivado de glucosa puede tener un efector de solubilidad o de partición o componente unido en las posiciones 1-, 3- o 4-.

[0094] El tipo de infección bacteriana que se está tratando se puede utilizar para determinar, en algunas implementaciones, que combinación particular de antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF a ser dada o administrada a un sujeto, utilizando los métodos y composiciones descritos en este documento. Por ejemplo, en algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el antibiótico aminoglucósido es la gentamicina y el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es manitol. En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es fumarato. En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es tobramicina, por ejemplo, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es succinato, citrato, oxaloacetato, piruvato, glucosa, fructosa, manitol, ribosa, arabinosa, gluconato o propionato. En otra implementación, un compuesto o metabolito que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se puede utilizar en combinación con al menos un compuesto adicional que estimula la PMF para potenciar el efecto de un antibiótico aminoglucósido.

[0095] En algunas implementaciones, los metabolitos o compuestos utilizados con los métodos descritos en este documento son metabolitos o compuestos dentro de la vía del ácido tricarboxílico en sí misma, o son metabolitos o compuestos (e.g, fuentes de carbono) de otras vías metabólicas que se alimentan en el ciclo del ácido tricarboxílico (e.g. β -oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de

la urea, etc.). Los términos "ciclo del ácido tricarboxílico", "ciclo TCA", "El ciclo del ácido cítrico" y "el ciclo de Krebs" se usan indistintamente en este documento.

[0096] En algunas implementaciones, una combinación de metabolitos o compuestos que se administran entran en los diferentes niveles del ciclo del ácido tricarboxílico. Por ejemplo, la glucosa (o piruvato o acetato) se pueden combinar con fumarato (o aspartato o tirosina o fenilalanina).

Infecciones crónicas o persistentes y métodos de tratamiento o inhibición de estas.

[0097] Como se ha demostrado en este documento, la administración de una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar en métodos de tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes. Las infecciones en las cuales las bacterias son o bien de crecimiento lento, persistentes o en biopelícula plantean un serio reto clínico para la terapia ya que las células en estos estados exhiben tolerancia a la actividad de los agentes antimicrobianos, tal como antibióticos. La Osteomielitis, endocarditis infecciosa, heridas crónicas, infecciones relacionadas con dispositivos en la vivienda, infecciones resultantes de quemaduras de segundo y tercer grado, y las infecciones bacterianas secundarias a complicaciones de afecciones respiratorias o de las mucosas, tal como las derivadas de la fibrosis quística, sinusitis e infecciones virales, son ejemplos no limitantes de infecciones que albergan células bacterianas persistentes. Debido a que la mayoría de los agentes antimicrobianos ejercen una actividad máxima contra las células que se dividen rápidamente, las terapias antimicrobianas para estas infecciones no son óptimas, lo que requiere tiempos de tratamientos prolongados, dosis altas de antibióticos y algunas veces tóxicas, y que

demuestran tasas de fracaso más altas. Sin desear estar limitado por la teoría, los nuevos métodos y composiciones descritos en este documento, que se combinan con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF, permite mayor eficacia de los antibióticos aminoglucósidos conocidos, mediante la mejora de su absorción a través de la estimulación PMF en células bacterianas, tal como células persistentes.

[0098] Por consiguiente, en algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para el tratamiento de una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante. Los métodos descritos en este documento pueden, en algunos aspectos y formas de implementación, ser utilizados para inhibir, retrasar la formación de, tratar y/o prevenir o proporcionar tratamiento profiláctico de las infecciones crónicas e infecciones por bacterias persistentes, incluyendo infecciones bacterianas causadas por el crecimiento lento, en fase estacionaria o bacterias que forman biopelícula en animales, incluyendo seres humanos.

[0099] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para inhibir una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00100] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para prevenir una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00101] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para tratar un sujeto que tiene una infección causada por células bacterianas persistentes, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene una infección causada por células bacterianas persistentes una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00102] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para tratar una infección bacteriana crónica o persistente, que comprende: administrar a un paciente que tiene una infección bacteriana crónica o persistente y someter a tratamiento con un antibiótico aminoglucósido, una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz como un adyuvante.

[00103] Los términos "célula persistente" o "células bacterianas persistentes" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a una subpoblación de microorganismos metabólicamente latente, típicamente bacterias, que no son sensibles a los agentes antimicrobianos tal como antibióticos. Las persistencias normalmente no son sensibles, i.e., no se mueren o inhiben por los antibióticos, ya que tienen, por ejemplo, no letalmente reguladas corriente abajo las vías en las

que los antibióticos actúan. Las persistentes pueden desarrollarse en concentraciones no letales (o sub-letales) del antibiótico.

[00104] En algunas formas de implementación de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido se selecciona de estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, neomicina B, neomicina C, frameticina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina., tobramicina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina, y lividomicina. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido se selecciona de estreptomicina, gentamicina y kanamicina A. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la tobramicina.

[00105] En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es un metabolito o un estímulo metabólico, tal como, por ejemplo, un compuesto que entra o es un metabolito en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la vía β -oxidativa, el ciclo de la urea, el ciclo catabólico de aminoácidos, o en una vía catabólica de los lípidos, o una variante de las mismas. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se selecciona de acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, y oxaloacetato. En algunas implementaciones, los metabolitos para uso como compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se

limitan a, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato y análogos o derivados de los mismos. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es propionato.

[00106] Tal como se usa en este documento, los términos "inhibir", "disminuir", "reducir", "que inhibe" e "inhibición" tienen sus significados normales y habituales para significar generalmente una disminución en una cantidad estadísticamente significativa, e incluyen inhibir el crecimiento o la división celular de una persistencia, crecimiento lento, fase estacionaria que causa una infección crónica, y/o bacterias de biopelículas, así como la mortandad de tales bacterias. Tal inhibición es una inhibición de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% del crecimiento de las bacterias frente al crecimiento de bacterias en ausencia de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Preferiblemente, la inhibición es una inhibición de aproximadamente al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, hasta incluyendo 100%, del crecimiento o la supervivencia de las bacterias en comparación con un nivel de referencia o control en ausencia de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF.

[00107] Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente en este documento, y se refieren a un animal, por ejemplo un humano, receptores del antibiótico aminoglucósido y el uno o más compuestos que estimulan la PMF, tal

como, por ejemplo, tobramicina y fumarato. Para el tratamiento de los estados de enfermedad que son específicos para un animal específico, tal como un sujeto humano, el término "sujeto" se refiere a ese animal específico. Los términos "animales no humanos" y "mamíferos no humanos" se utilizan indistintamente en este documento, e incluyen mamíferos tal como ratas, ratones, conejos, ovejas, gatos, perros, vacas, cerdos y primates no humanos. El término "sujeto" también puede abarcar cualquier vertebrado incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, reptiles, anfibios y peces.

[00108] Tal como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento", "que trata" o "de mejoramiento del" se refieren a los tratamientos terapéuticos, en el que el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, retardar o detener la progresión o la gravedad de una condición asociada con, una enfermedad o trastorno, tal como una infección crónica, e incluyen uno o más de: mejorar un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria o biopelículas en un sujeto; el bloqueo o la mejora de la repetición de un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto; la disminución de la gravedad y/o frecuencia de un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto; y el estancamiento, disminución o inhibición del crecimiento de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto. El tratamiento significa mejorar, bloqueando, reduciendo, disminuyendo o inhibiendo por aproximadamente 1% a aproximadamente 100% en comparación con un sujeto que está siendo tratado con un antibiótico aminoglucósido pero en ausencia de una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Preferiblemente, la mejora, bloqueo, reducción, disminución o inhibición es aproximadamente al menos 5%, al

menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, hasta e incluyendo el 100% frente a un sujeto que está siendo tratado con un antibiótico aminoglucósido, pero en ausencia de tratamiento con una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. El tratamiento es generalmente considerado "efectivo" si uno o más síntomas o marcadores clínicos se reducen. Alternativamente, el tratamiento es "efectivo" si la progresión de una enfermedad se reduce o detiene. Es decir, el "tratamiento" incluye no solamente la mejora de los síntomas o marcadores, sino también un cese de al menos ralentización del progreso o empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de uno o más de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (i.e., no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término "tratamiento" de una enfermedad incluye también el alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo).

[00109] Tal como se utiliza en este documento, la frase "aliviar un síntoma de una infección persistente o crónica" es mejorar cualquier condición o síntoma asociado con la infección persistente. Alternativamente, el alivio de un síntoma de una infección persistente puede implicar la reducción de la relleno microbiana infecciosa (tal como bacteriana) en el sujeto en relación con tal relleno en un control no tratado. Cuando se compara con un control equivalente sin tratar, dicha reducción o grado de prevención es al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%, medido mediante cualquier técnica estándar.

Deseablemente, la persistencia de la infección es completamente curada cuando se detecta por cualquier método estándar conocido en el arte, en cuyo caso se considera que la infección persistente ha sido tratada. Un paciente que está siendo tratado por una infección persistente es aquel que un médico ha diagnosticado que tiene tal condición. El diagnóstico puede ser por cualquier medio adecuado. El diagnóstico y el seguimiento pueden implicar, por ejemplo, detectar el nivel de la relleno microbiana en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia de tejido, análisis de sangre, o de orina), detectar el nivel de un marcador sustituto de la infección microbiana en una muestra biológica, los síntomas de detección asociados con infecciones persistentes, o la detección de células inmunes implicadas en la respuesta inmune típica de infecciones persistentes (por ejemplo, la detección de antígeno específico de células T, o sus productos, por ejemplo, producción de anticuerpos).

[00110] Tal como se utiliza en este documento, los términos "prevenir" y "prevención" tienen sus significados normales y habituales, e incluyen uno o más de: prevenir la infección crónica o la colonización de una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto, o sobre una superficie o en un material poroso; prevenir un incremento en el crecimiento de una población de una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto, o sobre una superficie o en un material poroso; prevenir el desarrollo de una enfermedad causada por una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o biopelícula en un sujeto; y prevenir los síntomas de una infección crónica o enfermedad causada por una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto. Tal como se usa en este documento, la prevención tiene una duración de al menos aproximadamente 0,5 días, un día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días o más

días después de la administración o aplicación de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos estimulantes de la PMF, como los descritos en este documento.

[00111] En algunas implementaciones de los métodos de tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes o la inhibición del crecimiento de bacterias persistentes que se describen en este documento, el sujeto o superficie se puede administrar o poner en contacto con un segundo antibiótico al mismo tiempo o junto con la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. los segundos antibióticos adecuados incluyen, por ejemplo, linezolida, dapromicina, aminoglucósidos (e.g, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β -lactamas (e.g, penicilinas, carbapenemas, monobactemas, y cefalosporinas), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g, eritromicinas), lincosamidas (e.g, clindamicina), cloramfenicoles, tetraciclinas, amfotericinas, cefazolinas, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos.

[00112] En algunos aspectos e implementaciones de los métodos de inhibición, el retraso de la formación, tratamiento, profilaxis y prevención de una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o de biopelícula descritos en este documento, los métodos se pueden utilizar para conseguir un efecto sistémico y/o local contra las bacterias relevantes, poco antes o después de un tratamiento médico invasivo, como la cirugía o la inserción de un dispositivo médico interno (e.g, el reemplazo de articulaciones (cadera, rodilla, hombro, etc.)). El tratamiento puede continuarse después del tratamiento médico invasivo, tal como después de la operación o durante el tiempo que el dispositivo está en el cuerpo.

[00113] En consecuencia, en algunos aspectos proporcionados en este documento son procedimientos para inhibir o prevenir la formación o la colonización de una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o de biopelícula en un sujeto antes, durante, o después de un tratamiento médico invasivo, que comprende administrar a un sujeto antes, durante y/o después de un tratamiento médico invasivo una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00114] En algunas de tales implementaciones, el antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) puede administrarse una vez, dos veces, tres veces o más, a partir de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más, hasta 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, o 1 hora o inmediatamente antes de la cirugía para permitir una presencia sistémica o local del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF). La composición farmacéutica o antibiótico aminoglucósido pueden, en algunas implementaciones, se administra después del tratamiento médico invasivo para un periodo de tiempo, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o más, o durante todo el tiempo en el que el dispositivo está presente en el cuerpo del sujeto.

[00115] Tal como se utiliza en este documento, el término "quincenal" se refiere a una frecuencia de cada 13-15 días, el término "mensual" se refiere una frecuencia de cada 28-31 días y "bimensual" se refiere una frecuencia de cada 58-62 días.

[00116] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la superficie de un dispositivo en la vivienda está recubierta por una solución, tal como a través de baño o pulverización, que contiene una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 500 mg/ml del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) descritos en este documento. En implementaciones particulares, los rangos más específicos de las concentraciones del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones específicas del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 750 µg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 600 mg/ml, aproximadamente 750 mg/ml, y aproximadamente 900 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones citadas anteriormente y en toda la especificación son concentraciones locales (e.g, en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF para ser administrados. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe

administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto está dentro de las capacidades de un versado en el arte.

[00117] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la concentración del al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias.

[00118] En otras formas de implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato es de al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias. En una implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato es de aproximadamente 5 mM-25 mM,

entre 10 mM-20 mM, entre 10 mM-15 mM, o entre 15 mM-20 mM. En algunas implementaciones, la concentración de fumarato es 15 mM.

[00119] Cuando se aplica un dispositivo médico interno, la superficie puede estar recubierta por la solución que contiene un antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) antes de su inserción en el cuerpo.

[00120] En algunas implementaciones de los métodos descritos en el presente documento, un sujeto se refiere a un sujeto humano que tiene una infección crónica o en mayor riesgo de una infección crónica o la formación de biopelícula. Un sujeto que tiene una infección crónica es un sujeto que tiene células bacterianas objetivamente medibles presentes en el cuerpo del sujeto. Un sujeto que tiene aumentado el riesgo de una infección crónica incluye sujetos con un dispositivo médico interno, por ejemplo, o un sujeto que tiene o ha tenido una intervención quirúrgica.

[00121] En algunas implementaciones de los aspectos descritos en este documento, los métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una infección crónica o está en mayor riesgo de una infección crónica, comprende además la etapa de seleccionar, diagnosticar, o identificar el sujeto que tiene o que está en alto riesgo de infección crónica o la formación de biopelícula. En tales implementaciones, un sujeto se identifica por tener una infección crónica por determinación objetiva de la presencia de las células bacterianas en el cuerpo del sujeto por un versado en el arte. Tales determinaciones objetivas se pueden realizar a través de un solo uso o un uso combinado de análisis de tejido, análisis de sangre, análisis de orina, y cultivos de células bacterianas, además del

monitoreo de los síntomas específicos asociados con una infección crónica o la formación de biopelícula.

[00122] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica es un sujeto inmunosuprimido, tal como, por ejemplo, los pacientes VIH-positivos, que han desarrollado o están en riesgo de desarrollar neumonía bien sea por una infección oportunista o por la reactivación de una infección latente o suprimida; sujetos con fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y otras tales como pacientes inmunosuprimido y/o en instituciones.

[00123] Como se usa en este documento, "infecciones persistentes" se refiere a aquellas infecciones que, a diferencia de las infecciones agudas, no se eliminan efectivamente por una respuesta inmune del huésped o mediante la administración de antibióticos. Las infecciones persistentes incluyen, por ejemplo, infecciones latentes, crónicas y lentas. En una "infección crónica", el agente infeccioso está presente en el sujeto en todo momento. Sin embargo, los signos y síntomas de la enfermedad pueden estar presentes o ausentes durante un período prolongado de tiempo, y el agente infeccioso puede tener detectabilidad intermitente. Los ejemplos no limitantes de la infección crónica incluyen una variedad de infecciones bacterianas, como se describe a continuación en este documento, así como las infecciones bacterianas secundarias resultantes de o causadas por la infección con otro agente que suprime o debilita el sistema inmune o que deteriore la eliminación del moco o secreciones del huésped, tales como infecciones virales predisponentes agudas o crónicas, tal como, por ejemplo, hepatitis B (causada por virus de la hepatitis B (HBV)) y la hepatitis C (causadas por el virus de la hepatitis C (HCV) adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus 1 del herpes simple, virus 2 del herpes simple, virus 6 del herpes

humano, virus influeuza, virus parainflueuza, virus sincitial respiratorio, virus de la varicela-zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis D, virus de papiloma, parvovirus B 19, poliomavirus BK, virus de polioma JC, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus I de la leucemia de células T humanas, y Virus II de la leucemia de las células T humanas, así como las infecciones bacterianas secundarias resultantes de o causadas por infección con una infección parasitaria persistente, tal como, por ejemplo, Leishmania, Toxoplasma, Tripanosoma, Plasmodium, Schistosoma y encefalitozoon.

[00124] Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, micobacterias MSF (tal como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*, *M. chelonae*. y *M. abscessus*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A estreptococos), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B estreptococo), *Streptococcus viridans* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus anaeróbicas* (*anaeróbicas* sp.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter patogénica* sp., *Enterococcus* sp. (Como, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *moniliformis Streptobacillus*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Actinomyces israeli*, *Lactobacillus* spp.; *Nocardia* spp.; *Rhodococcus equi* (cocobacilos); *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Actinomyces* spp.; *Clostridium botulinum*; *Clostridium difficile*; *Mobiluncus* spp, *Peptostreptococcus* spp; *Moraxella catarrhalis*; *veillonellas*;

Actinobacillus actinomycetemcomitans; Acinetobacter baumannii; Bordetella pertussis; Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica, Brucella spp.; Campylobacter spp.; Capnocytophaga spp.; Cardiobacterium hominis; Eikenella corrodens; Francisella tularensis; Haemophilus ducreyi; Kingella kingae; Klebsiella granuloma; Citrobacter spp., Enterobacter spp.; Escherichia coli; Proteus spp.; Salmonella enteritidis; Salmonella typhi; Shigella spp.; Serratia marcescens; Yersinia enterocolitica; Yersinia pestis; Aeromonas spp.; Plesiomonas shigelloides; Vibrio cholerae; Vibrio parahaemolyticus; Vibrio vulnificus; Acinetobacter spp.; Flavobacterium spp.; Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas putida; Pseudomonas syringae; Pseudomonas fluorescens; Achromobacter xylosoxidans o Alcaligenes xylosoxidans; Burkholderia cepacia compleja, tal como Burkholderia pseudomallei, Burkholderia cepacia, B. multivorans, B. cenocepacia. B. vietnamiensis. B. dolosa; Xanthomonas maltophilia o Stenotrophomonas maltophilia; Bacteroides fragilis; Bacteroides spp.; Prevotella spp.; Fusobacterium spp.; Spirillum minus; Borrelia burgdorferi; Borrelia recurrentis; Bartonella henselae; Chlamydia trachomatis; Chlamydophila pneumoniae; Chlamydophila psittaci; Coxiella burnetii; Ehrlichia chaffeensis; Anaplasma phagocytophilum; Legionella spp.; Leptospira spp.; Rickettsia rickettsii; Orientia tsutsugamushi; y Chromobacterium violaceum, las infecciones micobacterianas que se pueden tratar utilizando los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las causadas por: M. abscessus. M. africanum. M. asiaticum, Mycobacterium avium complex (MAC), M. avium paratuberculosis, M. abscessus, M. bovis. M. chelonae, M. Fortuitum, M. gordonae. M. haemophilum. M. intracellulare. M. kansasii, M. lentiflavum, M. leprae, M. liflandii, M. malmoeense. M. marinum, M. microti, M. pH lei. M. pseudoshottsii. M. scrofulaceum, M. shottsii, M. esmegma tis. M. triplex, M. tuberculosis, M. ulcerans, M. uvium, y M. xenopi.

[00125] Las composiciones y métodos descritos en este documento que comprenden antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF se contemplan para uso en el tratamiento de las infecciones crónicas con estas especies bacterianas. Otros organismos infecciosos (tal como protistas) incluyen: *Plasmodium Falciparum* y *Toxoplasma gondii*. Las composiciones y métodos descritos en este documento comprenden antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF que también se contemplan para uso en el tratamiento de infecciones con estas especies.

[00126] los Ejemplos de trastornos/enfermedades causadas por infecciones bacterianas incluyen pero no se limitan a, la neumonía, incluyendo neumonía recurrente, bronquitis, incluyendo crónica o bronquitis recurrente, meningitis bacteriana, el cólera, la difteria, la tuberculosis, el ántrax, el botulismo, la brucelosis, la campilobacteriosis, el tifus, infecciones del oído, incluyendo infecciones recurrentes del oído, la gonorrea, la listeriosis, enfermedad de Lyme, la fiebre reumática, la tos ferina (tos ferina), la peste, salmonellosis, escarlatina, shigelosis, sinusitis, incluyendo sinusitis crónica, la sífilis, el tétanos, el tracoma, tularemia, fiebre tifoidea y las infecciones del tracto urinario, incluyendo infecciones crónicas del tracto urinario.

[00127] En consecuencia, en diversas implementaciones de los métodos y composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido usado se determina con base en la naturaleza de la infección bacteriana o infección crónica del sujeto.

[00128] Por ejemplo, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, si la infección crónica es: endocarditis infecciosa causada por *Enterococcus* cuando el organismo no es

sensible a la gentamicina; tuberculosis en combinación con otros medicamentos contra la tuberculosis; y la peste (*Yersinia pestis*), el antibiótico aminoglucósido administrado es la estreptomicina.

[00129] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, cuando la infección bacteriana es un organismo Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, y cuando la infección bacteriana es Gram-positiva las especies de *Staphylococcus*, *Yersinia pestis*, sus parientes, y *Francisella tularensis*. En algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, cuando la infección crónica se está tratando o previniendo, por ejemplo, bacteriemia, endocarditis bacteriana, brucelosis, infecciones asociadas con quemaduras externas, infecciones asociadas con la fibrosis quística, endocarditis, infecciones de las válvulas protésicas debidas a *S viridans* y *S bovis*, infecciones de las válvulas nativas debido a los estafilococos, infecciones de la valvula para prótesis por estafilococos, válvula nativa o infecciones de la valvula protética, debidas a los enterococos resistentes a la penicilina, infecciones asociadas con la endometritis, infecciones asociadas con neutropenia febril, infecciones intraabdominales, meningitis, infecciones asociadas con la osteomielitis, infecciones asociadas a la enfermedad inflamatoria pélvica, infecciones asociadas con peritonitis, infecciones asociadas con la peste, las infecciones asociadas con la neumonía, infecciones asociadas con pielonefritis, infecciones asociadas con la piel o tejidos blandos, infecciones asociadas con la cirugía, y las infecciones asociadas con la tularemia.

[00130] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido tobramicina, cuando la

infección bacteriana es por un microorganismo aerobio y facultativos Gram-positivas, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*; o un microorganismo aeróbico y facultativo Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp.*, y *Serratia sp.* En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósidos es tobramicina, cuando la infección crónica que se está tratando o previniendo es, por ejemplo, bacteriemia, infecciones asociadas con quemaduras externas, infecciones asociadas con la fibrosis quística, endocarditis, infecciones asociadas con neutropenia febril, infecciones intraabdominales, meningitis, infecciones asociadas con la osteomielitis, infecciones asociadas con peritonitis, infecciones asociadas con la neumonía, infecciones asociadas con pielonefritis, sepsis, infecciones derivadas, infecciones asociadas con la piel o tejidos blandos, e infecciones asociadas con la tularemia.

[00131] En algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es Sisomicina (BACTOCEAZE o ENSAMYCIN), cuando la infección bacteriana es causada por una bacteria Gram-positivos, o *Pseudomonas aeruginosa*.

[00132] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminogluosido es arbekacina, cuando la infección crónica es causada por bacterias multi-resistentes, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina* (MRSA), así como las bacterias entéricas y otras eubacterias.

[00133] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es amikacina, cuando la infección crónica es causada por bacterias Gram-negativas resistentes a fármacos múltiples, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*, así como, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Providencia stuartii*, y las infecciones por micobacterias no tuberculosas y la tuberculosis, cuando los fármacos de primera línea no pueden controlar la infección.

[00134] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina, cuando la infección es causada por una bacteria Gram-negativa, y, en algunas implementaciones, una bacteria Gram-positivas.

[00135] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es frameticina, cuando la infección es en piel, nariz, oreja, y/o infección ocular.

[00136] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es paromomicina, cuando la infección es una infección intestinal, tal como, por ejemplo, la criptosporidiosis, la amebiasis, y leishmaniasis.

[00137] En una implementación, la infección es causada por una bacteria *Pseudomonas* en un sujeto que tiene fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o bronquiectasia.

[00138] Los métodos y composiciones descritos en este documento se contemplan específicamente para el tratamiento agudo de la neumonía asociada a ventilación mecánica en pacientes en cuidados intensivos y para el tratamiento agudo de pacientes quemados.

[00139] También se proporciona en este documento, en algunos aspectos, métodos para inhibir o retrasar la formación de biopelículas, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, o poner en contacto una superficie con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Se contemplan específicamente en este documento los métodos para inhibir o retrasar la formación de biopelículas en dispositivos vasculares, prótesis óseas y otras infecciones relacionadas con dispositivos médicos internos.

[00140] Como se usa en este documento, una "biopelícula" se refiere a la masa de microorganismos adheridos a una superficie, tal como una superficie de un dispositivo médico, y las sustancias extracelulares asociados producidas por uno o más de los microorganismos unidos. Las sustancias extracelulares son sustancias típicamente poliméricas que comúnmente incluyen una matriz de polisacáridos complejos, sustancias proteínicas y glicopéptidos. Los microorganismos pueden incluir, pero no se limitan a, bacterias, hongos y protozoos. En una "biopelícula bacteriana", los microorganismos incluyen una o más especies de bacterias. La naturaleza de una biopelícula, tal como su estructura y composición, puede depender de la especie particular de bacterias presentes en la biopelícula. Las bacterias presentes en una biopelícula a menudo son fenotípica, fisiológica, o metabólicamente diferentes que las bacterias que no están en una biopelícula, tal como bacterias aisladas o bacterias en colonias de suspensión planctónicas. Las

"biopelículas" polimicrobianas son películas que incluyen más de una especie bacteriana.

[00141] Tal como se usa en este documento, los términos y las frases "retrasan", "retardo de la formación", y "que retrasan la formación de" tienen sus significados usuales y comunes, y generalmente se dirigen a aumentar el período de tiempo antes de la formación de biopelículas, o una infección bacteriana de crecimiento lento en un sujeto o en una superficie. El retraso puede ser, por ejemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días o más. La inhibición de la formación de una biopelícula, como se usa en este documento, se refiere a evitar el desarrollo parcial o total o la progresión de una biopelícula, por ejemplo, sobre una superficie, tal como una superficie de un dispositivo médico interno.

[00142] El versado en el arte entenderá que los métodos para inhibir y retrasar la formación de biopelículas se pueden practicar para cualquier bacteria que se pueda encontrar, tal como una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento se pueden practicar en la superficie de o en el interior de un animal, tal como un humano; sobre una superficie inerte, tal como un contador o un banco superior; sobre una superficie de una pieza de equipo médico o de laboratorio; sobre una superficie de una herramienta médica o de laboratorio; o en un dispositivo médico interno.

[00143] En algunos aspectos, de la presente se proporcionan métodos para inhibir la formación de una biopelícula sobre una superficie o en un material poroso, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie o un material poroso sobre el cual se puede formar una biopelícula, un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para inhibir la formación de una biopelícula. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie inerte, tal como la superficie de un dispositivo médico interno.

[00144] En algunos aspectos, en el presente se proporcionan métodos para retrasar la formación de una biopelícula sobre una superficie o en un material poroso, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie o un material poroso sobre el cual se puede formar una biopelícula, un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para retrasar la formación de una biopelícula. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie inerte, tal como la superficie de un dispositivo médico interno.

[00145] En algunos aspectos, en el presente se proporcionan métodos para prevenir la colonización de una superficie por bacterias persistentes, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie con un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para prevenir la colonización de la superficie por las bacterias persistentes.

[00146] En las implementaciones de los métodos descritos en este documento dirigidos a inhibir o retrasar la formación de una biopelícula, o prevenir la colonización de una superficie por bacterias persistentes, el material que comprende la superficie o el material poroso puede ser cualquier material que se puede utilizar para formar una superficie o un material poroso. En algunas de tales implementaciones, el material se selecciona de: polietileno, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliestireno, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poli (metil metacrilato), poliamida, poliéster, poliuretano, policarbonato, silicona, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico, polietileno tereftalato, cobalto, una aleación a base de cobalto, titanio, una aleación a base de titanio, acero, plata, oro, plomo, aluminio, sílice, alúmina, policristal de zirconio itrio estabilizado, fosfato de calcio, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, carbono, algodón, lana y de papel.

[00147] En las implementaciones de los métodos descritos en este documento para inhibir o retrasar la formación de una biopelícula, o la prevención de la colonización de una superficie por bacterias persistentes, se puede aplicar un segundo antibiótico simultáneamente con el antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. El segundo antibiótico adecuado incluye, por ejemplo, linezolida, dapromicina, aminoglucósidos (e.g., tobramicina, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β -lactamas (e.g., penicilinas, carbapenemas, monobactamas, y cefalosporinas), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g., eritromicina), lincosamidas (e.g., clindamicina), cloranfenicoles, tetraciclinas, anfotericinas, cefazolin, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos.

[00148] En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la bacteria persistente en fase estacionaria, de

crecimiento lento o biopelícula es cualquier especie bacteriana o población que comprende células persistentes, pueden existir en un crecimiento lento o en fase estacionaria, y/o pueden formar una biopelícula, En algunas de tales implementaciones, la bacteria es *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, o *enterococos* susceptible a la vancomicina, un *enterococos* resistentes a la vancomicina, una especie de *Staphylococcus* o una especie *Streptococcus*. En algunas de tales implementaciones, la bacteria se selecciona de *Enterococcus faecalis* (VSE) susceptible a la vancomicina (VAN), *FE. Faecalis* (VRE) VAN-resistente, y estaf *epidermidis*.

[00149] Tal como se utiliza en este documento, el término "poner en contacto" significa que se refiere en términos generales a poner una célula bacteriana y un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en proximidad suficiente para que el antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF puedan ejercer sus efectos en cualquier célula bacteriana presente. El versado en el arte entenderá que el término "Poner en contacto" incluye interacción física entre un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF y una célula bacteriana, así como las interacciones que no requieren la interacción física.

[00150] Los métodos descritos en este documento abarcan además superficies recubiertas por un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos estimulantes PMF, y/o impregnado con un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. Tales superficies incluyen cualquiera que pueda entrar en contacto con una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula. En algunas de tales implementaciones, tales superficies incluyen cualquier superficie hecha de un material inerte (aunque las superficies de los animales vivos se incluyen dentro del alcance de los métodos

descritos en este documento), incluyendo la superficie de un mostrador o mesa de trabajo, la pieza de una superficie de equipos médicos o de laboratorio o una herramienta, el dispositivo médico de una superficie tal como un respirador, y la superficie de un dispositivo médico interno. En algunas de tales formas de implementación, tales superficies incluyen las de un dispositivo médico interno, tal como implantes quirúrgicos, dispositivos ortopédicos, prótesis y catéteres, i.e., dispositivos que se introducen en el cuerpo de un individuo y permanecen en la posición durante un tiempo prolongado. Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, articulaciones artificiales, corazones artificiales e implantes; válvulas, tal como válvulas cardíacas; marcapasos; injertos vasculares; catéteres, tal como catéteres vasculares, urinarios y de diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD); derivaciones, tal como derivaciones de líquido cefalorraquídeo; mangueras y tubos, tal como tubos de traqueotomía; placas; pernos; válvulas; parches; cierres de heridas, incluyendo suturas y grapas; apósitos; y cemento óseo.

[00151] En el presente documento, el término "dispositivo médico interno", se refiere a cualquier dispositivo para uso en el cuerpo de un sujeto, tal como catéteres intravasculares (por ejemplo, intravenosos e intra-arteriales), catéteres de flujo dirigido directo al corazón, catéteres de Hickman, fistulas arteriovenosas, catéteres utilizados en la hemodiálisis y la diálisis peritoneal (por ejemplo, Silastica, venosa central, catéteres Tenckhoff, y catéteres de teflón), puertos de acceso vasculares, catéteres permanentes urinarios, catéteres urinarios, catéteres de silicona, catéteres ventriculares, prótesis vasculares sintéticas (por ejemplo, aortofemoral y femoropoplítea), prótesis valvulares cardíacas, prótesis articulares, implantes ortopédicos, implantes de pene, derivaciones (por ejemplo, Scribner, Torkildsen, sistema nervioso central, portasistemicas, ventricular, ventrículo-peritoneal), dispositivos intrauterinos, buffers, implantes dentales,

prótesis (por ejemplo, stents ureteral), prótesis de voz artificiales, tubos timpanostomía, tubos de alimentación gástrica, tubos endotraqueales, marcapasos, desfibriladores implantables, tubos, cánulas, sondas, dispositivos de monitorización de sangre, agujas, y similares. Una subcategoría de dispositivos médicos permanentes se refiere a dispositivos de implantables que están típicamente más profundos y/o introducidos en el cuerpo de forma permanente. Los dispositivos médicos permanentes pueden introducirse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por implantación percutánea, intravascular, intrauretral, intraorbital, intratraqueal, intraesofágica, estomal, u otra ruta, o por implantación quirúrgica, por ejemplo, la colocación intra-articular de una articulación protésica.

[00152] De acuerdo con algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, el dispositivo médico interno se reviste por una solución, tal como a través de baño o pulverización, que contiene una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 500 mg/ml de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. En algunas formas de implementación, los rangos más específicos de las concentraciones del antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones específicas de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 750 µg/ml, aproximadamente 1

mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 600 mg/ml, aproximadamente 750 mg/ml, y aproximadamente 900 mg/ml. El dispositivo médico interno se puede recubrir por la solución que comprende un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF antes de su inserción en el cuerpo.

Dosificación y Modos De Administración

[00153] Una ventaja clave de los métodos, usos y composiciones que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, es la capacidad de producir marcados efectos anti-bacterianos en un sujeto humano que tiene una infección crónica sin causar efectos tóxicos significativos o efectos adversos. Mediante la adición de compuestos que estimulan la PMF a un régimen terapéutico o método, la dosis del antibiótico aminoglucósido que se administra puede, en algunas implementaciones, reducirse en relación con las dosis administradas normalmente. Se contempla además en este documento que la adición de un compuesto que estimula la PMF a un régimen de antibióticos permitirá el uso de un antibiótico al que la bacteria fue previamente resistente mediante la restauración de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos. La eficacia de los tratamientos y métodos descritos en el presente documento se puede medir por varios parámetros usados comúnmente en la evaluación del tratamiento de infecciones, incluyendo, pero no limitado a, la reducción en la tasa de crecimiento bacteriano, la presencia o número de células bacterianas en una muestra obtenida

de un sujeto, la tasa global de respuesta, duración de la respuesta, y la calidad de vida.

[00154] Por consiguiente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" de un antibiótico aminoglucósido o uno o más compuestos que estimulan la PMF, que será administrado a un sujeto que se rige por diversas consideraciones, y, tal como se usa en este documento, se refiere a la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar o estabilizar, un trastorno o afección, como la infección crónica. Una cantidad efectiva tal como se usa en este documento también incluye una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de un síntoma de una infección crónica, alterar el curso de una infección crónica (por ejemplo, pero no limitado a, retrasar la progresión de un síntoma de la infección crónica, tal como el crecimiento de la población bacteriana causante de la infección crónica), o revertir un síntoma de la infección crónica. Por lo tanto, no es posible especificar la "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad efectiva" apropiada se puede determinar por un versado en el arte usando solamente experimentación de rutina.

[00155] Las cantidades eficaces, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los antibióticos aminoglucósidos o uno o más compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, e.g., para la determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren las composiciones y métodos que muestran grandes índices terapéuticos. Una dosis

terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. También, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un rango de concentración en el plasma circulante que incluye la IC₅₀ (i.e., la concentración de antibióticos aminoglucósidos o uno o más compuestos que estimulan la PMF), que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorizar mediante un bioensayo adecuado. La dosis se puede determinar por un médico y ajustar, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento.

[00156] Dependiendo del tipo y gravedad de la infección, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (e.g, 0,1 a 20 mg/kg) de un antibiótico aminoglucósido, tal como tobramicina, o compuesto que estimula la PMF, tal como fumarato, está en un rango de dosificación candidata inicial para la administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que la infección se trata o se desaparece, medida por los métodos descritos anteriormente o conocidos en el arte. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En una implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato está entre 5 mM-25 mM, entre 10 mM-20 mM, entre 10 mM-5 mM, o entre 15 mM-20 mM. En algunas implementaciones, la concentración de fumarato es 15 mM. El progreso de los métodos terapéuticos descritos en este documento se monitoriza fácilmente mediante técnicas y

ensayos convencionales, tal como los descritos en este documento, o conocido para un versado en el arte. En algunas implementaciones, las concentraciones de fumarato citados a lo largo del documento descriptivo son concentraciones locales (e.g, en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF para ser administrados. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto está bien dentro de las capacidades de un versado en el arte.

[00157] Por ejemplo, la gentamicina puede ser altamente nefrotóxica, particularmente si se acumulan múltiples dosis durante el curso de un tratamiento. Por esta razón la gentamicina se puede dosificar por el peso corporal. Existen varias fórmulas para el cálculo de la dosis de gentamicina, y son conocidos por los versados en el arte. Cuando se utiliza gentamicina en los métodos descritos en este documento se deben tener en cuenta un número de factores y determinantes.

[00158] En algunas implementaciones, cuando la neomicina es el antibiótico aminoglucósido, las formas de dosificación disponibles incluyen 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, y 150 mg/1,5 ml.

[00159] La duración de los procedimientos terapéuticos descritos en este documento puede continuar durante tanto tiempo como sea médicamente indicado o hasta que se consigue un efecto terapéutico deseado (e.g, los descritos en este documento). En ciertas implementaciones, la administración de una combinación de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se continúa durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 10 meses, al menos 1 año, al

menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 10 años, al menos 20 años, o al menos durante un período de años hasta el tiempo de vida del sujeto. En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la administración se continúa durante el tiempo que un dispositivo interno está presente en el sujeto.

[00160] Los antibióticos aminoglucósidos y compuesto que estimula la fuerza protón-motriz PMF descritos en este documento, se pueden administrar, de forma individual, pero al mismo tiempo, en algunas implementaciones, o, en otras formas de implementación, de forma simultánea, por ejemplo en una única formulación que comprende tanto un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuesto que estimula la PMF, a un sujeto, e.g., un sujeto humano, de acuerdo con métodos conocidos, tal como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o vías de inhalación. Los modos ejemplares de administración de los antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF, incluyen, pero no se limitan a, inyección, infusión, inhalación (e.g, intranasal o intratraqueal), ingestión, rectal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual). La administración local se puede utilizar si, por ejemplo, los efectos colaterales considerables o la toxicidad están asociados con el antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, y para, por ejemplo, permitir una alta concentración localizada de los compuestos que estimulan la PMF en el sitio de infección. También se puede utilizar una estrategia ex vivo para aplicaciones terapéuticas. En consecuencia, cualquier modo de administración que entregue los antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF sistémicamente o a una superficie o de destino deseados, puede incluir, pero no se limita a, la administración por inyección, infusión, instilación, e inhalación, la "inyección" incluye, sin limitación, intravenosa,

intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal, y la inyección intraesternal e infusión. Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se usa en este documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección. Las frases "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usa en este documento se refieren a la administración de un antibiótico aminoglucósido y compuestos estimulantes de la PMF distintos de directamente en un sitio blanco, el tejido, u órgano, tal como el pulmón, de tal manera que entra en el sistema circulatorio del sujeto y, por lo tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

[00161] El antibiótico aminoglucósido que se utiliza para tratar una infección o inhibir la formación de biopelículas en un sujeto puede determinar el modo de administración a utilizar. Por ejemplo, la mayoría de los antibióticos aminoglucósidos no se absorben bien a través del intestino y el tracto GI, y por lo tanto la administración oral no es efectiva.

[00162] En consecuencia, en algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, la administración es mediante inyección intramuscular o intravenosa. En algunas de tales implementaciones, la administración no es a través de la vía oral.

[00163] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, la

administración es mediante administración intravenosa, administración intramuscular, o administración tópica para tratar las infecciones. En algunas de tales implementaciones, la administración no es a través de la vía oral.

[00164] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es kanamicina A, la administración es por vía oral, intravenosa, e intramuscular.

[00165] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es tobramicina, la administración es mediante administración parenteral, incluyendo, por ejemplo, inyección intramuscular e intravenosa. La tobramicina se puede detectar en tejidos y fluidos corporales después de la administración parenteral.

[00166] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es netilmicina, la administración es por inyección o infusión.

[00167] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es arbekacina, la administración es mediante administración parenteral, tal como administración intramuscular o intravenosa. La duración normal de la terapia con el antibiótico aminoglucósido arbekacina IM o IV es 7-10 días, aunque en algunos casos puede ser necesaria una mayor duración.

[00168] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es la amicacina, la administración es por vía intravenosa o intramuscular. Actualmente no existe una forma oral disponible como amikacina puesto que no se absorbe por vía oral. En algunas implementaciones, se puede utilizar la amikacina liposomal por inhalación para el tratamiento de enfermedades respiratorias, tal

como, por ejemplo, fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa*, infecciones por micobacterias no tuberculosas, y bronquiectasis. Los efectos secundarios de la amikacina son similares a los de otros aminoglucósidos, el daño renal y la pérdida de la audición son los efectos más importantes. Debido a este potencial, se pueden monitorear los niveles en sangre del fármaco y los marcadores de la función renal (creatinina). Por otra parte, las dosis de amikacina pueden ajustarse específicamente con base en la depuración de creatinina en suero en los entornos clínicos.

[00169] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es la neomicina, se utiliza la administración tópica o la administración oral. En implementaciones preferidas, la neomicina no se administra por vía intravenosa, puesto que la neomicina es extremadamente nefrotóxica. En estas implementaciones, donde la neomicina se administra por vía intravenosa, la dosis es menor que 0.025 mg por dosis.

[00170] En algunas formas de implementación, cuando el antibiótico aminoglucósido es framisetina, se utiliza la administración tópica o administración oral. La framisetina tiene una pobre absorción sistémica, y se puede utilizar en las preparaciones tópicas para las infecciones de la piel, la nariz, los oídos y los ojos, a menudo en combinación con otros fármacos antibacterianos y corticosteroides. También se puede utilizar para las infecciones gastrointestinales, en algunas implementaciones.

[00171] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es paromomicina, la administración es mediante inyección intramuscular o administración oral.

Formulaciones farmacéuticas

[00172] Las formulaciones terapéuticas de los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden preparar, en algunos aspectos, mezclando un antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas, ya sea individualmente en algunas implementaciones, o en combinación, por ejemplo, una formulación terapéutica que comprende solo una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva del compuesto de estimulación de al menos un PMF. Tales formulaciones terapéuticas de los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento incluyen la formulación en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral, e.g., por vía intravenosa; mucosal, e.g., intranasal; enteral, e.g., oral; tópica, e.g., transdérmica; ocular, u otro modo de administración.

[00173] Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, formas materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un material aceptable farmacéuticamente, composición o vehículo, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente, medios, materiales de encapsulado, ayudas de fabricación (e.g, lubricante, talco magnesio, calcio o

estearato de zinc, o ácido esteárico), o material de encapsulación solvente, que participan en el mantenimiento de la actividad de, llevar, transportar los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF, desde un órgano, o una parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo.

[00174] Algunos ejemplos no limitativos de los vehículos aceptables, excipientes o estabilizantes que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, incluyen soluciones buffer de pH tal como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio, lauril sulfato sódico y talco; excipientes, tal como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina, HDL, LDL, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo manosa, almidones (almidón de maíz o almidón de patata), o dextrinas; celulosa y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, glucosa, lactosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tal como sal de sodio; complejos metálicos (e.g complejos de Zn-proteína); glicoles, tal como propilenglicol; polioles, tal como glicerina; ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes buffer,

tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; alcoholes C2-C12, tal como etanol; tragacanto en polvo; malta; y/o agentes tensioactivos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONIC™ o polietilenglicol (PEG); y u otras sustancias compatibles no tóxicas/empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación los agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes en la formulación.

[00175] En algunas implementaciones, las formulaciones terapéuticas o composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF comprende una sal farmacéuticamente aceptable, por lo general, e.g., cloruro de sodio, y preferiblemente a aproximadamente concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones descritas en este documento pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la concentración del conservante oscila de 0,1 a 2,0%, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las técnicas farmacéuticas. El alcohol bencílico, fenol, metacresol, metilparabeno, y propilparabeno son ejemplos de conservantes. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable en una concentración de 0,005 hasta 0,02%.

[00176] En algunas implementaciones de los aspectos descritos en este documento, un antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF, puede ser especialmente formulado para la administración del compuesto a un sujeto en forma sólida, líquida o en forma de gel, incluyendo las adaptadas para lo

siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (2) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o spray aplicado a la piel; (3) administración oral, por ejemplo, pócimas (soluciones acuosas o no acuosas o suspensiones), pastillas, grageas, cápsulas, píldoras, tabletas (e.g, los destinados para la administración bucal, sublingual, y la absorción sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua; (4) intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) sub lingual; (6) ocularmente; (7) transdérmicamente; (8) transmucosa; o (9) por vía nasal. Además, un antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF se pueden implantar en un paciente o se inyecta mediante un sistema de administración de fármacos. Ver, por ejemplo, Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of pesticides and pharmaceutical" (Plenum Press, Nueva York, 1981); Patente U.S. Nº. 3,773,919; y la patente U.S. No. 35 3.270.960. Ejemplos de formas de dosificación incluyen, pero no son limitan a: tabletas, comprimidos oblongos; cápsulas, tal como cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda elástica; sellos; trociscos, pastillas, dispersiones, supositorios, ungüentos, cataplasmas (emplastos), pastas, polvos, apósitos, cremas, emplastos, soluciones, parches, aerosoles (e.g, aerosoles nasales o inhaladores); geles; líquidos tal como suspensiones (e.g, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua o emulsiones líquidas agua en aceite), soluciones, y elixires; y sólidos estériles (e.g, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas.

[00177] En algunas implementaciones, las formas de dosificación parenteral de las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o Compuesto

que estimula la PMF, se puede administrar a un sujeto con una infección crónica o en riesgo de infección crónica por diversas vías, incluyendo, pero no limitado a, subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección en bolo), intramuscular e intra-arterial. Puesto que la administración de formas de dosificación parenterales típicamente sobrepasa las defensas naturales del paciente contra los contaminantes, las formas farmacéuticas parenterales son preferiblemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, formas de dosificación parenteral de liberación controlada, y emulsiones.

[00178] Los vehículos adecuados que se pueden utilizar para proporcionar formas de dosificación parenterales descritas en este documento son bien conocidas por los versados en el arte. Es entendido por un versado en el arte, que las concentraciones mucho más altas de los compuestos que estimulan la PMF, como la glucosa, se deben proporcionar en cualquier formulación terapéutica, que se encuentra normalmente cuando el compuesto está presente como parte de un vehículo en una forma de dosificación. Los ejemplos de tales vehículos incluyen, sin limitación: agua estéril; agua USP para inyección; solución salina; solución de glucosa; vehículos acuosos tal como, pero no limitado a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio inyectable, y la inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles en agua tal como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol; y vehículos no acuosos tal como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

[00179] Las formas de dosificación tópica de los antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF, también se proporcionan en algunas implementaciones, e incluyen, pero no se limitan a, cremas, lociones, ungüentos, geles, champús, pulverizadores, aerosoles, soluciones, emulsiones y otras formas conocidas para un versado en el arte. Ver, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18a edición, Mack Publishing, Easton, Pa (1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª ed., Lea & Febiger, Filadelfia, Pa. (1985). Típicamente se emplean formas de dosificación tópicas no pulverizables, viscosas hasta formas semi-sólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tiene una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y similares, que son, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (e.g, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, buffers, o sales) para influir en diversas propiedades, tal como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (e.g, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco. Las cremas hidratantes o humectantes también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en el arte. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.sup.th Ed., Mack Publishing, Easton, Pa, (1990), e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª ed., Lea & Febiger, Filadelfia, Pa. (1985). Las formas de dosificación adecuadas para tratar los tejidos de la mucosa dentro de la cavidad oral pueden formularse como enjuagues bucales, o como geles orales, o

como parches bucales, las formas de dosificación transdérmica adicionales incluyen parches "tipo depósito" o "tipo matriz", que se pueden aplicar a la piel y dejado por un periodo de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de ingrediente activo.

[00180] Los ejemplos de formas de dosificación transdérmicas y métodos de administración que se pueden utilizar para administrar un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF, incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes U.S. Nos.: 4.624.665; 4.655.767; 4.687.481; 4.797.284; 4.810.499; 4.834.978; 4.877.618; 4.880.633; 4.917.895; 4.927.687; 4.956.171; 5.035.894; 5.091.186; 5.163.899; 5.232.702; 5.234.690; 5.273.755; 5.273.756; 5.308.625; 5.356.632; 5.358.715; 5.372.579; 5.421,816; 5.466,465; 5.494.680; 5.505.958; 5.554.381; 5.560.922; 5.585.111; 5.656.285; 5.667.798; 5.698.217; 5,741,511; 5.747.783; 5.770.219; 5.814.599; 5.817.332; 5.833.647; 5.879.322; y 5.906.830, cada una se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[00181] Los excipientes adecuados (e.g, vehículos y diluyentes) y otros materiales que se pueden utilizar para proporcionar formas de dosificación transdérmicas y de la mucosa de los antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF descritos en el presente documento son bien conocidos por los versados en las artes farmacéuticas, y dependerá del tejido u órgano particular al que se aplicará una composición o forma de dosificación farmacéutica dada. Además, dependiendo del tejido específico a tratar, los componentes adicionales se pueden utilizar antes de, conjuntamente con, o después del tratamiento con un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF. Por ejemplo, se pueden usar los mejoradores de la penetración para ayudar en la entrega de los ingredientes activos a o a través del tejido.

[00182] En algunas implementaciones, las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o Compuesto que estimula la PMF están formulados para ser adecuados para la administración oral, por ejemplo como formas de dosificación discretas, tal como, pero no limitado a, tabletas (incluyendo, sin limitaciones comprimidos ranurados o recubiertos), píldoras, comprimidos oblongos, cápsulas, comprimidos masticables, sobres con polvos, cachets, pastillas, obleas, aerosoles, o líquidos, tal como, pero no limitado a, jarabes, elixires, soluciones o suspensiones en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones contienen una cantidad predeterminada de la sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos, y se pueden preparar por métodos de farmacia bien conocidos por los versados en el arte. Ver, en general, Reminton's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1990).

[00183] Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas mas ventajosas de la unidad de dosificación solida oral, en cuyo caso se usan excipientes farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir por técnicas acuosas o no acuosas estándar. Estas formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación se preparan mezclando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego se da forma al producto en la presentación deseada si es necesario. En algunas implementaciones, las formas de dosificación oral no se utilizan para el antibiótico aminoglucósido.

[00184] Las formas típicas de dosificación oral de las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se preparan mediante la combinación de la sal farmacéuticamente aceptable del antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF, en una mezcla íntima con al menos un excipiente de acuerdo con técnicas de composición farmacéuticas convencionales, los excipientes puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la composición deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en formas de dosificación líquidas o en aerosol orales incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación oral sólidas (e.g, polvos, comprimidos, cápsulas, y comprimidos oblongos) incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, caolín, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes desintegrantes.

[00185] Los aglutinantes adecuados para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tal como acacia, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (e.g, etil celulosa, acetato de celulosa, calcio carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metil celulosa, almidon pre-gelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (e.g, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

[00186] Los ejemplos de rellenos adecuados para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, talco,

carbonato de calcio (e.g, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas descritas en este documento está presente típicamente en de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

[00187] Los desintegrantes se utilizan en las formulaciones farmacéuticas orales descritas en este documento para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen a un ambiente acuoso. Se debe utilizar una cantidad suficiente de desintegrante que no es ni muy poco ni demasiado para alterar perjudicialmente la liberación del ingrediente activo para formas solidas de dosificación oral de los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. La cantidad de desintegrante utilizado varía con base en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible por los versados en el arte. Los disgregantes que se pueden utilizar para formar formulaciones farmacéuticas orales incluyen, pero no se limitan a, agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato de almidón sódico, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

[00188] Los lubricantes que pueden utilizarse para formar formulaciones farmacéuticas orales del antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (e.g, aceite de cacahuete,

aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloide (AEROSIL® 200, fabricado por WR Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Piano, Tex.), CAB-O-SIL® (un producto de dióxido de silicio pirógeno vendido por Cabot Co. de Boston, Mass.), y mezclas de los mismos. Si se usa en todo, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en los que se incorporan.

[00189] En otras implementaciones, las formulaciones farmacéuticas libres de latosa y formas de dosificación son proporcionadas, en el que dichas composiciones contienen preferiblemente poca, si alguna, lactosa u otros mono- o di sacáridos. Tal como se utiliza en este documento, el término "libres de latosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si la hay, es insuficiente para aumentar sustancialmente la velocidad de degradación de un ingrediente activo. Las composiciones libres de lactosa de la descripción pueden comprender excipientes que son bien conocidos en el arte y se enumeran en la USP (XXI)/NF (XVI), que se incorporan aquí por referencia.

[00190] Las formulaciones orales de los antibióticos aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, abarcan además, en algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos como ingredientes activos en este documento, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (e.g, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un

medio de simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características tal como la vida de estantería o la estabilidad de las formaciones en el tiempo. Ver, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y., 1995). Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras descritas en este documento se pueden preparar usando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad o bajas condiciones de humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidros si se espera contacto sustancial con humedad y/o humedad durante la fabricación, embalaje, y/o almacenamiento. Las composiciones anhidras se envasan preferiblemente usando materiales conocidos para evitar la exposición al agua de tal manera que puedan ser incluidas en los kits de formulación adecuados. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, lamina selladas herméticamente, plásticos, envases de dosis unitaria (e.g, viales) con o sin desecantes, paquetes de ampollas y paquetes de tiras.

[00191] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, un antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF se pueden, administrar directamente a las vías respiratorias en forma de un aerosol o por nebulización. En consecuencia, para uso como aerosoles, en algunas implementaciones, un compuesto antibiótico aminoglucósido y/o y el compuesto que estimula la PMF, se puede envasar en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarburos como el propano, butano, o isobutano con adyuvantes convencionales. En otras formas de implementación, el antibiótico aminoglucósido y/ el compuesto que estimula la PMF se puede administrar en una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

[00192] El término "nebulización" es bien conocido en el arte para incluir la reducción de líquido a un aerosol fino. Preferiblemente, mediante tal nebulización se producen pequeñas gotas líquidas de tamaño uniforme a partir de un cuerpo más grande de líquido de una manera controlada. La nebulización se puede lograr por cualquier medio adecuado, incluyendo el uso de muchos nebulizadores conocidos y comercializados en la actualidad. Como es bien sabido, cualquier gas adecuado se puede usar para aplicar presión durante la nebulización, los gases preferidos son aquellos que son químicamente inertes frente a los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. Los gases de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, argón o helio.

[00193] En otras implementaciones, un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar directamente a las vías respiratorias en forma de un polvo seco. Para uso como un polvo seco, un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar mediante el uso de un inhalador. Los inhaladores de ejemplo incluyen inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo seco.

[00194] Las composiciones en polvo adecuadas incluyen, a modo de ilustración, preparaciones en polvo de un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF, bien mezclados con lactosa, u otros polvos inertes aceptables para, por ejemplo, la administración intrabronquial. Las composiciones en polvo se pueden administrar vía un dispensador de aerosol o encerradas en una cápsula rompible que puede ser insertada por el sujeto en un dispositivo que perfora la cápsula y sopla el polvo en una corriente estable adecuada para la inhalación. Las composiciones pueden incluir propelentes, agentes tensioactivos, y co-solventes y

se pueden llenar en recipientes de aerosol convencionales que se cierran mediante una válvula dosificadora adecuada.

[00195] Los aerosoles para la entrega al tracto respiratorio son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Adjei, A. y Garren, J. *Pharm. Res.*, 1: 565-569 (1990); Zanen, P. y Lamm, J.-W. *J. Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6: 273-313 (1990); Anderson et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989)) y tienen un potencial para la administración sistémica de péptidos y proteínas, así (Parten y Platz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8: 179-196 (1992)); Timsina et al., *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1995); y Tansey, I. P., *Spray Technol. Market*, 4: 26-29 (1994); French, D. L., Edwards, D. A. y Niven, R. W., *Aerosol Sci.*, 27: 769-783 (1996); Visser, J., *Powder Technology* 58: 1-10 (1989)); Rudt, S. y R. H. Muller, *J. Controlled Release*, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y. y Y. Ikada, *Biomed. Mater. Res.*, 22: 837-858 (1988); Wall, D. A., *Drug Delivery*, 2, 10 1-20 (1995); Patton, J. and Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8: 179-196 (1992); Bryon, P., *Adv. Drug. Del Rev.*, 5: 107-132 (1990); Patton, J. S., et al., *Controlled Release*, 28: 15 79-85 (1994); Damms, B. y Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996); Niven, R. W., et al., *Pharm. Res.*, 12(9): 1343-1349 (1995); y Kobayashi, S., et al, *Pharm, Res*, 13(1): 80-83 (1996), el contenido de todos los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[00196] En algunas implementaciones, los ingredientes activos de las formulaciones que comprenden antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de co-acervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcapsulas de

hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de entrega de fármacos (e.g, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[00197] En algunas implementaciones de estos aspectos, los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar a un sujeto por medio de liberación controlada o retardada. Idealmente, el uso de toda la preparación de liberación controlada diseñada óptimamente en el tratamiento médico se caracteriza por un mínimo de sustancia fármaco que se emplea para curar o controlar la condición en una cantidad mínima de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen: 1) ampliar la actividad del fármaco; 2) reducir la frecuencia de dosificación; 3) mayor cumplimiento del paciente; 4) uso menor de drogas totales; 5) reducir los efectos secundarios locales o sistémicos; 6) reducir al mínimo la acumulación del fármaco; 7) reducir las fluctuaciones del nivel de la sangre; 8) mejorar la eficacia del tratamiento; 9) reducir la potenciación o la pérdida de actividad del fármaco; y 10) mejorar la velocidad de control de las enfermedades o condiciones. (Kim, Cherng-ju, Controlled Release Dosage Form Design, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)). Las formulaciones de liberación controlada se pueden usar para controlar, por ejemplo, el comienzo de la acción del antibiótico aminoglucósido, la duración de la acción, los niveles plasmáticos dentro de la ventana terapéutica, y los niveles máximos en sangre. En particular, las formas de dosificación de liberación controlada o liberación prolongada o las formulaciones se pueden utilizar para garantizar que se consiga la eficacia máxima del antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, a la vez que minimiza los efectos adversos potenciales y problemas de seguridad, que pueden ocurrir tanto

por debajo de la dosificación de un fármaco (i.e., que va por debajo de los niveles terapéuticos mínimos), así como que exceda el nivel de toxicidad para el medicamento.

[00198] Se pueden adaptar una variedad de formas de dosificación controlada o prolongada conocidas, formulaciones o dispositivos para el uso con los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes U.S. Nos.: 3.845.770; 3,916,899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591,767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; 5.733.566; y 6.365.185 B1; cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en este documento por referencia. Estas formas de dosificación se pueden utilizar para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos (como OROS® (Alza Corporation, Mountain View, Calif. U.S.)), recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Además, se pueden usar los materiales de intercambio iónico para preparar formas de sal adsorbidas, inmovilizadas de los compuestos descritos y por lo tanto efectuar la entrega controlada del fármaco. Ejemplos de intercambiadores de aniones específicos incluyen, pero no se limitan a, DUOLITE® A568 y DUOLITE® AP143 (Rohm & Haas, Spring House, Pa. U.S.).

[00199] En algunas implementaciones de los aspectos, los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF para uso en las diversas formulaciones terapéuticas y composiciones, y métodos de los mismos, descritos en este documento, se administran a un sujeto mediante liberación sostenida o en

pulsos. La terapia en pulsos no es una forma de administración discontinua de la misma cantidad de una composición con el tiempo, sino que comprende la administración de la misma dosis de la composición en una frecuencia reducida o la administración de dosis reducidas. Las administraciones de liberación sostenida o de pulsos son particularmente preferida en condiciones crónicas, ya que cada dosis de pulso se puede reducir y la cantidad total de un compuesto, tal como, por ejemplo, todos los antibióticos aminoglucósido administrados durante el curso del tratamiento para el paciente se minimiza.

[00200] El intervalo entre pulsos, cuando sea necesario, se puede determinar por un versado en el arte. A menudo, el intervalo entre pulsos se puede calcular mediante la administración de otra dosis de la composición cuando la composición o el componente activo de la composición ya no son detectable en el sujeto antes de la entrega del siguiente pulso. Los intervalos también se pueden calcular a partir de la vida media *in vivo* de la composición. Los intervalos podrán calcularse como mayor que la vida media *in vivo*, o 2, 3, 4, 5 y hasta 10 veces mayor que la vida media de la composición. Se describen varios métodos y aparatos para composiciones pulsantes por infusión u otras formas de suministro al paciente, en las patentes U.S. Nos.: 4.747.825; 4.723.958; 4.948.592; 4.965.251 y 5.403.590.

[00201] En algunas implementaciones, las preparaciones de liberación sostenida que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden preparar. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el inhibidor, en el que las matrices están en la forma de artículos hechos, e.g., películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli (vinilalcohol), polilactidas (Patente U.S. No.

3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno vinilo acetato no degradable, copolímeros degradable de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas del copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico.

[00202] Las formulaciones que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, que se utilizarán para la administración *in vivo* están preferiblemente estériles. Es decir, ya acabadas por filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles, y otros métodos conocidos por un versado en el arte.

[00203] Los siguientes ejemplos de métodos que se utilizaron para demostrar la fuerza protón-motriz inducen metabolitos aminoglucósidos potenciados contra las persistencias bacterianas, y se pueden utilizar, por ejemplo para identificar además los compuestos que estimulan la PMF y adyuvantes para uso en los métodos y composiciones descritos en este documento.

EJEMPLOS

[00204] La resistencia a los antibióticos se está convirtiendo en un desafío médico importante. Los datos recopilados de la European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2005-2010 muestran un descenso sin obstáculos de la susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos más importantes de toda Europa. La resistencia a la aminopenicilina observada en enterobacteriaceae, resistencia a la meticilina en *S. aureus*, y la aparición de resistencia al glicopéptido en enterococci son algunas de las principales preocupaciones. La situación es aún más grave teniendo en cuenta el ritmo lento

de la química médica para producir nuevas sustancias antimicrobianas. Como una consecuencia ejemplar, los carbapenemas siguen siendo la última clase de antimicrobianos cuando se trata de β -lactamasas de espectro expandido o microbios portadores de ESBL. La aparición de resistencias a los carbapenémicos allana el camino a la "era post-antibióticos". Clásicamente los mecanismos descritos para la resistencia incluyen mutaciones del DNA que alteración los objetivos del antibiótico (quinolonas y rifampicina) y la transferencia horizontal de genes (e.g, β -lactamasas).

[00205] Sin embargo, un mecanismo cada vez más reconocido inicialmente identificado por Bigger es la "persistencia" (también llamado "tolerancia"). La persistencia se define como células dentro de una población bacteriana de antecedentes genéticos compartidos que entran en un estado metabólico reducido o estado latente, que muestra susceptibilidad reducida a los antibióticos. Estas células son llamadas persistencias. Este fenotipo no es fijo ni hereditario y la persistencia puede volverse espontáneamente al estado normal o activo. En la presencia de la presión antibiótica, las persistencias son favorecidas y sobreviven más tiempo; a través del estrés repetido de antibióticos, que pueden dar lugar, en última instancia, a través de mutagénesis o transferencia horizontal de genes, a células resistentes. Las persistencias también han sido implicadas en la formación de biopelículas (infección de cuerpo extraño) y las infecciones crónicas. Hasta la fecha, sin embargo, no existe una estrategia antimicrobiana contra ellos.

[00206] La fibrosis quística (CF) es un ejemplo clínico relevante para la persistencia. La enfermedad genética letal más común entre los caucásicos, con una frecuencia de 1 en 2000 a 3000 nacidos vivos. Es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones en el gen de la fibrosis quística transmembrana reguladora de la conductancia (CFTR), que actúa entre otros como un canal de

cloruro. El transporte alterado de cloruro y otros iones afectados por CFTR (sodio y bicarbonato predominantemente), conduce a las secreciones viscosas en los pulmones, el páncreas, el hígado, el intestino y el tracto reproductivo que alteran su función, y al aumento del contenido de sal en las secreciones de las glándulas sudoríparas, el aclaramiento impedido de secreciones viscosas en los pulmones hace los pacientes propensos a la infección crónica.

[00207] Actualmente, la principal carga de los pacientes CF es complicaciones respiratorias que representan más del 80% de los casos de mortandad relacionadas con la CF. La morbilidad pulmonar de un paciente CF depende en gran medida de episodios infecciosos pulmonares. La colonización por *P. aeruginosa* de la vía pulmonar alterada, un entorno ideal para la bacteria, se correlaciona con una aceleración de la disminución de la función pulmonar y representa una causa principal de mortandad. La persistencia *P. aeruginosa* está bien documentada y se cree que desempeña un papel importante en la infección crónica en pacientes con CF. Inicialmente, las *Pseudomonas* crecen en las vías respiratorias como una cepa no mucoide que puede ser erradicada, sin embargo, con infección crónica, las células de *Pseudomonas* adoptan progresivamente un metabolismo de persistencia formando colonias mucoides y variantes de colonias pequeñas (SCV) llegando a ser muy difícil de erradicar. La *P. aeruginosa* SCV en pacientes -CF se correlaciona con el desarrollo de resistencia a los antibióticos. La acumulación de mutaciones en los genes asociados a resistencia puede dar lugar a cepas para las que no hay prácticamente ninguna opción terapéutica izquierda. Además, hay un beneficio de supervivencia para los pacientes restantes pronunciado libre de *P. aeruginosa*, por lo que su erradicación es un objetivo terapéutico altamente relevante.

[00208] Los contenidos de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad en este documento y, en parte, en la PCT/US12/36492, son los métodos para la identificación de productos del metabolismo intermediario que potencian los antibióticos en las infecciones bacterianas.

[00209] Entre los metabolitos analizados, los componentes del TCA fuera de la vía alternativa del glioxilato resultaron más efectivos. La β -oxidación derivada de propionato recapitula las gripes de algún efecto, ya que puede entrar en el ciclo de Krebs a nivel succinilCoA. Por último, la glucosa, gluconato y piruvato, como miembros de la vía Entner-Doudoroff muestran niveles variables de eficiencia. Los miembros de la Embden Meyerhof (manitol y fructosa) no son eficientes, lo que es consistente con la ausencia en *Pseudomonas* de 6-Fosfofructokinasa.

Métodos

[00210] Erradicación de células persistentes

[00211] Las células madre congeladas se cultivan durante la noche a 37°C, después de lo cual una sola unidad formadora de colonia (CFU) se cultiva en caldo Luria-Bertani (LB) a 300 r.p.m. y 80% de humedad a una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,3. Las células luego se diluyen 1: 1,000 en 25 ml de LB y se cultivan durante 16 horas a 37°C, 300 r.p.m, y 80% de humedad en frascos de 250 ml. La ciprofloxacina se añade en una concentración de 5 mg/l a los cultivos antes mencionados por 4 h. Después, las células se lavan y se centrifugan a 5000 rpm durante 15 minutos. A continuación, las muestras se lavan con 20 ml de PBS 1x filtrado y de nuevo se centrifugan a 5000 rpm durante 15 nims y se re-suspenden en medio mínimo M9. Las fuentes de carbono y antibióticos (tobramicina 40mg/l) se añaden y las muestras se incuban a 37°C, 300 r.p.m., y 80% de humedad.

[00212] En los puntos de tiempo especificados, se retiraron alícuotas 10- μ l de células, se diluyeron en serie y se sembraron (spot-plated) sobre placas de agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias por ml (c.f.u.ml/l). La concentración de las fuentes de carbono se normalizó para entregar 60 mM de carbono (e.g, glucosa 10 mM, fumarato 15 mM, piruvato 20 mM, etc.), los sobrevivientes se enumeraron por alícuotas de 10 μ l en placas con diluciones seriadas tomadas desde 1 ml centrifugado y lavado con PBS (AB restante). Solamente se contaron las diluciones que rindieron 4-40 colonias. La supervivencia se determinó dividiendo el c.f.u. ml⁻¹ de una muestra en cada punto de tiempo inicial por el c.f.u. ml⁻¹ para esa muestra. Los resultados muestran una mortandad mejorada de 1000-10000 veces (FIGs.1A-1b).

Erradicación de células en fase estacionaria.

[00213] Las células madre congeladas se cultivan durante la noche a 37°C, después de lo cual una sola unidad formadora de colonia (CFU) se cultiva en caldo Luria-Bertani (LB) a 300 r.p.m. y 80% de humedad a una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,3. Las células luego se diluyen 1: 1,000 en 25 ml de LB y se cultivan durante 16 horas a 37°C, 300 r.p.m, y 80% de humedad en frascos de 250 ml. Las células luego se lavan (velocidad 5000 rpm (Centrífuga Thennofisher) durante 15 mins. a continuación, las muestras se lavan con 20 ml de PBS 1x filtrado (de nuevo velocidad de 5000 rpm durante 15 minutos) y se resuspenden en medio mínimo M9. Se añadieron fuentes de carbono y antibióticos (tobramicina 40mg/l) y las muestras se incubaron a 37°C, 300 r.p.m. y 80% de humedad.

[00214] En los puntos de tiempo especificados, se retiraron alícuotas de 10 μ l de células y se lavaron con PBS, diluido en serie y se detectaron en placas sobre agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias por ml (c.f.u. ml⁻¹).

Las concentraciones de las fuentes de carbono se normalizaron para entregar 60 mM de carbono (e.g, glucosa 10 mM, fumarato 15 mM, piruvato 20 mM, etc.). Los sobrevivientes se enumeraron por alícuotas de 10 µl en placas con diluciones seriadas tomadas desde 1 ml centrifugado y lavado con PBS (AB restante). Solamente se contaron las diluciones que rindieron 4-40 colonias. La supervivencia se determinó dividiendo el c.f.u. ml⁻¹ de una muestra en cada punto de tiempo inicial por el c.f.u. ml⁻¹ para esa muestra. Los resultados muestran una mortandad mejorada de 10000-100000 veces (Fig. 2A-2B).

Antibióticos y productos químicos

[00215] En este estudio se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos; 10 µg ml⁻¹ gentamicina, 30 µg ml⁻¹ Kanamicina, 50 µg ml⁻¹ estreptomicina, 5 µg ml⁻¹ ofloxacina, 100 µg ml⁻¹ ampicilina, 40 µg ml⁻¹ tetraciclina, 50 µg ml⁻¹ cloramfenicol, 100 µg ml⁻¹ espectinomicina, 20 µg ml⁻¹ cabonilcianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP); se utilizó en los experimentos para suprimir la fuerza protón-motriz. El cianuro de potasio 1mM se utilizó para inhibir la respiración aeróbica. Se hizo una solución madre de CCCP, en dimetilsulfoxido a 500 µM y se almaceno a 4°C. Todos los antibióticos y productos químicos se adquirieron de Sigma y Fisher.

Cepas

[00216] Las cepas parentales utilizadas en este estudio fueron *E. coli* (K 12 EMG 2 y *S. aureus* (ATCC 25923). Todos los *E. coli* nocaout (ver Tabla 2) fueron transducidos en la cepa EMG2 a partir de cepas de la colección KEJO nocaout utilizando el método del fago P1. Todas las cepas se curaron usando pCP20 y procedimientos estándar de laboratorio antes de su uso en ensayos.

Ensayos de persistencia

[00217] Para los ensayos de persistencia con *E. coli*, las muestras se cultivaron hasta la fase estacionaria como se describió anteriormente. Los cultivos se trataron durante 4 horas con ofloxacina 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en las condiciones de crecimiento establecidas anteriormente. Trabajos previos demostraron que el tratamiento durante 3 h bajo estas condiciones elimina todas las células no persistentes susceptibles²⁵.

Captación de rojo Texas por gentamicina

[00218] El complejo rojo Texas-Gentamicina se hizo como se ha descrito anteriormente²⁷. 4 °C, se disolvió 1 mg de rojo Texas (invitrogen en 50 μl de N,N dimetilformamida anhidra de alta calidad. El rojo Texas disuelto se agregó lentamente a 2.3 ml de solución de gentamicina 10 mg ml^{-1} en K_2CO_3 100mM a 4°C.

[00219] La captación de rojo Texas gentamicina inducida por las fuentes de carbono en las células en fase estacionarias se determinó mediante la adición de fuentes de carbono concentradas (ver sección sobre medio y condiciones de crecimiento para las concentraciones) para los cultivos en fase estacionaria y la incubación de los mismos durante 30 minutos a 37°C, 300 rpm, y 80% de humedad. Luego se añadió el rojo Texas gentamicina concentrado a una concentración final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y las muestras se incubaron por 5 min. Luego se lavaron 100 μl de cada muestra con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Después se añadieron 200 μl de la muestra resuspendida a 800 μl de PBS en tubos de flujo. Las muestras fueron analizadas en un citometro de flujo BD FACS Aria II con las siguientes condiciones: Voltaje mCherry, 650 V: umbral de

FSC, 1000; eventos registrados, 100.000; eventos mCherry de salida cerrada, <30.

Mediciones de potencial de membrana

[00220] El KIT DE POTENCIAL DE MENBRANA BACTERIANA DE FONDO BACLIGHT (B34950, Invitrogen) se puede utilizar para evaluar el cambio en la fuerza protón-motriz inducida por los metabolitos. El potencial de membrana inducida por fuentes de carbono en células en fase estacionaria se puede determinar mediante la adición de fuentes de carbono concentradas (ver sección de medios y condiciones de crecimiento para concentraciones) y 10 µl de DiOC2 (3) (tinción de membrana) a cultivos en fase estacionaria, seguido de incubación durante 30 min a 37°C, 300 rpm, y 80% de humedad. Se añadieron 10 µl de los cultivos a 1 ml de PBS en tubos de flujo inmediatamente antes del análisis. Las muestras pueden ser analizadas en un citometro de flujo BD FACS Aria II con los ajustes optimizados de acuerdo con el manual del kit Baclight. Los ajustes que se pueden utilizar son: Voltaje FITC, 250 V: Voltaje mCherry, 650 V; umbral FSC, 1000; eventos registrados 100.000. FSC y SSC, los valores extremos fueron cerrados mediante inspección visual antes de la adquisición de datos, se determinaron y normalizaron los valores de rojo/verde (mCherry/FITC) para cada célula, a continuación, en comparación se compararon con las muestras sin metabolitos para determinar el cambio relativo en la PMF.

Experimentos anaerobios

[00221] La *Escherichia coli* se cultivó en una OD₆₀₀ de 0,3, después se diluyó 1:1000 en 25 ml de LB anaeróbico NaNO₃ 10 mM y se cultivaron durante 16 horas a 37°C, 200 r.p.m, 1,5-2,0 de hidrógeno y <50 p.p.m. de oxígeno en frascos de 250

ml. Los cultivos se trataron a continuación con una fuente de carbono y metabolito en presencia o ausencia de un NaNO_3 adicional 10 mM. Se añadió el NaNO_3 para determinar si incrementando la concentración del aceptor terminal de electrones podría aumentar la potenciación del aminoglucósido.

Ensayo de Biopelícula

[00222] Se diluyeron en LB cultivos que crecieron durante la noche 1: 200 en LB precalentado que luego se agregó a las placas MBEC (Innovotech) a 150 μl por pozo. Las placas se incubaron a 35°C, 150 r.p.m., por 24 h., a continuación, se lavaron las clavijas en una placa de microtitulación con 200 μl de PBS 1x por pozo. Las clavijas luego se agregaron a una placa de microtitulación que contiene 200 μl de sales mínimas M9 (para *E. coli*) o filtrado esteril de los medios de la fase estacionaria (para *S. aureus*, además de una fuente de carbono y antibióticos. Las placas se incubaron a 35°C, 150 r.p.m. por 4 h, las clavijas se lavaron dos veces en placas de microtitulación con 200 μl de PBS 1x por pozo. Para desalojar las células de la biopelícula, las clavijas se colocaron en una placa microtituladora de 145 μl de PBS 1x por pozo y se sometieron a ultrasonidos en un baño de agua durante 30 minutos a 40 kHz. Las diluciones seriales y las sembradas (spot-plated) se realizaron para determinar las c.f.u. viables por clavija. Para la determinación de la dependencia de la eliminación de la biopelícula de *E. coli* con el pH, se llevó a cabo el procedimiento anterior en sales M9 tamponadas a un pH apropiado con ácido cítrico, en oposición a KH_2PO_4 que es usado típicamente para M9. Ensayo de infección crónica del tracto urinario del ratón.

[00223] Los ratones hembra Charles River BALB/e (con un peso 22-26 g) recibieron implantación quirúrgica en el tracto urinario de tubos de catéter PE50 de 6 mm que habían sido incubados en cultivos de *E. Coli* uropatogénica por 24 h

para formar biopelículas. Después de 48 h de cirugía, los ratones recibieron, bien sea ningún tratamiento o tratamiento dos veces al día, por vía intravenosa con gentamicina (1 mg kg^{-1}) o manitol ($1,5 \text{ g kg}^{-1}$) mas gentamicina (1 mg kg^{-1}) durante 3 días. En cada grupo se incluyeron siete u ocho ratones. 24 h después del tratamiento se extrajo el tubo del catéter para determinar la viabilidad de la biopelícula y se retiraron los riñones para determinar la carga bacteriana, los materiales de ratón fueron proporcionados por Vivisource Laboratories, una instalación aprobada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y por la Oficina de Bienestar de los Animales de Laboratorio, donde se realizó todo el trabajo experimental *in vivo*. El estudio se hizo de acuerdo con el cuidado animal institucional de Vivisource y las políticas y normas de procedimiento.

Análisis de microarreglos de *Staphylococcus aureus*

[00224] Los datos de los microarreglos en bruto (Archivos .CEL;) para dos fases exponenciales (GSM524189, GSM 524193) y dos fase estacionarias (GSM 524362, GSM 524363) de cultivos *S. aureus* se descargaron del Gene Expression Omnibus (GEO) series GSE20973 (Majerczyk, C.D et al los blancos directos de CodY en *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol. 192, 2861-2877 (2010); Majerczyk, C.D. et al blancos directos de CodY en *Staphylococcus aureus* J. Bacteriol, 192, 2861-2877, (2010)). Los datos fueron procesados con RMA expresp usando ajuste de fondo, normalización cuartil y resumen perfeccionado de la mediana) para calcular los valores de la expresión RMA_{30} . Los valores promedio de expresión se calcularon para los datos de la fase exponencial y la fase estacionaria y los cambios relativos de repetición (estacionaria/exponencial) se reportan en la tabla 3.

Software

[00225] Se utilizó MATLAB (Marhworks) para procesar los datos citométricos de flujo. Para el análisis de datos de microarreglos y generar mapas de calor a escala utilizando la función de imágenes. Se utiliza Microsoft Excel para trazar ensayos de supervivencia.

Tabla 1: Enzimas inactivadas para determinar la fuente de generación de NADH.

Enzima	Gen(es)	Equivalente de reducción
Glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa	<i>Zwf</i>	NADPH*
6-fosfofructoquinasa	<i>pfkA pfkB</i>	NADH
Citrato/metilcitrato sintasa	<i>gltA prpC</i>	NADH
Piruvato deshidrogenasa	<i>aceE</i>	NADH

* El NADPH se puede convertir en NADH por la piridina nucleótido transhidrogenasa (sthA)

Tabla 2: Primers de chequeo para cepas genéticas nocaut

Gen	Primers hacia delante	Primers inverso
<i>mtlD</i>	CTCCTCACGGAGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1)	TCAAGCACACGGTTTTTCAAA (SEQ ID NO: 2)
<i>zwf</i>	CGTAATCGCACGGGTGGATAA (SEQ ID NO: 3)	TTATGACTGAAACGCCTGTAACCG (SEQ ID NO: 4)
<i>pfkA</i>	CCAGGGAGGGTAAACGGTCTATG (SEQ ID NO: 5)	GGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCC (SEQ ID NO: 6)
<i>pfkB</i>	ATTTCTTCACTTTCCGCTGATTCG (SEQ ID NO: 7)	ATTTCCCTCATCATCCGTCATAGTG (SEQ ID NO: 8)
<i>poxB</i>	TGGTCGGGTAACGGTATCAC (SEQ ID NO: 9)	ACCGTTAGTGCCTCCTTTCTCT (SEQ ID NO: 10)
<i>gltA</i>	TAAAGCCAGGTTGATGTGCGAA (SEQ ID NO: 11)	AAGTATTGGGTTGCTGATAATTTGAGC (SEQ ID NO: 12)
<i>prpC</i>	GACCCTACAAATGATAACAATGACGAGG (SEQ ID NO: 13)	GACGATATCAACGATTTACGATCAAA (SEQ ID NO: 14)
<i>aceE</i>	GTGAGCGTTCTCTGCGTCGTCT (SEQ ID NO: 15)	TCTCTTTCACGGTGCCAGCAA (SEQ ID NO: 16)
<i>cyoA</i>	TTCCCGTAAAATGCCACAC (SEQ ID NO: 17)	TAATGCCAGCGATCGTAACC (SEQ ID NO: 18)
<i>cydB</i>	GCCCAAGCAGCCTGAAAA (SEQ ID NO: 19)	CGGTGATTACCCCAAACGAA (SEQ ID NO: 20)
<i>appB</i>	TGCAGAAATATGCCCGTCTG (SEQ ID NO: 21)	AGGGTGGAGAGCGAACACAT (SEQ ID NO: 22)
<i>ndh</i>	GCGAAGAACATTTTCATTGCTGTA (SEQ ID NO: 23)	GATCGCGCTGTTCTCAAG (SEQ ID NO: 24)
<i>nuoI</i>	TGTCCTTCGGCTGAAAAATC (SEQ ID NO: 25)	CTCGCAAGGTCGCAAGTATG (SEQ ID NO: 26)
<i>kanR</i>		GGTCCGCCACACCCAGCC (SEQ ID NO: 27)

Tabla 3: Regulación del pliegue de la fase estacionaria de los transportadores de metabolitos.

Nombre del Gen	# de Acceso UniProt	Replicado Exponencial 1	Replicado Exponencial 2	Replicado Estacionario 1	Replicado Estacionario 2	Veces de Cambio Extacionario/ Potencial	Descripción
Crr	Q5HF29, P60856, P60857	100.18	107.50	120.26	131.12	1.21	Eenzima IIA fosfotransferasa específica de glucosa
ptsG	Q5HJI3, Q7A807, Q99X32	233.59	218.12	72.59	60.48	0.29	Componente del sistema PTS de EIICBA glucosa específico.
mtlA	Q5HE48, Q7A4B3, Q99SA3	5.59	4.61	3.21	3.28	0.64	Componente del sistema PTS-manitol específico EIICB
mtlF	Q5HE46, P0A0D7, P0A0D8	23.64	16.75	14.62	23.53	0.94	Componente de la enzima fosfotransferasa II A manitol específica
SACOL 2662	Q5HCQ6, Q7A374, Q99QZ7	8.93	8.18	206.91	150.47	20.88	componente IIAABC sistema PTS fructosa-específica

Resumen de Resultados

[00226] Los aminoglucósidos son el pilar de la supresión crónica CF y parte del tratamiento de las exacerbaciones pulmonares agudas. Sin embargo, requieren el transporte activo para su entrada en la célula y por lo tanto tienen una débil actividad frente a células latentes como las células planctónicas de Pseudomonas o persistentes, sin embargo, recientemente se mostró en *E. coli* que los aminoglucosidos se podrían potenciar por estimulacion metabólica.

[00227] Hemos probado si la estimulación metabolica podría potenciar los aminoglucósidos contra las Pseudomonas persistentes. Tenemos pruebas de metabolitos de las vias Entner-Doudoroff, la via Pentosa, así como los componentes del ciclo del ácido tricarboxílico (RCA) y un conector entre la β -oxidacion y el TCA que podria restaurar la mortandad aminoglucósidos de las celulas persistentes. Las persistentes se aislaron a partir de células en fase

estacionaria profunda a través de la selección ciprofloxacina y se resuspendieron en medio mínimo que contiene la fuente de carbono específica. La concentración de la fuente de carbono se normalizó para entregar 60 mM de carbono (en forma de fumarato que contiene 4 átomos de carbono, se administró a 15 mM).

[00228] La tobramicina se potenció por fuentes de carbono específicas de la ruta Entner-Doudoroff y el ciclo TCA (Fig. 1), pero no de las vías de Pentosa. En consonancia con el hecho que la *Pseudomonas* no tiene 6-fosfofructoquinasa las moléculas de la vía Embden-Meyerhof no tuvo ningún efecto. Los más potentes metabolitos fueron succinato y fumarato, que se encuentran en una posición en el exterior del TCA de la desviación del glioxilato. Sin desear estar limitado por la teoría, estos datos indican que la derivación glioxilato en *P. aeruginosa* juega un papel en la derivación de las fuentes de carbono fuera del TCA para disminuir la tasa metabólica y serían consistentes con las observaciones en *Micobacterias tuberculosis* que isocitrato liasa es crítica para la persistencia in vivo. También documentamos la cinética de esta potenciación y se probó si otras clases de antibióticos bacterianos (β -lactamas y quinolonas se potenciaron pero sólo se encontró una potenciación marginal (Fig. 1).

[00229] Como se mencionó anteriormente, las células de *Pseudomonas* en fase estacionaria planctónicas son sólo débilmente sensibles a aminoglucosidos. Nosotros probamos si nuestra mejor fuente de carbono utilizada (i.e., fumarato) podría potenciar la tobramicina persistente y se encontró que (1) las dosis crecientes de fumarato conducen al aumento de la mortandad de las células para una dosis dada de Tobramicina (FIG. 2B) y que (2) para una dosis creciente dada de fumarato la tobramicina también conducen a un aumento de mortandad (Fig. 2A).

[00230] Entre los metabolitos probados, los componentes del TCA fuera de la vía alternativa del glioxilato probaron ser los más efectivos. El propionato recapitulado derivado de la β -oxidación tiene algún efecto, ya que puede entrar en el ciclo TCA al nivel succinilCoA, Por último, la glucosa, el gluconato y el piruvato, como miembros de la vía Entner-Doudoroff mostraron niveles variables de eficacia. Es de destacar que los miembros de la vía Embden-Meyerhof (Manitol y fructosa) no fueron eficientes, lo que es coherente con la deficiencia en las *Pseudomonas* de la 6-fosfofructokinasa.

[00231] Se demostró la potenciación de los animoglucosidos con base en metabolitos de las células en fase estacionaria *P. aeruginosa*. **La FIG. 3A** muestra que la selección de los compuestos del metabolismo intermediario se hizo para evaluar la potenciación de la tobramicina (TBR), incluyendo la glicólisis, la vía de Pentosa, el ciclo del ácido tricarboxílico, que comprende la derivación del glioxilato y los compuestos fuera de él, así como un enlace con la β -oxidación. **La FIG. 3B** muestra la supervivencia en CFU por ml para las células no tratadas (sin AB) y las células tratadas con tobramicina (TBR) en una concentración de 40 [mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RIB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), α -cetoglutarato (α KG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP), mpentse en fase estacionaria, las concentraciones de fuentes de carbono fueron emparejados para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 3C** muestra los efectos de fumarato (FMR) y glioxilato (GLX) que fueron comparados sin fuente de carbono con una dosis más alta de tobramicina (320 [mg/l]). **La FIG. 3D** muestra la cinética de potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina sola, el fumarato solo o sin tratamiento. **La FIG. 3E** muestras las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina

(TBR) a una concentración de [40mg/L] se graficaron para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 3F** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[00232] Se demostró la potenciación de los animoglucosidos con base en *P. aeruginosa* persistente. **La FIG. 4A** muestra el establecimiento de persistencia por selección de la ciprofloxacina; las condiciones incluyen, sin tratamiento (línea de color negro, ○), 5 mg/l (▼), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (■), 40 mg/l (●) de ciprofloxacina. **La Fig. 4B** muestra un panel de metabolitos que también se ensayó para la potenciación de la tobramicina (TBR) en una concentración de [40 mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RLB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), alfa-cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP). Las concentraciones de las fuentes de carbono fueron emparejadas para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 4C** muestra la cinética de la potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina. **La FIG. 4D** muestra las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40 mg/L] graficadas para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 4E** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[00233] La también se muestran la potenciación en contextos clínicos relevantes. **Las Figs. 5A-5B Muestran** las curvas de mortandad para células en fase estacionaria de pacientes CF derivadas de cepas no mucoides tratadas con dosis crecientes de la tobramicina y sin fuentes de carbono (CTRL), el fumarato

(FMR) o piruvato (PRV). **La FIG. 5C** muestra las mismas curvas de mortandad con un paciente CF derivada de cepas no mucoides. **La FIG. 5D** muestra las mismas curvas de mortandad con una cepa derivada de pacientes CF con un alto perfil de resistencia a los antibióticos. **La FIG. 5E** muestra la mortandad antibiótica de biopelículas con tobramicina (TBR) sin fuente de carbono adicional (CTRL) o fumarato (FMR).

[00234] También se muestra la potenciación de las fuentes de carbono que provocan aumento en la absorción de la tobramicina a través de la acumulación PMF. **La FIG. 6A** muestra las medidas con base en la cartometría de flujo de la tobramicina etiquetada con fluorescencia en células PAO1, tratadas respectivamente, con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6B** muestra la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células PAO1 tratadas respectivamente con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6C** muestra la evaluación de la criometría de flujo de la absorción de la tobramicina en ausencia o presencia de un inhibidor de PMF (NaN₃). **La FIG. 6D** muestra la evaluación mediante el ensayo de supervivencia del impacto de varios inhibidores de PMF en la letalidad de la tobramicina en fase estacionaria tratada con fuentes de carbono.

Referencias

1. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625 (2004).
2. Gefen, O., Gabay, C., Mumcuoglu, M., Engel, G. & Balaban, N. Q. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 6145–6149 (2008).
3. Gefen, O. & Balaban, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 704–717 (2009).
4. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Rev. Microbiol.* 5, 48–56 (2007).
5. Smith, P. A. & Romesberg, F. E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nature Chem. Biol.* 3, 549–556 (2007).
6. Levin, B. R. & Rozen, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 4, 556–562 (2006).
7. Dhar, N. & McKinney, J. D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 30–38 (2007).
8. Shah, D. et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53 (2006).
9. Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 430–450 (2003).
10. Magnet, S. & Blanchard, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 477–498 (2005).
11. Davis, B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* 51, 341–350 (1987).
12. Weisblum, B. & Davies, J. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.* 32, 493–528 (1968).
13. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. & Collins, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135, 679–690 (2008).
14. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172–8180 (2004).
15. Spoering, A. L. & Lewis, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746–6751 (2001).
16. Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. & Arrow, A. S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* 51, 439–457 (1987).
17. Bryan, L. E. & Kwan, S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 835–845 (1983).

18. Hill, S., Viollet, S., Smith, A. T. & Anthony, C. Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N₂ fixation and microaerobiosis. *J. Bacteriol.* 172, 2071–2078 (1990).
19. Govantes, F., Albrecht, J. A. & Gunsalus, R. P. Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites. *Mol. Microbiol.* 37, 1456–1469 (2000).
20. Walters, M. C. III, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 317–323 (2003).
21. Mates, S. M. et al. Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 6693–6697 (1982).
22. Fraimow, H. S., Greenman, J. B., Leviton, I. M., Dougherty, T. J. & Miller, M. H. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* is driven by either electrical potential or ATP. *J. Bacteriol.* 173, 2800–2808 (1991).
23. Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 3, 91 (2007).
24. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797–810 (2007).
25. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. & Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 13–18 (2004).
26. Hansen, S., Lewis, K. & Vulic, M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2718–2726 (2008).
27. Sandoval, R., Leiser, J. & Molitoris, B. A. Aminoglycoside antibiotics traffic to the Golgi complex in LLC-PK1 cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 167–174 (1998).
28. Lu, T. K. & Collins, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 11197–11202 (2007).
29. Majerczyk, C. D. et al. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 2861–2877 (2010).
30. Irizarry, R. A. et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31, e15 (2003).
31. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48–56 (2007).
32. Gefen, O. & Balaban, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev* 33, 704–717 (2009).
33. Bigger, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet* ii, 497–500 (1944).
34. Jayaraman, R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci* 33, 795–805 (2008).

35. Smith, P.A. & Romesberg, F.E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nat Chem Biol* 3, 549-556 (2007).
36. Levin, B.R. & Rozen, D.E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 556-562 (2006).
37. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 70, 267-274 (2005).
38. Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q. & Leibler, S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169, 1807-1814 (2005).
39. Harrison, J.J. et al. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 151, 3181-3195 (2005).
40. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. & Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230, 13-18 (2004).
41. Moyed, H.S. & Bertrand, K.P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155, 768-775 (1983).
42. Rotem, E. et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12541- 12546 (2010).
43. Korch, S.B., Henderson, T.A. & Hill, T.M. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* 50, 1199-1213 (2003).
44. Spoering, A.L., Vulic, M. & Lewis, K. *GlpD* and *PlsB* participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5136-5144 (2006).
45. McKinney, J.D. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735- 738 (2000).
46. Dorr, T., Vulic, M. & Lewis, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8, e1000317.
47. Hansen, S., Lewis, K. & Vulic, M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2718-2726 (2008).
48. Dorr, T., Lewis, K. & Vulic, M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5, e1000760 (2009).
49. Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622-1625 (2004).
50. Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 377-392 (1997).
51. Drlica, K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 2, 504-508 (1999).
52. Tomasz, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* 33, 113-137 (1979).

53. Joers, A., Kaldalu, N. & Tenson, T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 192, 3379- 3384 (2010).
54. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 8172-8180 (2004).
55. Shah, D. et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* 6, 53
56. Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F. & Arrow, A.S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 51, 439-457 (1987).
57. Davis, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 51, 341-350 (1987).
58. Campbell, B.D. & Kadner, R.J. Relation of aerobiosis and ionic strength to the uptake of dihydrostreptomycin in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 593, 1- 10 (1980).
59. Guest, J.R., Roberts, R.E. & Stephens, P.E. Hybrid plasmids containing the pyruvate dehydrogenase complex genes and gene-DNA relationships in the 2 to 3 minute region of the *Escherichia coli* chromosome. *J Gen Microbiol* 129, 671-680 (1983).
60. Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322 (1999).
61. Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65, 1955-1958 (2010).
62. Mah, T.F. & O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34-39 (2001).
63. Walters, M.C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317-323 (2003).
64. Lewis, K. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol* 64, 357-372 (2010).
65. Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. & Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66, 86-92 (2002).
66. Rediske, A.M. et al. Pulsed ultrasound enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 771-772 (2000).
67. Lu, T.K. & Collins, J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11197-11202 (2007).
68. Spoering, A.L. & Lewis, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746-6751 (2001).
69. Majerczyk, C.D. et al. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192, 2861-2877 (2010).

P-11424

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

E. S. D.

Re: Expediente No. **16-058.124**

Solicitud de patente a nombre de **TRUSTEES OF BOSTON
UNIVERSITY** y **THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 3, obrando como apoderada de las sociedades **TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY** y **THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION**, domiciliadas en Boston, Massachussets, Estados Unidos de América, solicitantes de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. **13664** notificado el 20 de septiembre de 2017, relacionado con concepto técnico de fondo, y para el cual solicité oportunamente prórroga el pasado 12 de diciembre de 2017, atentamente me permito manifestar:

1. Modificación al Título de la Solicitud

Siguiendo las amables indicaciones del examinador, se ha modificado el Título de la Solicitud como se indica a continuación:

“COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTIBIÓTICO
AMINOGLUCÓSIDO EN COMBINACIÓN CON UN METABOLITO O
COMPUESTO DE LA VÍA METABÓLICA SELECCIONADA DEL GRUPO
QUE CONSTA DE: FUMARATO, SUCCINATO, CITRATO,
OXALOACETATO, RIBOSA, ARABINOSA, GLUCONATO O
PROPIONATO”

De esta manera, el Título refleja con mayor claridad el objeto reivindicado, superándose la objeción formulada.

2. Modificación a la Descripción y a las Reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nueva Descripción y nuevo Capítulo Reivindicatorio, el cual consta de 4 reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente.

Particularmente, siguiendo las indicaciones del examinador, en la Descripción se mejoró la calidad de la tabla en la página 23 y se modificaron los nombres de los microorganismos para ser presentados en cursiva.

De otro lado, en el nuevo capítulo reivindicatorio se realizaron las siguientes modificaciones:

- 2.1.** Se limitó el contenido de la reivindicación 1 a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina en combinación con fumarato.
- 2.2.** En vista de lo anterior, no se incluyen las anteriores reivindicaciones 2 a 4. Las reivindicaciones 5 y 6 (nuevas reivindicaciones 2 y 3) fueron modificadas en su dependencia.
- 2.3.** Se incluyó una nueva reivindicación 4, la cual recita la cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina, según el soporte que provee la Descripción, específicamente los ejemplos y las figuras 2A y 2B.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad, novedad y nivel inventivo planteadas por el examinador en su concepto técnico.

3. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo

reivindicatorio tiene un menor número de cláusulas que el originalmente presentado y es en esencia el mismo objeto, pero más limitado y definido con mayor claridad.

De otro lado, se adjunta recibo por concepto de examen de patentabilidad, en vista de las modificaciones realizadas sobre el pliego reivindicatorio, según lo estipulado en la Resolución No. 3719 del 2016.

4. Claridad y concisión de la Descripción y las Reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación de la Descripción y el nuevo Capítulo Reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

En particular y tal como se indicó arriba, la Descripción fue modificada para mejorar la calidad de la tabla de la página 23 y para expresar los microorganismos en cursiva, según la solicitud del Examinador.

De otro lado, en vista de las modificaciones introducidas a las Reivindicaciones, la nueva reivindicación 1 ya no incluye la expresión “*antibiótico aminoglucósido*”.

Ahora bien, es importante mencionar que el Capítulo Reivindicatorio en su totalidad define la composición de forma lo suficientemente clara y concisa, recitando los componentes y sus cantidades. Por lo tanto, contrario a lo que afirma el examinador, la invención está correctamente definida según la legislación y la práctica actual.

Finalmente, teniendo en cuenta la limitación incluida en la nueva reivindicación 1, puede establecerse que la composición reivindicada encuentra el suficiente soporte en la Descripción, superando la objeción indicada por el examinador.

En consecuencia, nos permitimos indicar que la Descripción cumple con los requerimientos del Artículo 28 de la Decisión 486/00 y el Capítulo Reivindicatorio, que incluye 4 reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

5. Novedad y Nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico la falta de novedad de la anterior reivindicación 1 a la luz de las enseñanzas técnicas descritas en el documento WO2012151474 (D1) y la falta de nivel inventivo de las anteriores reivindicaciones 2 a 6, a la luz de las enseñanzas técnicas descritas en los documentos WO2012151474 (D1) y “Proton motive force generation from stored polymers for the uptake of acetate under anaerobic conditions” (D2).

A este respecto, me permito indicar que los artículos 16 y 18 de la Decisión 486 establecen que *“Una invención se considerará nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica”* y *“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”*.

Lo anterior significa que para que un documento del estado de la técnica pueda afectar la novedad de una solicitud, deberá revelar todas y cada una de las características técnicas que la definen.

Por otra parte, el análisis de nivel inventivo NO es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo debe demostrar la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace necesario demostrar que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la anterior definición, es deseo del solicitante señalar que la presente solicitud es tanto novedosa como inventiva sobre el estado de la técnica.

Tal como se indicó arriba, la reivindicación 1 fue limitada a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina en combinación con fumarato.

El examinador en su análisis reconoce que D1 no enseña ni sugiere tobramicina como el antibiótico aminoglucósido y fumarato, succinato, citrato, oxaloacetato o propionato como estimuladores de la fuerza protónica-motriz.

Por lo tanto, la nueva reivindicación 1 es novedosa sobre D1. Del mismo modo, dado que las reivindicaciones 2 a 4 dependen de la nueva reivindicación 1, también son novedosas por la misma razón.

De esta forma, se demuestra que las nuevas reivindicaciones 1 a 4 cumplen con el requisito de novedad según los lineamientos del artículo 16 de la Decisión 486/00.

Al igual que para el caso de la novedad, se resalta que la nueva reivindicación 1 fue limitada a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina en combinación con fumarato.

En este sentido, llamamos la atención del examinador frente al hecho de que entre varios metabolitos que se cree están involucrados en la generación de PMF (por ejemplo, fumarato, succinato, citrato, oxaloacetato, piruvato, glucosa, fructosa, manitol, ribosa, arabinosa, gluconato y propionato), el fumarato fue el que demostró un efecto técnico más pronunciado sobre la mejora de la eficacia de tobramicina, como se muestra en la FIG. 1A. Se observa que varios de los metabolitos propuestos para generar PMF no tuvieron efecto alguno en absoluto, incluyendo citrato, fructosa y manitol.

Consecuentemente, un experto en la técnica no habría tenido expectativa razonable alguna de éxito seleccionando aleatoriamente un metabolito para incluirlo en combinación con tobramicina. Así, la combinación de tobramicina y fumarato es inventiva sobre la combinación de D1 y D2, ya que no existe en dichos documentos alguna enseñanza que conlleve de forma obvia a obtener la combinación ahora reivindicada y mucho menos, a esperar el efecto técnico mencionado.

Por lo tanto, se demuestra que las nuevas reivindicaciones 1 a 4 cumplen con el requisito de nivel inventivo según los lineamientos del artículo 18 de la Decisión 486/00.

6. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

-
- i) La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada en la descripción, cumpliendo con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486; y
 - ii) Las reivindicaciones actuales son patentables sobre D1 y D2, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

En consecuencia, se solicita atentamente otorgar el privilegio de patente solicitado, toda vez que esta solicitud cumple con los requerimientos de la Decisión 486.

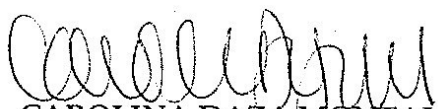
Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo- y 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: *“Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos”*, (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

7. Anexos

- Nueva Descripción
- Nuevo Capítulo Reivindicatorio que incluye 4 reivindicaciones.
- Recibo por concepto de examen de patentabilidad, según lo estipulado en la Resolución No. 3719 del 2016.

Señor Director,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

**COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE UN ANTIBIÓTICO AMINOGLUCÓSIDO EN
COMBINACIÓN CON UN METABOLITO O COMPUESTO DE LA VÍA
METABÓLICA SELECCIONADA DEL GRUPO QUE CONSTA DE: FUMARATO,
SUCCINATO, CITRATO, OXALOACETATO, RIBOSA, ARABINOSA,
GLUCONATO O PROPIONATO**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio bajo 35 USC § 119 (e) de la Provisional U.S. No. 61/871.554, presentada el 29 de agosto, 2013, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] El campo de la invención se refiere a la eliminación de la persistencia bacteriana y el tratamiento de infecciones crónicas.

ANTECEDENTES

[0003] La persistencia bacteriana se refiere a una sub-población latente de células tolerantes al tratamiento con antibióticos y se considera una fuente importante de infección crónica y recurrente. La persistencia bacteriana se diferencia de la resistencia a antibióticos por el hecho que las persistentes no son diferentes genéticamente de las células susceptibles a antibióticos. En su lugar, la persistencia resulta de la heterogeneidad de la población fenotípica dentro de una población isogénica. Visto como parte de una estrategia de supervivencia epigenética, la persistencia pierde un rápido crecimiento con el fin de ganar la tolerancia a la diversidad de estrés, incluyendo antibióticos. Los estudios genéticos

han descubierto una serie de fenómenos celulares implicados en la persistencia bacteriana, incluyendo módulos de toxina-antitoxina y la respuesta estricta. Se necesitan composiciones y métodos para eliminar o reducir las persistencias bacterianas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] Las bacterias tienen la tendencia a reducir su tasa metabólica o introducir formas de latencia de varias intensidades, que influyen en su susceptibilidad a los antibióticos y hacen el tratamiento de las infecciones más difícil. La persistencia bacteriana es un estado en el que una sub-población de células latentes, denominadas aquí como "persistencias bacterianas", tolera el tratamiento con antibióticos. Las persistencias bacterianas han sido implicadas en las biopelículas y las infecciones crónicas y recurrentes. A pesar de esta relevancia clínica, actualmente no existen medios listos para erradicar las persistencias.

[0005] Las composiciones y métodos descritos en este documento se refieren, en parte, al descubrimiento de los metabolitos del ciclo tricarboxílico, así como metabolitos de la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos y el catabolismo de los lípidos que se pueden usar para potenciar la mortandad de las células de *P. aeruginosa* en varios estados metabólicos reducidos en combinación con aminoglucósidos. En los experimentos, descritos en este documento, entre las fuentes de carbón activo, el fumarato y el succinato han dado muy buenos resultados con respecto a la potenciación de la eficacia de los antibióticos. Los inventores también encontraron que la glucosa, el piruvato y el propionato también sensibilizan la bacteria a los antibióticos aminoglucósidos. Este descubrimiento puede producir nuevas estrategias de tratamiento para las

infecciones crónicas como las asociadas con la fibrosis quística y las infecciones inducidas por biopelícula de bacterias Gram-negativas. Una de las ventajas de los métodos como descritos en este documento es que los metabolitos o compuestos son relativamente fáciles de usar, que se toleran bien, y que se pueden administrar fácilmente utilizando diversas rutas (e.g., intravenosa, inhalación, tópica, oral, etc.). Por ejemplo, el fumarato ya se utiliza en combinaciones de inhalación con otras terapias pulmonares (e.g., beta agonistas) para el tratamiento del asma, por lo tanto conocemos los temas concernientes a la toxicidad. Otra ventaja es que el uso de compuestos metabólicos es barato.

[0006] El trabajo descrito en este documento establece nuevas estrategias con base en novedosos metabólicos para erradicar persistencias bacterianas y pone de relieve la importancia crítica del ambiente metabólico de eficacia de los antibióticos. Sin desear estar limitado por la teoría, los métodos descritos en este documento tienen en cuenta el requisito del consumo de aminoglucósidos en la generación de la fuerza protón-motriz, y que los metabolitos que inducen la fuerza protón-motriz en bacterias persistentes inducen a la mortandad de persistencias de una manera dependiente de consumo. También se contemplan los métodos descritos en este documento para uso con bacterias de fase planctónicas.

[0007] Por consiguiente, en algunos aspectos este documento proporciona métodos para el tratamiento de una infección bacteriana crónica o persistente, que comprende: administrar a un sujeto que tiene una infección bacteriana crónica o persistente y someterlo a un tratamiento con antibiótico aminoglucósido, una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz como un adyuvante, en el que el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz es un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que

consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la beta-oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, y el catabolismo de los lípidos.

[0008] En una implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, o tobramicina.

[0009] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina B, neomicina C, frameticina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina o lividomicina.

[0010] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo TCA es acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxaloacetato, piruvato, lactato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0011] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de la β -oxidación es propionato, y análogos o derivados de los mismos.

[0012] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo de la urea es arginosuccinato, o análogos o derivados de los mismos.

[0013] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0014] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginina, lisina, glutamato, glutamina, asparagina, glicina, triptófano, leucina, histidina, y prolina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0015] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de lípidos es el ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0016] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, al menos dos compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz se administran como un adyuvante, en el que los compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz son cada uno un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la beta-oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos, o cualquier combinación de los mismos.

[0017] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es fumarato.

[0018] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

[0019] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende uno o más organismos Gram negativos o Gram positivos. En otras implementaciones de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más bacterias atípicas, tal como micoplasma, clamidia o *micobacterias*).

[0020] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más de *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*.

[0021] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende una o más de las especies de *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, o *Enterobacter*.

[0022] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana es una infección adquirida en el hospital.

[0023] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección adquirida en el hospital es causada por la meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* o resistente a múltiples fármacos *Pseudomonas aeruginosa*.

[0024] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana se caracteriza por la formación de biopelículas.

[0025] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección es recurrente.

[0026] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto tiene o está en riesgo de contraer una infección crónica o persistente; tiene una infección del tracto urinario; endocarditis infecciosa; una infección de la piel, la nariz, las orejas, y/o los ojos; quemaduras externas; una infección asociada a la fibrosis quística; una infección asociada con un dispositivo vascular; una infección asociada con una prótesis de hueso; una infección de la válvula protética; una infección de la válvula nativa; una infección asociada con la endometritis; infecciones asociadas con neutropenia febril; una infección intra-abdominal; meningitis; una infección asociada con osteomielitis; una infección asociada con la enfermedad inflamatoria de la pelvis; una infección asociada con peritonitis; una infección asociada con la neumonía; una infección asociada con pielonefritis; una infección asociada con la piel o del tejido blando; una infección asociada con la cirugía, o una infección asociada con la tularemia.

[0027] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente, es un sujeto inmunodeprimido.

[0028] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto inmunodeprimido es un humano con el virus de inmunodeficiencia positivo; un sujeto con fibrosis quística; o un sujeto que tiene la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

[0029] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente ha tenido, está teniendo, o tendrá un procedimiento médico invasivo.

[0030] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica o persistente tiene un dispositivo médico interno.

[0031] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y un compuesto que estimula la PMF se administran por vía tópica.

[0032] En otra implementación del método de cajas y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y un compuesto que estimula la PMF se administran por vía intravenosa.

[0033] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y el compuesto estimulante de PMF se administran por vía intramuscular.

[0034] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido y el compuesto estimulante de PMF se administran mediante inhalación.

[0035] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido no se administra por vía oral.

[0036] También se proporciona en este documento los métodos para inhibir o retardar la formación de biopelículas o la colonización sobre una superficie, el método comprende poner en contacto una superficie con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF, en el que el uno o más compuestos que estimulan la PMF son cada uno un metabolito o compuesto de una vía metabólica seleccionado del grupo que consiste de: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos, y combinaciones de los mismos.

[0037] En una implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, o tobramicina.

[0038] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina B, neomicina C, framisetina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, paromomicina sulfato, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina o lividomicina.

[0039] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo TCA es acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación en estos.

[0040] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto de la β -oxidación es propionato, y análogos o derivados del mismo.

[0041] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del ciclo de la urea es arginosuccinato, o análogos o derivados del mismo.

[0042] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0043] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de los aminoácidos es alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginina, lisina, glutamato, glutamina, asparagina, glicina, triptófano, leucina, histidina, y prolina, análogos o derivados de los mismos o cualquier combinación de los mismos.

[0044] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el metabolito o compuesto del catabolismo de lípidos es el ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, análogos o derivados de los mismos, o cualquier combinación de los mismos.

[0045] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es fumarato.

[0046] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un compuesto que estimula la PMF es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

[0047] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, el biopelícula comprende uno o más organismos Gram positivos o Gram negativos. En otras implementaciones de este método y todos los métodos descritos en este documento, la infección bacteriana comprende uno o más bacterias atípicas, tal como micoplasma, clamidia o *Mycobacteria*.

[0048] En otra implementación de este método y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie de un dispositivo médico interno.

[0049] En otro aspecto también se proporciona en este documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un antibiótico aminoglucósido en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un metabolito o compuesto de una vía

metabólica seleccionada del grupo constituido por: el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la β -oxidación, el ciclo de la urea, el catabolismo de aminoácidos, el catabolismo de los lípidos y sus combinaciones.

[0050] En una implementación de esta composición y métodos de uso de la misma, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el metabolito o compuesto de la vía metabólica es fumarato.

[0051] En otra forma de implementación de las composiciones descritas en este documento y los métodos de uso de los mismos, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el al menos un metabolito o compuesto de la vía metabólica es succinato, citrato, oxaloacetato, ribosa, arabinosa, gluconato, o propionato.

Definiciones

[0052] Por conveniencia, ciertos términos empleados en este documento, en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se recogen aquí. A menos que se indique lo contrario, o este implícito por el contexto, los siguientes términos y frases incluyen los significados indicados a continuación. A menos que se indique expresamente lo contrario, o sea aparente a partir del contexto, los términos y frases a continuación no excluyen el significado que el término o frase ha adquirido en el arte al cual pertenece. Las definiciones se proporcionan para ayudar en la descripción de implementaciones particulares, y no están destinadas a limitar la invención reivindicada, porque el alcance de la invención está limitado solamente por las reivindicaciones. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo

significado que se entiende comúnmente por un versado de ordinario versado en el arte al que pertenece esta invención.

[0053] Tal como se utilizan aquí, los términos "que comprende" o "comprende" se usan en referencia a las composiciones, métodos y componente(s) respectivo(s) de los mismos, que son esenciales para la invención, pero abierto a la inclusión de elementos no especificados, ya sean esenciales o no.

[0054] Tal como se utiliza en este documento, el término "que consiste esencialmente de" se refiere a aquellos elementos requeridos para una implementación dada. El término permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente las características básicas y novedosas o funcionales de esta implementación de la invención.

[0055] El término "que consiste de" se refiere a composiciones, métodos y componentes respectivos de los mismos como descritos en este documento , que son exclusivos de cualquier elemento no citado en esa descripción de la implementación.

[0056] Tal como se utiliza en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento y/o que serán evidentes para los versados en el arte al leer esta descripción y así sucesivamente.

[0057] Aparte de los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de

reacción usadas en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente", cuando se usa en relación con los porcentajes puede significar $\pm 1\%$.

[0058] A menos que se defina lo contrario en este documento, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que se entienden comúnmente por los versados en el arte al que pertenece esta descripción. Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos, etc., descritos en este documento y como tal puede variar. La terminología usada en este documento es para el propósito de describir solamente implementaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones. Las definiciones de términos comunes en inmunología y biología molecular se pueden encontrar en el Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 18th Edition, published by Merck Research Laboratories, 2006 (ISBN 0-911910-18-2); Robert S. Porter *et al* (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Luttmann Werner Immunology, published by Elsevier, 2006. Las definiciones de términos comunes en biología molecular se encuentran en Benjamin Lewin, Los genes IX, publicado por Jones & Bartlett Publishing, 2007 (ISBN-13: 9780763740634); Kendrew *et al*. (Eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (Ed), Maniatis *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1982); Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2 ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1989); Davis *et al*, Basic Methods in

Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., Nueva York, U.S.A. (1986); o Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S. L. Berger y A. R. Kimmerl Eds, Academic Press Inc., San Diego, U.S.A. (1987); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB) (Fred M. Ausubel, *et al.* Ed., John Wiley and Sons, Inc.), Current Protocols in Protein Science (CPPS) (John E. Coligan, *et al.* ed., John Wiley y Sons, Inc.) y Current Protocols in Immunology (CPI) (John Coligan, *et al.*, ed. John Wiley and Sons, Inc.), que se incorporan en el presente por referencia en su totalidad.

[0059] Se entiende que la siguiente descripción detallada y los ejemplos siguientes son ilustrativos solamente y no se deben tomar como limitaciones del alcance de la invención. Los diversos cambios y modificaciones a las implementaciones descritas, que serán evidentes para los versados en el arte, se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Además, todas las patentes, solicitudes de patentes, y publicaciones identificadas se incorporan expresamente aquí como referencia con el propósito de describir y revelar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que podrían ser utilizadas en conexión con la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este sentido se debe interpretar como una admisión que los inventores no tienen derecho a anteceder a dicha divulgación, en virtud de la invención previa o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones relativas a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para las solicitantes y no constituyen admisión alguna sobre la exactitud de las fechas o contenidos de estos documentos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0060] **Las Figs. 1A-1B** muestran los datos que indican que diversas fuentes de carbono permiten la mortandad de *P. aeruginosa* persistentes por tobramicina. La *P. aeruginosa* persistentes se seleccionaron por selección quinolona. Las persistentes luego se sometieron a diversas fuentes de carbono de la vía de Entner-Doudoroff, vía de la fosfato pentosa y el ciclo del ácido tricarboxílico, así como también la molécula puente entre la β -oxidación y el ciclo TCA (e.g, propionato). **La FIG. 1A** muestra la supervivencia de las persistentes a las 4 horas de incubación en presencia de la fuente de carbono y tobramicina. **La FIG. 1B** muestra el porcentaje en el tiempo de persistentes después del tratamiento con fumarato y diferentes clases de antibióticos.

[0061] **Las Figs. 2A-2B** muestran los datos que indican que el fumarato permite la mortandad de *P. aeruginosa* en fase estacionaria por tobramicina. **La FIG. 2A** muestra la potenciación de la tobramicina con dosis crecientes de fumarato. La concentración de la tobramicina de 40mg/L es una concentración sérica máxima típica lograda por administración i.v. **La FIG. 2B** muestra las dosis crecientes de la tobramicina que alcanzaron la mortandad más alta cuando se administra con fumarato.

[0062] **Las figuras. 3A-3F** demuestran la potenciación a base de metabolitos de los aminoglucósidos en células en fase estacionaria de la *P. aeruginosa*. **La FIG. 3A** muestra que la selección de los compuestos del metabolismo intermediario se hizo para evaluar la potenciación de la tobramicina (TBR), incluyendo la glicólisis, la vía de Pentosa, el ciclo del ácido tricarboxílico, que comprende la derivación del glioxilato y los compuestos fuera de él, así como un enlace con la β -oxidación. **La FIG. 3B** muestra la supervivencia en CFU por ml

para las células no tratadas (sin AB) y las células tratadas con tobramicina (TBR) en una concentración de 40 [mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RIB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), α -cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP), mpmptse en fase estacionaria, las concentraciones de fuentes de carbono fueron emparejados para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 3C** muestra los efectos de fumarato (FMR) y glioxilato (GLX) que fueron comparados sin fuente de carbono con una dosis más alta de tobramicina (320 [mg/l]). **La FIG. 3D** muestra la cinética de potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina sola, el fumarato solo o sin tratamiento. **La FIG. 3E** muestras las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40mg/L] se graficaron para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 3F** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[0063] Las figuras. 4A-4E demuestran la potenciación a base de metabolito de aminoglucósidos en *P. aeruginosa* persistentes. **La FIG. 4A** muestra el establecimiento de persistencia por selección de la ciprofloxacina; las condiciones incluyen, sin tratamiento (línea de color negro, ) , 5 mg/l () , 10 mg/l () , 20 mg/l () , 40 mg/l () de ciprofloxacina. **La Fig. 4B** muestra un panel de metabolitos que también se ensayó para la potenciación de la tobramicina (TBR) en una concentración de [40 mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RLB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), α -cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP). Las concentraciones de las fuentes de carbono fueron emparejadas para tener 60

mM de carbono. **La FIG. 4C** muestra la cinética de la potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina. **La FIG. 4D** muestra las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40 mg/L] graficadas para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 4E** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[0064] **Las FIG. 5A-5E** demuestran la potenciación en contextos clínicos relevantes. **Las Figs. 5A-5B Muestran** las curvas de mortandad para células en fase estacionaria de pacientes CF derivadas de cepas no mucoides tratadas con dosis crecientes de la tobramicina y sin fuentes de carbono (CTRL), el fumarato (FMR) o piruvato (PRV). **La FIG. 5C** muestra las mismas curvas de mortandad con un paciente CF derivada de cepas no mucoides. **La FIG. 5D** muestra las mismas curvas de mortandad con una cepa derivada de pacientes CF con un alto perfil de resistencia a los antibióticos. **La FIG. 5E** muestra la mortandad antibiótica de biopelículas con tobramicina (TBR) sin fuente de carbono adicional (CTRL) o fumarato (FMR).

[0065] **Las figuras. 6A-6D** demuestran la potenciación de las fuentes de carbono que provocan aumento en la absorción de la tobramicina a través de la acumulación PMF. **La FIG. 6A** muestra las medidas con base en la citometría de flujo de la tobramicina etiquetada con fluorescencia en células PAO1, tratadas respectivamente, con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6B** muestra la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células PAO1 tratadas respectivamente con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6C** muestra la evaluación de la criometría de flujo de la absorción de la tobramicina en

ausencia o presencia de un inhibidor de PMF (NaN_3). La FIG. 6D muestra la evaluación mediante el ensayo de supervivencia del impacto de varios inhibidores de PMF en la letalidad de la tobramicina en fase estacionaria tratada con fuentes de carbono.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0066] Las composiciones, enfoques y métodos descritos en el presente documento proporcionan métodos económicos y eficientes para mejorar el tratamiento de las infecciones crónicas y reducir, retrasar o inhibir la formación de biopelículas. Estos métodos novedosos se adaptan fácilmente a los entornos clínicos puesto que la toxicidad y la eficacia de los antibióticos y metabolitos utilizados ya han sido estudiados *in vivo*, y puesto que ya han sido establecidas las dosificaciones tanto para los antibióticos y metabolitos. Estos enfoques y métodos terapéuticos también son útiles con productos químicos no metabólicos que inducen la fuerza protón-motriz en bacterias. Además, los enfoques y métodos descritos en este documento de inducción de la fuerza protón-motriz se pueden utilizar para potenciar otras clases de antibióticos que también requieren fuerza protón-motriz para la captación.

[0067] Hay algunos métodos para eliminar las bacterias persistentes. El campo antimicrobiano se centra principalmente en el desarrollo de nuevos antibióticos, que es lento y costoso, ya que requiere el descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas y posteriores experimentos *in vivo* de toxicidad y eficacia para los antibióticos candidatos. Los enfoques y métodos descritos en este documento mejoran los antibióticos existentes, a través de comprender el mecanismo de su actividad, y el desarrollo de adyuvantes que estimulan la PMF o variantes de estos, tal como, por ejemplo, acetato, citrato, isocitrato, α -

cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, que inducen la fuerza protón-motriz.

[0068] En consecuencia, el presente documento proporciona combinaciones novedosas de los aminoglucósidos y adyuvantes que estimulan la fuerza protón-motriz para uso en las composiciones y métodos terapéuticos, como el tratamiento por vía intravenosa y tópica de infecciones crónicas, incluyendo, por ejemplo, la formación de biopelículas durante o después de las intervenciones quirúrgicas. Además de tales usos terapéuticos, las combinaciones de los aminoglucósidos y los adyuvantes que estimulan la PMF descritos en este documento son útiles para composiciones y métodos de la eliminación y la reducción de biopelículas y bacterias persistentes en lugares sin tratamiento, tal como, por ejemplo, superficies contaminadas de bacterias, bacterias en fase planctónica y líquidos.

Aminoglucósidos y compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz

[0069] En algunos aspectos este documento proporciona, composiciones, tal como composiciones terapéuticas, que comprende una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF o adyuvantes que estimulan la fuerza protón-motriz.

[0070] Tal como se utiliza en este documento, el término "antibiótico aminoglucósido" se refiere a cualquier fármaco de origen natural, o un derivado semi-sintético o sintético, que comprende un anillo de aminociclitol altamente conservados (anillo II), que es una estructura central que está unida a varios restos de azúcar amino-modificados, que tiene actividad antibiótica, según se

define el término en este documento. La capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de, o mortandad de, uno o más microorganismos se denomina aquí como "actividad antibiótica". El anillo aminociclitol está compuesto principalmente de 2-deoxiestreptamina (2-DOS) y tiene funcionalidad 1,3-diamino y tres o cuatro grupos hidroxilo que proporcionan puntos de anclaje para los restos de aminoazúcar. Los aminoglucósidos se pueden dividir en 3 subclases dependiendo del patrón de sustitución: 4 monosustituídos, o 4,5- o 4,6- disustituídos. Los aminoglucósidos en cada subclase muestran una estrecha semejanza estructural. Los aminoglucósidos tienen varios mecanismos de actividad antibiótica, incluyendo, pero no limitado a, la inhibición de la síntesis de proteínas; la interferencia con los procesos de corrección durante la traducción, y causan un aumento en la tasa de error en la síntesis con la terminación prematura; inhiben la translocación ribosomal cuando el peptidil-tRNA se mueve del sitio-A al sitio-P; rompen la integridad de la membrana celular bacteriana; y/o se unen a la subunidad 30S ribosomal bacteriana.

[0071] Los aminoglucósidos tiene actividad antibiótica contra las infecciones que implican, bacterias aeróbicas Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*. Además, algunas micobacterias, incluyendo las bacterias que causan la tuberculosis, son susceptibles a los aminoglucósidos. Los aminoglucósidos también son útiles para el tratamiento empírico de las infecciones graves, como, por ejemplo, la septicemia, infecciones intra-abdominales, infecciones del tracto urinario, e infecciones del tracto respiratorio, incluyendo las infecciones de las vías respiratorias nosocomiales. Las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas y bacterias atípicas (e.g., micoplasma, clamidia y micobacterias) también se pueden tratar con aminoglucósidos, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes de los aminoglucósidos

útiles en las composiciones y métodos descritos en el presente documento incluyen estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, tobramicina, neomicina B, neomicina C, framisetina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina, lividomicina, y derivados de los mismos de cada uno de estos antibióticos aminoglucósidos, incluyendo derivados sintéticos y semi-sintéticos. Las estructuras químicas de las tres clases representativas de los antibióticos aminoglucósidos ejemplares y sus sitios de sustitución para uso en los métodos y composiciones descritos en este documento se proporcionan a continuación. Tal como se entiende por un versado en el arte, cualquier compuesto o derivado que tenga variaciones de las estructuras químicas proporcionadas más adelante, y que tengan actividad antibiótica, son adecuados para uso en las implementaciones de los métodos y composiciones proporcionados en este documento (ver, por ejemplo, "Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and aminoglycoside Mimics," Chittapragada M. *et al*, Perspectives in Medicinal Chemistry, 2009: 3 21-37, los contenidos de los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad).

Sustitución	Anillo I	Anillo II	Anillo III, IV; V	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Aminoglucósido
4-monosustituido				NH ₂	OH	H	H	Neamina Paromamina
4,5-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Apramicina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Ribostamicina Butirosin B
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Neomicina B Paromomicina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Lividomicina A
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Kanamicina A Kanamicina B Kanamicina C Tobramicina Amikacina
4,6-disustituido				NH ₂	OH	H	H	Gentamicina C1 Gentamicina C2 Gentamicina C1A Geneticina

[0072] Por consiguiente, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina. La estreptomicina es un inhibidor de la síntesis de proteínas, y se une a la subunidad pequeña 16S rRNA de la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, interfiriendo con la unión del formil-metionil-tRNA a la subunidad 30S. Esto conduce a la mala interpretación de codones, la eventual inhibición de la síntesis de proteínas y en última instancia, la mortandad de las células microbianas a través de mecanismos que todavía no se entienden. La estreptomicina es un antibiótico que inhibe las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y por lo tanto es un antibiótico de amplio espectro útil. Las infecciones

crónicas a modo de ejemplo que pueden ser tratadas utilizando las composiciones y métodos descritos en este documento que comprende la estreptomicina como el antibiótico aminoglucósido incluyen, pero no se limitan a, la endocarditis infecciosa causada por *Enterococcus* cuando el organismo no es sensible a gentamicina, tuberculosis en combinación con otros fármacos anti-TB, y la peste (*Yersinia pestis*). La estreptomicina también es útil en las composiciones y métodos descritos en este documento para uso en aplicaciones de medicina veterinaria, como en los tratamientos contra las bacterias Gram-negativas en animales de gran tamaño (e.g, caballos, vacas, ovejas, etc.). La estreptomicina también se puede utilizar, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, como un pesticida, para combatir el crecimiento de bacterias, hongos y algas. La estreptomicina inhibe/reduce las enfermedades bacterianas y fúngicas de determinadas frutas, verduras, semillas y cultivos ornamentales, e inhibe/reduce las algas en estanques ornamentales y acuarios, así como también inhibe/reduce el fuego bacteriano en arboles de manzanas y peras.

[0073] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la kanamicina o la kanamicina A. La kanamicina interactúa con la subunidad 30S de los ribosomas procariotas. La kanamicina A induce cantidades sustanciales de error de traducción e indirectamente inhibe la translocación durante la síntesis de proteínas. La kanamicina A está disponible en formas orales, intravenosas, e intramusculares; se pueden administrar a través de la formulación de aerosol o de riego, y se puede utilizar para tratar una amplia variedad de infecciones; y se utiliza en forma del sulfato.

[0074] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la gentamicina. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido, utilizado para tratar muchos tipos de infecciones bacterianas, especialmente las causadas por organismos Gram-negativos. La gentamicina es un antibiótico bactericida que funciona, en parte, por unión a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, interrumpiendo la síntesis de proteínas. Al igual que otros aminoglucósidos, cuando la gentamicina se administra por vía oral, no es activa sistémicamente. Esto se debe a que no se absorbe de una manera apreciable desde el intestino delgado. La gentamicina se puede administrar por vía intravenosa, por vía intramuscular o por vía tópica para tratar infecciones, en diferentes implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento. Parece ser eliminada por completo sin cambios en la orina. La gentamicina es uno de los pocos antibióticos termoestables que permanecen activas incluso después de la esterilización en autoclave, lo que hace que sea particularmente útil en la preparación de algunos medios de crecimiento microbiológico. Se puede utilizar, por ejemplo, durante la cirugía ortopédica cuando se requieren altas temperaturas para el establecimiento de cementos (e.g, prótesis de cadera). La gentamicina es activa contra una amplia gama de infecciones bacterianas humanas, incluyendo la mayoría de las bacterias Gram-negativas, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, y las especies de *Staphylococcus* Gram-positivos. La gentamicina también es útil contra *Yersinia pestis*, sus parientes, y *Francisella tularensis* (el organismo responsable de la tularemia visto a menudo en los cazadores y/o tramperos).

[0075] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina. La tobramicina es un antibiótico aminoglucósido con actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La tobramicina actúa inhibiendo la síntesis de

proteínas en las células bacterianas. Se ha demostrado que la tobramicina es activa contra la mayoría de las cepas de los siguientes organismos tanto *in vitro* como en infecciones clínicas: microorganismos Gram-positivo aeróbicos y facultativos, incluyendo, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*; microorganismos Gram negativos aeróbicos y facultativos, incluyendo, por ejemplo, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella morgan ii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp.*, y *Serratia sp.*

[0076] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es netilmicina. La netilmicina no se absorbe en el intestino y por lo tanto se puede administrar por inyección o infusión. Se puede utilizar en el tratamiento de infecciones graves en particular las resistentes a la gentamicina.

[0077] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es Sisomicina (BACTOCEAZE o ENSAMYCIN), aislado de especies de caldo de fermentación de una del género *Micromonospora*, Es un nuevo aminoglucósido de amplio espectro, la mayoría estructuralmente relacionado con la gentamicina. La sisomicina es un aminoglucósido predeciblemente activo contra bacterias Gram-positivas. Al igual que otros aminoglucósidos, la sisomicina es bactericida para los aislados clínicos sensibles. Las Concentraciones Bactericida Mínimas (MBC) para la Sisomicina se ha encontrado que son equivalentes o muy cercanas a las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (MIC). La mayoría de los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* siguen siendo susceptibles a la sisomicina.

[0078] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es arbekacina, un antibiótico aminoglucósido semisintético. Se utiliza principalmente para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes, incluyendo el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). La Arbekacina fue originalmente sintetizada a partir de la dibecacina en 1973. Se ha registrado y comercializado en Japón desde 1990 bajo el nombre comercial HABEKACIN. Las versiones genéricas del fármaco también están disponibles bajo nombres comerciales tal como DECONTASIN y BLUBATOSINE. La Arbekacina se utiliza para el tratamiento a corto plazo de las infecciones bacterianas multi-resistentes, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), así como las bacterias entéricas y otras eubacterias. La Arbekacina funciona mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S bacterianas, provocando la mala interpretación del t-RNA lo cual, en consecuencia, deja a la bacteria incapaz de sintetizar proteínas vitales para su crecimiento. Específicamente, la arbekacina se une a cuatro nucleótidos de 16S rRNA y un solo aminoácido de la proteína S12. Esto interfiere con el sitio de decodificación en el entorno del nucleótido 1400 en 16S rRNA de la subunidad 30S. Esta región interactúa con la base oscilante en el anticodón de tRNA. Esto conduce a la mala interpretación del mRNA por lo tanto se insertan los aminoácidos incorrectos en el polipéptido que conduce a los péptidos no funcionales o tóxicos y la ruptura de los polisomas en monosomas no funcionales. La Arbekacina, como otros aminoglucósidos, no se absorbe bien en el tracto gastrointestinal. Su absorción se mejora notablemente por la administración parenteral. La duración normal de la terapia con el antibiótico aminoglucósido arbekacina IM o IV es de 7-10 días, aunque algunas veces puede ser necesaria una duración mayor.

[0079] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la amikacina, un antibiótico aminoglucósido utilizado para tratar diferentes tipos de infecciones bacterianas. La Amikacina funciona mediante la unión a la subunidad ribosómica 30S bacterianas, provocando lectura errónea del mRNA y dejando a la bacteria incapaz de sintetizar proteínas vitales para su crecimiento. La amikacina se utiliza a menudo para las bacterias Gram-negativas tal como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*, incluyendo, por ejemplo, el tratamiento de infecciones graves, adquiridas en el hospital con resistencia a múltiples fármacos de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacter*. También se incluyen en el espectro la *Serratia marcescens* y la *Providencia stuartii*. La Amikacina también se puede utilizar para tratar las infecciones de micobacterias no tuberculosas y la tuberculosis, cuando los fármacos de primera línea no pueden controlar la infección. La amikacina se puede combinar, en algunas formas de implementación, con un antibiótico de beta-lactama para el tratamiento empírico de las personas con neutropenia y fiebre. En algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento, la amikacina puede combinarse o administrarse con fosfomicina (también conocido como fosfomicina, fosfonomicina y los nombres comerciales Monurol y MONURIL), para el tratamiento de ciertas infecciones, tal como, por ejemplo, infección del tracto urinario.

[0080] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es neomicina. La neomicina se utiliza mayoritariamente como una preparación tópica, tal como NEOSPORIN. También puede, en algunas implementaciones, administrarse por vía oral. La neomicina no se absorbe desde el tracto gastrointestinal y se ha utilizado como una medida preventiva para la encefalopatía hepática e

hipercolesterolemia. La mortandad bacteriana en el tracto intestinal, mantiene los niveles de amoníaco bajos y evita la encefalopatía hepática, especialmente antes de la cirugía GI. También se ha utilizado para tratar la proliferación bacteriana del intestino delgado. Similar a otros aminoglucósidos, la neomicina tiene una excelente actividad frente a bacterias Gram-negativas, y tiene actividad parcial contra las bacterias Gram-positivas. No se administra por vía intravenosa, puesto que la neomicina es extremadamente nefrotóxica (provoca daño renal), especialmente en comparación con otros aminoglucósidos. La excepción es cuando se incluye la neomicina, en cantidades muy pequeñas, como conservante en algunas vacunas - típicamente 0.025 mg por dosis.

[0081] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es framicitina. La Framicetina se vende comúnmente como SOFRAMYCINA y SOFRA-TULLE. También existe en productos veterinarios, como framicitina sulf. Al igual que la neomicina, la framicitina tiene mala absorción sistémica. Se puede utilizar en las preparaciones tópicas para las infecciones de la piel, nariz, oídos y los ojos, por ejemplo, en combinación con otros fármacos antibacterianos y corticosteroides, en algunas implementaciones. También se puede utilizar para las infecciones gastrointestinales, en algunas implementaciones.

[0082] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es paromomicina (nombre de marca HUMATIN), primer aislado de *Streptomyces krestomuceticus* en la década de 1950. También se le llama monomicina y aminosidina. La paromomicina es un antibiótico diseñado para combatir las infecciones intestinales tal como la criptosporidiosis, la amebiasis, y leishmaniasis. La vía de

administración de la paromomicina puede ser la inyección intramuscular y la cápsula, en algunas implementaciones.

[0083] En este documento se proporcionan, en algunas implementaciones, combinaciones de antibióticos aminoglucósidos y otros antibióticos para la potenciación de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Tal como se usa en este documento, el término "antibiótico" se refiere a cualquier compuesto conocido por un versado en el arte que inhibirá o reducirá el crecimiento de, o la mortandad a, uno o más microorganismos, incluyendo especies bacterianas y especies de hongos. Muchos compuestos antibacterianos son relativamente pequeñas moléculas con un peso molecular de menos de 2000 unidades de masa atómica. El término "antibiótico" incluye modificaciones semi-sintéticas de diversos compuestos naturales, tal como, por ejemplo, los antibióticos beta-lactámicos, que incluyen penicilinas (producidas por hongos del género *Penicillium*), las cefalosporinas, las monobactamas, y los carbapenems. En consecuencia, el término "antibiótico" incluye, pero no se limita a, aminoglucósidos (e.g, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β -lactamas (e.g., penicilinas, cefalosporinas, monobactams, y carbapenems), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g, eritromicina), lincosamidas (e.g, clindomicina), cloranfenicoles, tetraciclinas, anfotericinas, cefazolinas, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos. El antibiótico utilizado en adición al antibiótico aminoglucósido en las diversas implementaciones de las composiciones terapéuticas y métodos descritos en el presente documento dependerá del tipo de infección bacteriana.

[0084] Como se ha demostrado en este documento, los inventores han descubierto que los compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz, tal como

altas concentraciones locales (e.g, al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos, 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias) de determinados metabolitos, inesperadamente mejora la eficacia de los antibióticos aminoglucósidos conocidos, proporcionando de este modo una combinación novedosa de las mismas composiciones y métodos para el tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes. Los métodos y composiciones descritos en este documento se formulan para asegurar que una cantidad efectiva de un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) alcance el sitio de la infección, superando así, por ejemplo, las cantidades disminuidas significativamente conocidas de la glucosa en la sangre que normalmente se encuentran en el sitio de una infección. De acuerdo con ello, las composiciones y métodos descritos en la presente invención comprenden una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) o adyuvantes, en adición al antibiótico aminoglucósido.

[0085] Las frases "compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)", "adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)" o "adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF)", como se usa en este documento, se refieren a un agente o compuesto, que incluye un metabolito, que causa o facilita un aumento cualitativo o cuantitativo en o estimula gradientes de protones utilizados para generar energía potencial quimiosmótica en células conocida como una "fuerza protón-motriz", donde se utiliza la energía potencial para la síntesis de ATP por la

fosforilación oxidativa. Sin desear estar limitado por la teoría, mediante el aumento de la fuerza protón-motriz en bacterias persistentes, los inventores han descubierto que esto aumenta o potencia la absorción de antibióticos aminoglucósidos y la mortandad de las bacterias a través del catabolismo de las fuentes de carbono y aumento de la oxidación de NADH.

[0086] De acuerdo con ello, un compuesto o adyuvante que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) puede aumentar o estimular la PMF en una célula, tal como una célula bacteriana, por aproximadamente al menos 10% o más, al menos 20% o más, al menos 30% o más, al menos 40% o más, al menos 50% o más, al menos 60% o más, al menos 70% o más, al menos 80% o más, al menos 90 % o más, al menos 95% o más, al menos 100%, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 25 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor y todas las cantidades en el medio, en comparación con un nivel PMF de referencia o control en ausencia del compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF), o en presencia del antibiótico aminoglucósido solo. Los métodos y ensayos para identificar tales compuestos que estimulan la PMF se pueden basar en cualquier método conocido para un versado en el arte, se encuentran en todo el documento, en los dibujos, y en la sección de Ejemplos, tal como los ensayos de potenciación de metabolitos descritos en las Figuras 1A-1B y 2A-2B, por ejemplo.

[0087] Tal como se utiliza en este documento, el término "adyuvante" se refiere a un agente que mejora el efecto farmacéutico de otro agente, tal como un antibiótico aminoglucósido. Los compuestos que estimulan la PMF como se describen en este documento funcionan como adyuvantes de los antibióticos aminoglucósidos, mediante el mejoramiento del efecto de los antibióticos aminoglucósidos por aproximadamente al menos 10% o más, al menos 20% o

más, al menos 30% o más, al menos 40 % o más, al menos 50% o más, al menos 60% o más, al menos 70% o más, al menos 80% o más, al menos 90% o más, al menos 95% o más, al menos 100%, al menos 2 veces mayor, al menos 5 veces mayor, al menos 10 veces mayor, al menos 25 veces mayor, al menos 50 veces mayor, al menos 100 veces mayor, al menos 1000 veces mayor y todas las cantidades en el medio, en comparación con el uso del antibiótico aminoglucósido solo.

[0088] Los términos "agente" y "compuestos que estimula la PMF" se usan indistintamente en este documento y se refieren a cualquier compuesto o sustancia tal como, pero no limitados a, una molécula pequeña, ácido nucleico, un aminoácido, un metabolito o análogo de la misma, polipéptido, péptido, fármaco, ion. etc. Un "agente" puede ser cualquier producto químico, entidad, o resto, incluyendo, sin limitación entidades proteináceas y no proteináceas, sintéticas y de origen natural. En algunas implementaciones, un agente es un ácido nucleico, un análogo de ácido nucleico, una proteína, un anticuerpo, un péptido, un aptámero, un oligómero de ácidos nucleicos, un aminoácido, o un carbohidrato, e incluye, sin limitación, proteínas, oligonucleótidos, ribozimas, enzimasDNA, glicoproteínas, siRNAs, lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos, etc. En ciertas implementaciones, como descritos en este documento, los agentes son metabolitos. Los compuestos pueden ser conocidos por tener una actividad y/o propiedad deseada, por ejemplo, potenciar la actividad aminoglucósida, o pueden ser seleccionados de una biblioteca de diversos compuestos, el uso de métodos de detección conocido por alguien de ordinario versado en el arte.

[0089] Tal como se utiliza en este documento, el término "molécula pequeña" se refiere a un agente químico que puede incluir, pero no se limita a, un péptido,

un peptidomimético, un aminoácido, un análogo de aminoácido, un polinucleótido, un análogo de polinucleótido, un aptámero, un nucleótido, un análogo de nucleótido, un compuesto orgánico o inorgánico (e.g, incluyendo compuestos heteroorganicos y organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular menor de aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente aceptables de tales compuestos.

[0090] Por consiguiente, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) es un metabolito intermedio o un estímulo metabólico, tal como, por ejemplo, un compuesto o una de sus variantes asociadas al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), la vía β -oxidativa, la vía catabólica de aminoácidos, el ciclo de la urea, y las vías de catabolismo de los lípidos. Los metabolitos adicionales que se pueden utilizar en combinación con un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, azúcares y sus análogos, tal como, glucosa, manitol, y fructosa, y análogos de los mismos. Por ejemplo, estos pueden ser utilizados en combinación con los metabolitos, tal como acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato. En algunas formas de implementación, los metabolitos para uso como compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido

propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato, y análogos o derivados de los mismos.

[0091] En algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento, la concentración efectiva de un compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) que se usa (e.g, la concentración local logrado por la administración) es al menos 2,5 mM, al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 40 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 70 mM o mayor, al menos 80 mM o mayor, al menos 90 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias. En algunas implementaciones, las concentraciones citadas a lo largo de la descripción del documento son concentraciones locales (e.g., en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF a administrar. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto es bien conocida dentro de las habilidades de un versado en el arte.

[0092] En algunas implementaciones, las concentraciones de metabolitos y estímulos metabólicos para ser entregados como se ha indicado anteriormente son aún más normalizadas por el número de moléculas de carbono que entran en el ciclo TCA. En un ejemplo, la cantidad de moléculas de carbono que entran en el

ciclo de TCA se normaliza a 60 mM de carbono. Para este ejemplo, el metabolito isoleucina, que contiene 6 moléculas de carbono, se administra a una concentración de aproximadamente 10 mM. Como otro ejemplo, el metabolito ácido metilmalónico, que contiene 4 moléculas de carbono, se administra a una concentración de aproximadamente 15 mM. Una persona versada en el arte puede calcular fácilmente la concentración normalizada a administrar con base en el número de moléculas de carbono en el metabolito a administrar.

[0093] Los análogos de glucosa que se pueden usar en algunas implementaciones de los métodos y composiciones descritos en este documento son conocidos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, derivados de glucosa, tal como D - (+) - 2-desoxiglucosa, D - (+) - 2-amino-2-desoxi-glucosa o N-acetil D - (+) - 2-amino-2-desoxiglucosa; derivados de D-manosa y manosa; D-glucosa y derivados de D-glucosa, incluyendo, pero no limitado a D-3-amino-3-desoxi-glucosa y D-2-amino-2-desoxi-glucosa; y D-galactosa y derivados de galactosa incluyendo, pero no limitado a D-2-desoxi-D-galactosa, D-4-amino-4-desoxi-galactosa y D-2-amino-2-desoxi-galactosa. La glucosa o restos de glucosa por lo tanto, se pueden diferenciar de la D-glucosa o un derivado tal como 2-DG y 2-glucosanina que es un epímero de la misma. Además, la glucosa o el resto análogo de la glucosa puede ser un derivado fluorado de cualquiera de los compuestos anteriores. Por otra parte, el oxígeno en el anillo de cualquiera de los compuestos anteriores puede estar sustituido con un isómero seleccionado del grupo que consiste de S, sulfona, y los similares. Por ejemplo, el análogo de la glucosa puede ser 5-tio D-glucosa o un derivado del mismo. El término "análogo de la glucosa" incluye también los derivados de glucosa, incluyendo, pero no limitado a, derivados que tienen grupos acilo (C1-C12) o grupos alquilo (C1-C12) unidos vía grupos --O-- o -NH- a las posiciones 3- y 4- moléculas de glucosa.

Además, el derivado de glucosa puede tener un efector de solubilidad o de partición o componente unido en las posiciones 1-, 3- o 4-.

[0094] El tipo de infección bacteriana que se está tratando se puede utilizar para determinar, en algunas implementaciones, que combinación particular de antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF a ser dada o administrada a un sujeto, utilizando los métodos y composiciones descritos en este documento. Por ejemplo, en algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el antibiótico aminoglucósido es la gentamicina y el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es manitol. En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es tobramicina y el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es fumarato. En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es tobramicina, por ejemplo, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es succinato, citrato, oxaloacetato, piruvato, glucosa, fructosa, manitol, ribosa, arabinosa, gluconato o propionato. En otra implementación, un compuesto o metabolito que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se puede utilizar en combinación con al menos un compuesto adicional que estimula la PMF para potenciar el efecto de un antibiótico aminoglucósido.

[0095] En algunas implementaciones, los metabolitos o compuestos utilizados con los métodos descritos en este documento son metabolitos o compuestos dentro de la vía del ácido tricarboxílico en sí misma, o son metabolitos o compuestos (e.g, fuentes de carbono) de otras vías metabólicas que se alimentan en el ciclo del ácido tricarboxílico (e.g. β -oxidación de los ácidos grasos, el ciclo de

la urea, etc.). Los términos "ciclo del ácido tricarboxílico", "ciclo TCA", "El ciclo del ácido cítrico" y "el ciclo de Krebs" se usan indistintamente en este documento.

[0096] En algunas implementaciones, una combinación de metabolitos o compuestos que se administran entran en los diferentes niveles del ciclo del ácido tricarboxílico. Por ejemplo, la glucosa (o piruvato o acetato) se pueden combinar con fumarato (o aspartato o tirosina o fenilalanina).

Infecciones crónicas o persistentes y métodos de tratamiento o inhibición de estas.

[0097] Como se ha demostrado en este documento, la administración de una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar en métodos de tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes. Las infecciones en las cuales las bacterias son o bien de crecimiento lento, persistentes o en biopelícula plantean un serio reto clínico para la terapia ya que las células en estos estados exhiben tolerancia a la actividad de los agentes antimicrobianos, tal como antibióticos. La Osteomielitis, endocarditis infecciosa, heridas crónicas, infecciones relacionadas con dispositivos en la vivienda, infecciones resultantes de quemaduras de segundo y tercer grado, y las infecciones bacterianas secundarias a complicaciones de afecciones respiratorias o de las mucosas, tal como las derivadas de la fibrosis quística, sinusitis e infecciones virales, son ejemplos no limitantes de infecciones que albergan células bacterianas persistentes. Debido a que la mayoría de los agentes antimicrobianos ejercen una actividad máxima contra las células que se dividen rápidamente, las terapias antimicrobianas para estas infecciones no son óptimas, lo que requiere tiempos de tratamientos prolongados, dosis altas de antibióticos y algunas veces tóxicas, y que

demuestran tasas de fracaso más altas. Sin desear estar limitado por la teoría, los nuevos métodos y composiciones descritos en este documento, que se combinan con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF, permite mayor eficacia de los antibióticos aminoglucósidos conocidos, mediante la mejora de su absorción a través de la estimulación PMF en células bacterianas, tal como células persistentes.

[0098] Por consiguiente, en algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para el tratamiento de una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante. Los métodos descritos en este documento pueden, en algunos aspectos y formas de implementación, ser utilizados para inhibir, retrasar la formación de, tratar y/o prevenir o proporcionar tratamiento profiláctico de las infecciones crónicas e infecciones por bacterias persistentes, incluyendo infecciones bacterianas causadas por el crecimiento lento, en fase estacionaria o bacterias que forman biopelícula en animales, incluyendo seres humanos.

[0099] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para inhibir una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00100] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para prevenir una infección bacteriana crónica o persistente, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene o está en riesgo de una infección bacteriana crónica o persistente una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00101] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para tratar un sujeto que tiene una infección causada por células bacterianas persistentes, los métodos que comprenden administrar a un paciente que tiene una infección causada por células bacterianas persistentes una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00102] En algunos aspectos, los métodos proporcionados en este documento para tratar una infección bacteriana crónica o persistente, que comprende: administrar a un paciente que tiene una infección bacteriana crónica o persistente y someter a tratamiento con un antibiótico aminoglucósido, una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz como un adyuvante.

[00103] Los términos "célula persistente" o "células bacterianas persistentes" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a una subpoblación de microorganismos metabólicamente latente, típicamente bacterias, que no son sensibles a los agentes antimicrobianos tal como antibióticos. Las persistencias normalmente no son sensibles, i.e., no se mueren o inhiben por los antibióticos, ya que tienen, por ejemplo, no letalmente reguladas corriente abajo las vías en las

que los antibióticos actúan. Las persistentes pueden desarrollarse en concentraciones no letales (o sub-letales) del antibiótico.

[00104] En algunas formas de implementación de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido se selecciona de estreptomicina, gentamicina, kanamicina A, neomicina B, neomicina C, frameticina, paromomicina, ribostamicina, amikacina, arbekacina, bekanamicina (kanamicina B), dibekacina., tobramicina, espectinomicina, higromicina B, sulfato de paromomicina, netilmicina, sisomicina, isepamicina, verdamicina, astromicina, neamina, ribostamicina, paromomicina, y lividomicina. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido se selecciona de estreptomicina, gentamicina y kanamicina A. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la tobramicina.

[00105] En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es un metabolito o un estímulo metabólico, tal como, por ejemplo, un compuesto que entra o es un metabolito en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la vía β -oxidativa, el ciclo de la urea, el ciclo catabólico de aminoácidos, o en una vía catabólica de los lípidos, o una variante de las mismas. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se selecciona de acetato, citrato, isocitrato, α -cetoglutarato, succinato, fumarato, malato, y oxaloacetato. En algunas implementaciones, los metabolitos para uso como compuestos que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) en las composiciones y métodos descritos en este documento incluyen, pero no se

limitan a, alanina, cisteína, serina, valina, treonina, isoleucina, metionina, aspartato, tirosina, fenilalanina, arginosuccinato, ácido metilmalónico, ácido propiónico, ácido acetoacético, hidroxibutirato y análogos o derivados de los mismos. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, el compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es propionato.

[00106] Tal como se usa en este documento, los términos "inhibir", "disminuir", "reducir", "que inhibe" e "inhibición" tienen sus significados normales y habituales para significar generalmente una disminución en una cantidad estadísticamente significativa, e incluyen inhibir el crecimiento o la división celular de una persistencia, crecimiento lento, fase estacionaria que causa una infección crónica, y/o bacterias de biopelículas, así como la mortandad de tales bacterias. Tal inhibición es una inhibición de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% del crecimiento de las bacterias frente al crecimiento de bacterias en ausencia de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Preferiblemente, la inhibición es una inhibición de aproximadamente al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, hasta incluyendo 100%, del crecimiento o la supervivencia de las bacterias en comparación con un nivel de referencia o control en ausencia de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF.

[00107] Los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente en este documento, y se refieren a un animal, por ejemplo un humano, receptores del antibiótico aminoglucósido y el uno o más compuestos que estimulan la PMF, tal

como, por ejemplo, tobramicina y fumarato. Para el tratamiento de los estados de enfermedad que son específicos para un animal específico, tal como un sujeto humano, el término "sujeto" se refiere a ese animal específico. Los términos "animales no humanos" y "mamíferos no humanos" se utilizan indistintamente en este documento, e incluyen mamíferos tal como ratas, ratones, conejos, ovejas, gatos, perros, vacas, cerdos y primates no humanos. El término "sujeto" también puede abarcar cualquier vertebrado incluyendo, pero no limitado a, mamíferos, reptiles, anfibios y peces.

[00108] Tal como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento", "que trata" o "de mejoramiento del" se refieren a los tratamientos terapéuticos, en el que el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, retardar o detener la progresión o la gravedad de una condición asociada con, una enfermedad o trastorno, tal como una infección crónica, e incluyen uno o más de: mejorar un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria o biopelículas en un sujeto; el bloqueo o la mejora de la repetición de un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto; la disminución de la gravedad y/o frecuencia de un síntoma de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto; y el estancamiento, disminución o inhibición del crecimiento de una infección crónica o persistente, crecimiento lento, infección bacteriana en fase estacionaria de biopelículas en un sujeto. El tratamiento significa mejorar, bloqueando, reduciendo, disminuyendo o inhibiendo por aproximadamente 1% a aproximadamente 100% en comparación con un sujeto que está siendo tratado con un antibiótico aminoglucósido pero en ausencia de una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Preferiblemente, la mejora, bloqueo, reducción, disminución o inhibición es aproximadamente al menos 5%, al

menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, hasta e incluyendo el 100% frente a un sujeto que está siendo tratado con un antibiótico aminoglucósido, pero en ausencia de tratamiento con una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. El tratamiento es generalmente considerado "efectivo" si uno o más síntomas o marcadores clínicos se reducen. Alternativamente, el tratamiento es "efectivo" si la progresión de una enfermedad se reduce o detiene. Es decir, el "tratamiento" incluye no solamente la mejora de los síntomas o marcadores, sino también un cese de al menos ralentización del progreso o empeoramiento de los síntomas que se esperarían en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de uno o más de los síntomas, disminución del grado de la enfermedad, estado estabilizado de la enfermedad (i.e., no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. El término "tratamiento" de una enfermedad incluye también el alivio de los síntomas o efectos secundarios de la enfermedad (incluyendo el tratamiento paliativo).

[00109] Tal como se utiliza en este documento, la frase "aliviar un síntoma de una infección persistente o crónica" es mejorar cualquier condición o síntoma asociado con la infección persistente. Alternativamente, el alivio de un síntoma de una infección persistente puede implicar la reducción de la relleno microbiana infecciosa (tal como bacteriana) en el sujeto en relación con tal relleno en un control no tratado. Cuando se compara con un control equivalente sin tratar, dicha reducción o grado de prevención es al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%, medido mediante cualquier técnica estándar.

Deseablemente, la persistencia de la infección es completamente curada cuando se detecta por cualquier método estándar conocido en el arte, en cuyo caso se considera que la infección persistente ha sido tratada. Un paciente que está siendo tratado por una infección persistente es aquel que un médico ha diagnosticado que tiene tal condición. El diagnóstico puede ser por cualquier medio adecuado. El diagnóstico y el seguimiento pueden implicar, por ejemplo, detectar el nivel de la relleno microbiana en una muestra biológica (por ejemplo, una biopsia de tejido, análisis de sangre, o de orina), detectar el nivel de un marcador sustituto de la infección microbiana en una muestra biológica, los síntomas de detección asociados con infecciones persistentes, o la detección de células inmunes implicadas en la respuesta inmune típica de infecciones persistentes (por ejemplo, la detección de antígeno específico de células T, o sus productos, por ejemplo, producción de anticuerpos).

[00110] Tal como se utiliza en este documento, los términos "prevenir" y "prevención" tienen sus significados normales y habituales, e incluyen uno o más de: prevenir la infección crónica o la colonización de una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto, o sobre una superficie o en un material poroso; prevenir un incremento en el crecimiento de una población de una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto, o sobre una superficie o en un material poroso; prevenir el desarrollo de una enfermedad causada por una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o biopelícula en un sujeto; y prevenir los síntomas de una infección crónica o enfermedad causada por una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula en un sujeto. Tal como se usa en este documento, la prevención tiene una duración de al menos aproximadamente 0,5 días, un día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 10 días, 12 días, 15 días, 20 días, 25 días, 30 días, 35 días, 40 días o más

días después de la administración o aplicación de la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos estimulantes de la PMF, como los descritos en este documento.

[00111] En algunas implementaciones de los métodos de tratamiento de infecciones bacterianas crónicas o persistentes o la inhibición del crecimiento de bacterias persistentes que se describen en este documento, el sujeto o superficie se puede administrar o poner en contacto con un segundo antibiótico al mismo tiempo o junto con la cantidad efectiva del antibiótico aminoglucósido y la cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. los segundos antibióticos adecuados incluyen, por ejemplo, linezolida, dapromicina, aminoglucósidos (e.g, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β p-lactamas (e.g, penicilinas, carbapenemas, monobactemas, y cefalosporinas), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g, eritromicinas), lincosamidas (e.g, clindamicina), cloramfenicoles, tetraciclinas, amfotericinas, cefazolinas, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos.

[00112] En algunos aspectos e implementaciones de los métodos de inhibición, el retraso de la formación, tratamiento, profilaxis y prevención de una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o de biopelícula descritos en este documento, los métodos se pueden utilizar para conseguir un efecto sistémico y/o local contra las bacterias relevantes, poco antes o después de un tratamiento médico invasivo, como la cirugía o la inserción de un dispositivo médico interno (e.g, el reemplazo de articulaciones (cadera, rodilla, hombro, etc.)). El tratamiento puede continuarse después del tratamiento médico invasivo, tal como después de la operación o durante el tiempo que el dispositivo está en el cuerpo.

[00113] En consecuencia, en algunos aspectos proporcionados en este documento son procedimientos para inhibir o prevenir la formación o la colonización de una bacteria persistente, de crecimiento lento, en fase estacionaria o de biopelícula en un sujeto antes, durante, o después de un tratamiento médico invasivo, que comprende administrar a un sujeto antes, durante y/o después de un tratamiento médico invasivo una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) como un adyuvante.

[00114] En algunas de tales implementaciones, el antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) puede administrarse una vez, dos veces, tres veces o más, a partir de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o más, hasta 10 horas, 9 horas, 8 horas, 7 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, o 1 hora o inmediatamente antes de la cirugía para permitir una presencia sistémica o local del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF). La composición farmacéutica o antibiótico aminoglucósido pueden, en algunas implementaciones, se administra después del tratamiento médico invasivo para un periodo de tiempo, tal como 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o más, o durante todo el tiempo en el que el dispositivo está presente en el cuerpo del sujeto.

[00115] Tal como se utiliza en este documento, el término "quincenal" se refiere a una frecuencia de cada 13-15 días, el término "mensual" se refiere una frecuencia de cada 28-31 días y "bimensual" se refiere una frecuencia de cada 58-62 días.

[00116] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la superficie de un dispositivo en la vivienda está recubierta por una solución, tal como a través de baño o pulverización, que contiene una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 500 mg/ml del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) descritos en este documento. En implementaciones particulares, los rangos más específicos de las concentraciones del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones específicas del antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 750 µg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 600 mg/ml, aproximadamente 750 mg/ml, y aproximadamente 900 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones citadas anteriormente y en toda la especificación son concentraciones locales (e.g, en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF para ser administrados. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe

administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto está dentro de las capacidades de un versado en el arte.

[00117] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la concentración del al menos un compuesto que estimula la fuerza protón-motriz (PMF) es al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias.

[00118] En otras formas de implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato es de al menos 5 mM o mayor, al menos 6 mM o mayor, al menos 7 mM o mayor, al menos 8 mM o mayor, al menos 9 mM o mayor; al menos 10 mM o mayor, al menos 11 mM o mayor, al menos 12 mM o mayor, al menos 13 mM o mayor, al menos 14 mM o mayor; al menos 15 mM o mayor, al menos 16 mM o mayor, al menos 17 mM o mayor, al menos 18 mM o mayor, al menos 19 mM o mayor; al menos 20 mM o mayor, al menos 25 mM o mayor, al menos 50 mM o mayor, al menos 60 mM o mayor, al menos 100 mM o mayor, al menos 500 mM o mayor, o más, o todos los rangos o cantidades intermedias. En una implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato es de aproximadamente 5 mM-25 mM,

entre 10 mM-20 mM, entre 10 mM-15 mM, o entre 15 mM-20 mM. En algunas implementaciones, la concentración de fumarato es 15 mM.

[00119] Cuando se aplica un dispositivo médico interno, la superficie puede estar recubierta por la solución que contiene un antibiótico aminoglucósido y al menos un compuesto que estimulan la fuerza protón-motriz (PMF) antes de su inserción en el cuerpo.

[00120] En algunas implementaciones de los métodos descritos en el presente documento, un sujeto se refiere a un sujeto humano que tiene una infección crónica o en mayor riesgo de una infección crónica o la formación de biopelícula. Un sujeto que tiene una infección crónica es un sujeto que tiene células bacterianas objetivamente medibles presentes en el cuerpo del sujeto. Un sujeto que tiene aumentado el riesgo de una infección crónica incluye sujetos con un dispositivo médico interno, por ejemplo, o un sujeto que tiene o ha tenido una intervención quirúrgica.

[00121] En algunas implementaciones de los aspectos descritos en este documento, los métodos de tratamiento de un sujeto que tiene una infección crónica o está en mayor riesgo de una infección crónica, comprende además la etapa de seleccionar, diagnosticar, o identificar el sujeto que tiene o que está en alto riesgo de infección crónica o la formación de biopelícula. En tales implementaciones, un sujeto se identifica por tener una infección crónica por determinación objetiva de la presencia de las células bacterianas en el cuerpo del sujeto por un versado en el arte. Tales determinaciones objetivas se pueden realizar a través de un solo uso o un uso combinado de análisis de tejido, análisis de sangre, análisis de orina, y cultivos de células bacterianas, además del

monitoreo de los síntomas específicos asociados con una infección crónica o la formación de biopelícula.

[00122] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, el sujeto que tiene o está en riesgo de una infección crónica es un sujeto inmunosuprimido, tal como, por ejemplo, los pacientes VIH-positivos, que han desarrollado o están en riesgo de desarrollar neumonía bien sea por una infección oportunista o por la reactivación de una infección latente o suprimida; sujetos con fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, y otras tales como pacientes inmunosuprimido y/o en instituciones.

[00123] Como se usa en este documento, "infecciones persistentes" se refiere a aquellas infecciones que, a diferencia de las infecciones agudas, no se eliminan efectivamente por una respuesta inmune del huésped o mediante la administración de antibióticos. Las infecciones persistentes incluyen, por ejemplo, infecciones latentes, crónicas y lentas. En una "infección crónica", el agente infeccioso está presente en el sujeto en todo momento. Sin embargo, los signos y síntomas de la enfermedad pueden estar presentes o ausentes durante un período prolongado de tiempo, y el agente infeccioso puede tener detectabilidad intermitente. Los ejemplos no limitantes de la infección crónica incluyen una variedad de infecciones bacterianas, como se describe a continuación en este documento, así como las infecciones bacterianas secundarias resultantes de o causadas por la infección con otro agente que suprime o debilita el sistema inmune o que deteriore la eliminación del moco o secreciones del huésped, tales como infecciones virales predisponentes agudas o crónicas, tal como, por ejemplo, hepatitis B (causada por virus de la hepatitis B (HBV)) y la hepatitis C (causadas por el virus de la hepatitis C (HCV) adenovirus, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus 1 del herpes simple, virus 2 del herpes simple, virus 6 del herpes

humano, virus influeuza, virus parainflueuza, virus sincitial respiratorio, virus de la varicela-zoster, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis D, virus de papiloma, parvovirus B 19, poliomavirus BK, virus de polioma JC, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus I de la leucemia de células T humanas, y Virus II de la leucemia de las células T humanas, así como las infecciones bacterianas secundarias resultantes de o causadas por infección con una infección parasitaria persistente, tal como, por ejemplo, Leishmania, Toxoplasma, Tripanosoma, Plasmodium, Schistosoma y encefalitozoon.

[00124] Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, micobacterias MSF (tal como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*, *M. chelonae*. y *M. abscessus*), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (Grupo A estreptococos), *Streptococcus agalactiae* (Grupo B estreptococo), *Streptococcus viridans* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus anaeróbicas* (*anaeróbicas sp.*), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter patogénica sp.*, *Enterococcus sp.* (Como, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *moniliformis Streptobacillus*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Actinomyces israeli*, *Lactobacillus spp.*; *Nocardia spp.*; *Rhodococcus equi* (cocobacilos); *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *Actinomyces spp.*; *Clostridium botulinum*; *Clostridium difficile*; *Mobiluncus spp*, *Peptostreptococcus spp*; *Moraxella catarrhalis*; *veillonellas*;

Actinobacillus actinomycetemcomitans; Acinetobacter baumannii; Bordetella pertussis; Bordetella parapertussis, Bordetella bronchiseptica, Brucella spp.; Campylobacter spp.; Capnocytophaga spp.; Cardiobacterium hominis; Eikenella corrodens; Francisella tularensis; Haemophilus ducreyi; Kingella kingae; Klebsiella granuloma; Citrobacter spp., Enterobacter spp.; Escherichia coli; Proteus spp.; Salmonella enteritidis; Salmonella typhi; Shigella spp.; Serratia marcescens; Yersinia enterocolitica; Yersinia pestis; Aeromonas spp.; Plesiomonas shigelloides; Vibrio cholerae; Vibrio parahaemolyticus; Vibrio vulnificus; Acinetobacter spp.; Flavobacterium spp.; Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas putida; Pseudomonas syringae; Pseudomonas fluorescens; Achromobacter xylosoxidans o Alcaligenes xylosoxidans; Burkholderia cepacia compleja, tal como Burkholderia pseudomallei, Burkholderia cepacia, B. multivorans, B. cenocepacia. B. vietnamiensis. B. dolosa; Xanthomonas maltophilia o Stenotrophomonas maltophilia; Bacteroides fragilis; Bacteroides spp.; Prevotella spp.; Fusobacterium spp.; Spirillum minus; Borrelia burgdorferi; Borrelia recurrentis; Bartonella henselae; Chlamydia trachomatis; Chlamydophila pneumoniae; Chlamydophila psittaci; Coxiella burnetii; Ehrlichia chaffeensis; Anaplasma phagocytophilum; Legionella spp.; Leptospira spp.; Rickettsia rickettsii; Orientia tsutsugamushi; y Chromobacterium violaceum, las infecciones micobacterianas que se pueden tratar utilizando los métodos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, las causadas por: M. abscessus. M. africanum. M. asiaticum, Mycobacterium avium complex (MAC), M. avium paratuberculosis, M. abscessus, M. bovis. M. chelonae, M. Fortuitum, M. gordonae. M. haemophilum. M. intracellulare. M. kansasii, M. lentiflavum, M. leprae, M. liflandii, M. malmoense. M. marinum, M. microti, M. pH lei. M. pseudoshottsii. M. scrofulaceum, M. shottsii, M. esmegma tis. M. triplex, M. tuberculosis, M. ulcerans, M. uvium, y M. xenopi.

[00125] Las composiciones y métodos descritos en este documento que comprenden antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF se contemplan para uso en el tratamiento de las infecciones crónicas con estas especies bacterianas. Otros organismos infecciosos (tal como protistas) incluyen: *Plasmodium Falciparum* y *Toxoplasma gondii*. Las composiciones y métodos descritos en este documento comprenden antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF que también se contemplan para uso en el tratamiento de infecciones con estas especies.

[00126] los Ejemplos de trastornos/enfermedades causadas por infecciones bacterianas incluyen pero no se limitan a, la neumonía, incluyendo neumonía recurrente, bronquitis, incluyendo crónica o bronquitis recurrente, meningitis bacteriana, el cólera, la difteria, la tuberculosis, el ántrax, el botulismo, la brucelosis, la campilobacteriosis, el tifus, infecciones del oído, incluyendo infecciones recurrentes del oído, la gonorrea, la listeriosis, enfermedad de Lyme, la fiebre reumática, la tos ferina (tos ferina), la peste, salmonellosis, escarlatina, shigelosis, sinusitis, incluyendo sinusitis crónica, la sífilis, el tétanos, el tracoma, tularemia, fiebre tifoidea y las infecciones del tracto urinario, incluyendo infecciones crónicas del tracto urinario.

[00127] En consecuencia, en diversas implementaciones de los métodos y composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido usado se determina con base en la naturaleza de la infección bacteriana o infección crónica del sujeto.

[00128] Por ejemplo, en algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, si la infección crónica es: endocarditis infecciosa causada por *Enterococcus* cuando el organismo no es

sensible a la gentamicina; tuberculosis en combinación con otros medicamentos contra la tuberculosis; y la peste (*Yersinia pestis*), el antibiótico aminoglucósido administrado es la estreptomicina.

[00129] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, cuando la infección bacteriana es un organismo Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, y cuando la infección bacteriana es Gram-positiva las especies de *Staphylococcus*, *Yersinia pestis*, sus parientes, y *Francisella tularensis*. En algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, cuando la infección crónica se está tratando o previniendo, por ejemplo, bacteriemia, endocarditis bacteriana, brucelosis, infecciones asociadas con quemaduras externas, infecciones asociadas con la fibrosis quística, endocarditis, infecciones de las válvulas protésicas debidas a *S viridans* y *S bovis*, infecciones de las válvulas nativas debido a los estafilococos, infecciones de la valvula para prótesis por estafilococos, válvula nativa o infecciones de la valvula protética, debidas a los enterococos resistentes a la penicilina, infecciones asociadas con la endometritis, infecciones asociadas con neutropenia febril, infecciones intraabdominales, meningitis, infecciones asociadas con la osteomielitis, infecciones asociadas a la enfermedad inflamatoria pélvica, infecciones asociadas con peritonitis, infecciones asociadas con la peste, las infecciones asociadas con la neumonía, infecciones asociadas con pielonefritis, infecciones asociadas con la piel o tejidos blandos, infecciones asociadas con la cirugía, y las infecciones asociadas con la tularemia.

[00130] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido tobramicina, cuando la

infección bacteriana es por un microorganismo aerobio y facultativos Gram-positivas, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*; o un microorganismo aeróbico y facultativo Gram-negativas, tal como, por ejemplo, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Providencia sp.*, y *Serratia sp.* En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósidos es tobramicina, cuando la infección crónica que se está tratando o previniendo es, por ejemplo, bacteriemia, infecciones asociadas con quemaduras externas, infecciones asociadas con la fibrosis quística, endocarditis, infecciones asociadas con neutropenia febril, infecciones intraabdominales, meningitis, infecciones asociadas con la osteomielitis, infecciones asociadas con peritonitis, infecciones asociadas con la neumonía, infecciones asociadas con pielonefritis, sepsis, infecciones derivadas, infecciones asociadas con la piel o tejidos blandos, e infecciones asociadas con la tularemia.

[00131] En algunas formas de implementación de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es Sisomicina (BACTOCEAZE o ENSAMYCIN), cuando la infección bacteriana es causada por una bacteria Gram-positivos, o *Pseudomonas aeruginosa*.

[00132] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminogluosido es arbekacina, cuando la infección crónica es causada por bacterias multi-resistentes, tal como, por ejemplo, *Staphylococcus aureus resistente a la meticilina* (MRSA), así como las bacterias entéricas y otras eubacterias.

[00133] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es amikacina, cuando la infección crónica es causada por bacterias Gram-negativas resistentes a fármacos múltiples, tal como, por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, y *Enterobacter*, así como, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Providencia stuartii*, y las infecciones por micobacterias no tuberculosas y la tuberculosis, cuando los fármacos de primera línea no pueden controlar la infección.

[00134] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es la neomicina, cuando la infección es causada por una bacteria Gram-negativa, y, en algunas implementaciones, una bacteria Gram-positivas.

[00135] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es frameticina, cuando la infección es en piel, nariz, oreja, y/o infección ocular.

[00136] En algunas implementaciones de las composiciones y métodos descritos en este documento, el antibiótico aminoglucósido es paromomicina, cuando la infección es una infección intestinal, tal como, por ejemplo, la criptosporidiosis, la amebiasis, y leishmaniasis.

[00137] En una implementación, la infección es causada por una bacteria *Pseudomonas* en un sujeto que tiene fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o bronquiectasia.

[00138] Los métodos y composiciones descritos en este documento se contemplan específicamente para el tratamiento agudo de la neumonía asociada a ventilación mecánica en pacientes en cuidados intensivos y para el tratamiento agudo de pacientes quemados.

[00139] También se proporciona en este documento, en algunos aspectos, métodos para inhibir o retrasar la formación de biopelículas, que comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo, o poner en contacto una superficie con una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva de uno o más compuestos que estimulan la PMF. Se contemplan específicamente en este documento los métodos para inhibir o retrasar la formación de biopelículas en dispositivos vasculares, prótesis óseas y otras infecciones relacionadas con dispositivos médicos internos.

[00140] Como se usa en este documento, una "biopelícula" se refiere a la masa de microorganismos adheridos a una superficie, tal como una superficie de un dispositivo médico, y las sustancias extracelulares asociados producidas por uno o más de los microorganismos unidos. Las sustancias extracelulares son sustancias típicamente poliméricas que comúnmente incluyen una matriz de polisacáridos complejos, sustancias proteináceas y glicopéptidos. Los microorganismos pueden incluir, pero no se limitan a, bacterias, hongos y protozoos. En una "biopelícula bacteriana", los microorganismos incluyen una o más especies de bacterias. La naturaleza de una biopelícula, tal como su estructura y composición, puede depender de la especie particular de bacterias presentes en la biopelícula. Las bacterias presentes en una biopelícula a menudo son fenotípica, fisiológica, o metabólicamente diferentes que las bacterias que no están en una biopelícula, tal como bacterias aisladas o bacterias en colonias de suspensión planctónicas. Las

"biopelículas" polimicrobianas son películas que incluyen más de una especie bacteriana.

[00141] Tal como se usa en este documento, los términos y las frases "retrasan", "retardo de la formación", y "que retrasan la formación de" tienen sus significados usuales y comunes, y generalmente se dirigen a aumentar el período de tiempo antes de la formación de biopelículas, o una infección bacteriana de crecimiento lento en un sujeto o en una superficie. El retraso puede ser, por ejemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas, aproximadamente 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días o más. La inhibición de la formación de una biopelícula, como se usa en este documento, se refiere a evitar el desarrollo parcial o total o la progresión de una biopelícula, por ejemplo, sobre una superficie, tal como una superficie de un dispositivo médico interno.

[00142] El versado en el arte entenderá que los métodos para inhibir y retrasar la formación de biopelículas se pueden practicar para cualquier bacteria que se pueda encontrar, tal como una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento se pueden practicar en la superficie de o en el interior de un animal, tal como un humano; sobre una superficie inerte, tal como un contador o un banco superior; sobre una superficie de una pieza de equipo médico o de laboratorio; sobre una superficie de una herramienta médica o de laboratorio; o en un dispositivo médico interno.

[00143] En algunos aspectos, de la presente se proporcionan métodos para inhibir la formación de una biopelícula sobre una superficie o en un material poroso, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie o un material poroso sobre el cual se puede formar una biopelícula, un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para inhibir la formación de una biopelícula. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie inerte, tal como la superficie de un dispositivo médico interno.

[00144] En algunos aspectos, en el presente se proporcionan métodos para retrasar la formación de una biopelícula sobre una superficie o en un material poroso, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie o un material poroso sobre el cual se puede formar una biopelícula, un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para retrasar la formación de una biopelícula. En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la superficie es una superficie inerte, tal como la superficie de un dispositivo médico interno.

[00145] En algunos aspectos, en el presente se proporcionan métodos para prevenir la colonización de una superficie por bacterias persistentes, que comprende aplicar a o poner en contacto con una superficie con un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en una cantidad suficiente para prevenir la colonización de la superficie por las bacterias persistentes.

[00146] En las implementaciones de los métodos descritos en este documento dirigidos a inhibir o retrasar la formación de una biopelícula, o prevenir la colonización de una superficie por bacterias persistentes, el material que comprende la superficie o el material poroso puede ser cualquier material que se puede utilizar para formar una superficie o un material poroso. En algunas de tales implementaciones, el material se selecciona de: polietileno, politetrafluoroetileno, polipropileno, poliestireno, poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poli (metil metacrilato), poliamida, poliéster, poliuretano, policarbonato, silicona, cloruro de polivinilo, alcohol polivinílico, polietileno tereftalato, cobalto, una aleación a base de cobalto, titanio, una aleación a base de titanio, acero, plata, oro, plomo, aluminio, sílice, alúmina, policristal de zirconio itrio estabilizado, fosfato de calcio, carbonato de calcio, fluoruro de calcio, carbono, algodón, lana y de papel.

[00147] En las implementaciones de los métodos descritos en este documento para inhibir o retrasar la formación de una biopelícula, o la prevención de la colonización de una superficie por bacterias persistentes, se puede aplicar un segundo antibiótico simultáneamente con el antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. El segundo antibiótico adecuado incluye, por ejemplo, linezolida, dapromicina, aminoglucósidos (e.g., tobramicina, gentamicina, estreptomicina, kanamicina), β -lactamas (e.g., penicilinas, carbapenemas, monobactamas, y cefalosporinas), vancomicinas, bacitracinas, macrólidos (e.g., eritromicina), lincosamidas (e.g., clindamicina), cloranfenicoles, tetraciclinas, anfotericinas, cefazolin, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas y trimetoprim, rifampicinas, metronidazoles, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas, o cualquier sal o variantes de los mismos.

[00148] En algunas implementaciones de estos métodos y todos los métodos descritos en este documento, la bacteria persistente en fase estacionaria, de

crecimiento lento o biopelícula es cualquier especie bacteriana o población que comprende células persistentes, pueden existir en un crecimiento lento o en fase estacionaria, y/o pueden formar una biopelícula. En algunas de tales implementaciones, la bacteria es *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, o *enterococos* susceptible a la vancomicina, un *enterococos* resistentes a la vancomicina, una especie de *Staphylococcus* o una especie *Streptococcus*. En algunas de tales implementaciones, la bacteria se selecciona de *Enterococcus faecalis* (VSE) susceptible a la vancomicina (VAN), *FE. Faecalis* (VRE) VAN-resistente, y estaf *epidermidis*.

[00149] Tal como se utiliza en este documento, el término "poner en contacto" significa que se refiere en términos generales a poner una célula bacteriana y un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF en proximidad suficiente para que el antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF puedan ejercer sus efectos en cualquier célula bacteriana presente. El versado en el arte entenderá que el término "Poner en contacto" incluye interacción física entre un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF y una célula bacteriana, así como las interacciones que no requieren la interacción física.

[00150] Los métodos descritos en este documento abarcan además superficies recubiertas por un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos estimulantes PMF, y/o impregnado con un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. Tales superficies incluyen cualquiera que pueda entrar en contacto con una bacteria persistente en fase estacionaria, de crecimiento lento o biopelícula. En algunas de tales implementaciones, tales superficies incluyen cualquier superficie hecha de un material inerte (aunque las superficies de los animales vivos se incluyen dentro del alcance de los métodos

descritos en este documento), incluyendo la superficie de un mostrador o mesa de trabajo, la pieza de una superficie de equipos médicos o de laboratorio o una herramienta, el dispositivo médico de una superficie tal como un respirador, y la superficie de un dispositivo médico interno. En algunas de tales formas de implementación, tales superficies incluyen las de un dispositivo médico interno, tal como implantes quirúrgicos, dispositivos ortopédicos, prótesis y catéteres, i.e., dispositivos que se introducen en el cuerpo de un individuo y permanecen en la posición durante un tiempo prolongado. Tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, articulaciones artificiales, corazones artificiales e implantes; válvulas, tal como válvulas cardíacas; marcapasos; injertos vasculares; catéteres, tal como catéteres vasculares, urinarios y de diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD); derivaciones, tal como derivaciones de líquido cefalorraquídeo; mangueras y tubos, tal como tubos de traqueotomía; placas; pernos; válvulas; parches; cierres de heridas, incluyendo suturas y grapas; apósitos; y cemento óseo.

[00151] En el presente documento, el término "dispositivo médico interno", se refiere a cualquier dispositivo para uso en el cuerpo de un sujeto, tal como catéteres intravasculares (por ejemplo, intravenosos e intra-arteriales), catéteres de flujo dirigido directo al corazón, catéteres de Hickman, fístulas arteriovenosas, catéteres utilizados en la hemodiálisis y la diálisis peritoneal (por ejemplo, Silastica, venosa central, catéteres Tenckhoff, y catéteres de teflón), puertos de acceso vasculares, catéteres permanentes urinarios, catéteres urinarios, catéteres de silicona, catéteres ventriculares, prótesis vasculares sintéticas (por ejemplo, aortofemoral y femoropoplítea), prótesis valvulares cardíacas, prótesis articulares, implantes ortopédicos, implantes de pene, derivaciones (por ejemplo, Scribner, Torkildsen, sistema nervioso central, portasistemicas, ventricular, ventrículoperitoneal), dispositivos intrauterinos, buffers, implantes dentales,

prótesis (por ejemplo, stents ureteral), prótesis de voz artificiales, tubos timpanostomía, tubos de alimentación gástrica, tubos endotraqueales, marcapasos, desfibriladores implantables, tubos, cánulas, sondas, dispositivos de monitorización de sangre, agujas, y similares. Una subcategoría de dispositivos médicos permanentes se refiere a dispositivos de implantables que están típicamente más profundos y/o introducidos en el cuerpo de forma permanente. Los dispositivos médicos permanentes pueden introducirse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por implantación percutánea, intravascular, intrauretral, intraorbital, intratraqueal, intraesofágica, estomal, u otra ruta, o por implantación quirúrgica, por ejemplo, la colocación intra-articular de una articulación protésica.

[00152] De acuerdo con algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, el dispositivo médico interno se reviste por una solución, tal como a través de baño o pulverización, que contiene una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 500 mg/ml de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF. En algunas formas de implementación, los rangos más específicos de las concentraciones del antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En algunas implementaciones, las concentraciones específicas de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se pueden utilizar, incluyendo: aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 750 µg/ml, aproximadamente 1

mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 500 mg/ml, aproximadamente 600 mg/ml, aproximadamente 750 mg/ml, y aproximadamente 900 mg/ml. El dispositivo médico interno se puede recubrir por la solución que comprende un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF antes de su inserción en el cuerpo.

Dosificación y Modos De Administración

[00153] Una ventaja clave de los métodos, usos y composiciones que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, es la capacidad de producir marcados efectos anti-bacterianos en un sujeto humano que tiene una infección crónica sin causar efectos tóxicos significativos o efectos adversos. Mediante la adición de compuestos que estimulan la PMF a un régimen terapéutico o método, la dosis del antibiótico aminoglucósido que se administra puede, en algunas implementaciones, reducirse en relación con las dosis administradas normalmente. Se contempla además en este documento que la adición de un compuesto que estimula la PMF a un régimen de antibióticos permitirá el uso de un antibiótico al que la bacteria fue previamente resistente mediante la restauración de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos. La eficacia de los tratamientos y métodos descritos en el presente documento se puede medir por varios parámetros usados comúnmente en la evaluación del tratamiento de infecciones, incluyendo, pero no limitado a, la reducción en la tasa de crecimiento bacteriano, la presencia o número de células bacterianas en una muestra obtenida

de un sujeto, la tasa global de respuesta, duración de la respuesta, y la calidad de vida.

[00154] Por consiguiente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" de un antibiótico aminoglucósido o uno o más compuestos que estimulan la PMF, que será administrado a un sujeto que se rige por diversas consideraciones, y, tal como se usa en este documento, se refiere a la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar o estabilizar, un trastorno o afección, como la infección crónica. Una cantidad efectiva tal como se usa en este documento también incluye una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de un síntoma de una infección crónica, alterar el curso de una infección crónica (por ejemplo, pero no limitado a, retrasar la progresión de un síntoma de la infección crónica, tal como el crecimiento de la población bacteriana causante de la infección crónica), o revertir un síntoma de la infección crónica. Por lo tanto, no es posible especificar la "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una "cantidad efectiva" apropiada se puede determinar por un versado en el arte usando solamente experimentación de rutina.

[00155] Las cantidades eficaces, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los antibióticos aminoglucósidos o uno o más compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, e.g., para la determinación de la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren las composiciones y métodos que muestran grandes índices terapéuticos. Una dosis

terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. También, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un rango de concentración en el plasma circulante que incluye la IC₅₀ (i.e., la concentración de antibióticos aminoglucósidos o uno o más compuestos que estimulan la PMF), que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular, o en un modelo animal apropiado. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los efectos de cualquier dosificación particular se pueden monitorizar mediante un bioensayo adecuado. La dosis se puede determinar por un médico y ajustar, según sea necesario, para adaptarse a los efectos observados del tratamiento.

[00156] Dependiendo del tipo y gravedad de la infección, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg (e.g, 0,1 a 20 mg/kg) de un antibiótico aminoglucósido, tal como tobramicina, o compuesto que estimula la PMF, tal como fumarato, está en un rango de dosificación candidata inicial para la administración al sujeto, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que la infección se trata o se desaparece, medida por los métodos descritos anteriormente o conocidos en el arte. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. En una implementación de los métodos descritos en este documento, la concentración de fumarato está entre 5 mM-25 mM, entre 10 mM-20 mM, entre 10 mM-5 mM, o entre 15 mM-20 mM. En algunas implementaciones, la concentración de fumarato es 15 mM. El progreso de los métodos terapéuticos descritos en este documento se monitoriza fácilmente mediante técnicas y

ensayos convencionales, tal como los descritos en este documento, o conocido para un versado en el arte. En algunas implementaciones, las concentraciones de fumarato citados a lo largo del documento descriptivo son concentraciones locales (e.g, en el sitio de la infección) y no la dosis de un compuesto que estimula la PMF para ser administrados. Como un versado en el arte apreciará, la dosis que se debe administrar con el fin de alcanzar tales concentraciones locales del metabolito dependerá de la vía de administración, el tamaño del individuo, etc. La determinación de una dosis a administrar a un sujeto está bien dentro de las capacidades de un versado en el arte.

[00157] Por ejemplo, la gentamicina puede ser altamente nefrotóxica, particularmente si se acumulan múltiples dosis durante el curso de un tratamiento. Por esta razón la gentamicina se puede dosificar por el peso corporal. Existen varias fórmulas para el cálculo de la dosis de gentamicina, y son conocidos por los versados en el arte. Cuando se utiliza gentamicina en los métodos descritos en este documento se deben tener en cuenta un número de factores y determinantes.

[00158] En algunas implementaciones, cuando la neomicina es el antibiótico aminoglucósido, las formas de dosificación disponibles incluyen 10 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, y 150 mg/1,5 ml.

[00159] La duración de los procedimientos terapéuticos descritos en este documento puede continuar durante tanto tiempo como sea médicamente indicado o hasta que se consigue un efecto terapéutico deseado (e.g, los descritos en este documento). En ciertas implementaciones, la administración de una combinación de un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuestos que estimulan la PMF se continúa durante al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 10 meses, al menos 1 año, al

menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 10 años, al menos 20 años, o al menos durante un período de años hasta el tiempo de vida del sujeto. En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, la administración se continúa durante el tiempo que un dispositivo interno está presente en el sujeto.

[00160] Los antibióticos aminoglucósidos y compuesto que estimula la fuerza protón-motriz PMF descritos en este documento, se pueden administrar, de forma individual, pero al mismo tiempo, en algunas implementaciones, o, en otras formas de implementación, de forma simultánea, por ejemplo en una única formulación que comprende tanto un antibiótico aminoglucósido y uno o más compuesto que estimula la PMF, a un sujeto, e.g., un sujeto humano, de acuerdo con métodos conocidos, tal como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o vías de inhalación. Los modos ejemplares de administración de los antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF, incluyen, pero no se limitan a, inyección, infusión, inhalación (e.g, intranasal o intratraqueal), ingestión, rectal, y tópica (incluyendo bucal y sublingual). La administración local se puede utilizar si, por ejemplo, los efectos colaterales considerables o la toxicidad están asociados con el antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, y para, por ejemplo, permitir una alta concentración localizada de los compuestos que estimulan la PMF en el sitio de infección. También se puede utilizar una estrategia ex vivo para aplicaciones terapéuticas. En consecuencia, cualquier modo de administración que entregue los antibióticos aminoglucósidos y compuestos que estimulan la PMF sistémicamente o a una superficie o de destino deseados, puede incluir, pero no se limita a, la administración por inyección, infusión, instilación, e inhalación, la "inyección" incluye, sin limitación, intravenosa,

intramuscular, intra-arterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebro espinal, y la inyección intraesternal e infusión. Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" como se usa en este documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección. Las frases "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usa en este documento se refieren a la administración de un antibiótico aminoglucósido y compuestos estimulantes de la PMF distintos de directamente en un sitio blanco, el tejido, u órgano, tal como el pulmón, de tal manera que entra en el sistema circulatorio del sujeto y, por lo tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares.

[00161] El antibiótico aminoglucósido que se utiliza para tratar una infección o inhibir la formación de biopelículas en un sujeto puede determinar el modo de administración a utilizar. Por ejemplo, la mayoría de los antibióticos aminoglucósidos no se absorben bien a través del intestino y el tracto GI, y por lo tanto la administración oral no es efectiva.

[00162] En consecuencia, en algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es la estreptomicina, la administración es mediante inyección intramuscular o intravenosa. En algunas de tales implementaciones, la administración no es a través de la vía oral.

[00163] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es gentamicina, la

administración es mediante administración intravenosa, administración intramuscular, o administración tópica para tratar las infecciones. En algunas de tales implementaciones, la administración no es a través de la vía oral.

[00164] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es kanamicina A, la administración es por vía oral, intravenosa, e intramuscular.

[00165] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, cuando el antibiótico aminoglucósido es tobramicina, la administración es mediante administración parenteral, incluyendo, por ejemplo, inyección intramuscular e intravenosa. La tobramicina se puede detectar en tejidos y fluidos corporales después de la administración parenteral.

[00166] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es netilmicina, la administración es por inyección o infusión.

[00167] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es arbekacina, la administración es mediante administración parenteral, tal como administración intramuscular o intravenosa. La duración normal de la terapia con el antibiótico aminoglucósido arbekacina IM o IV es 7-10 días, aunque en algunos casos puede ser necesaria una mayor duración.

[00168] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es la amicacina, la administración es por vía intravenosa o intramuscular. Actualmente no existe una forma oral disponible como amikacina puesto que no se absorbe por vía oral. En algunas implementaciones, se puede utilizar la amikacina liposomal por inhalación para el tratamiento de enfermedades respiratorias, tal

como, por ejemplo, fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa*, infecciones por micobacterias no tuberculosas, y bronquiectasis. Los efectos secundarios de la amikacina son similares a los de otros aminoglucósidos, el daño renal y la pérdida de la audición son los efectos más importantes. Debido a este potencial, se pueden monitorear los niveles en sangre del fármaco y los marcadores de la función renal (creatinina). Por otra parte, las dosis de amikacina pueden ajustarse específicamente con base en la depuración de creatinina en suero en los entornos clínicos.

[00169] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es la neomicina, se utiliza la administración tópica o la administración oral. En implementaciones preferidas, la neomicina no se administra por vía intravenosa, puesto que la neomicina es extremadamente nefrotóxica. En estas implementaciones, donde la neomicina se administra por vía intravenosa, la dosis es menor que 0.025 mg por dosis.

[00170] En algunas formas de implementación, cuando el antibiótico aminoglucósido es framisetina, se utiliza la administración tópica o administración oral. La framisetina tiene una pobre absorción sistémica, y se puede utilizar en las preparaciones tópicas para las infecciones de la piel, la nariz, los oídos y los ojos, a menudo en combinación con otros fármacos antibacterianos y corticosteroides. También se puede utilizar para las infecciones gastrointestinales, en algunas implementaciones.

[00171] En algunas implementaciones, cuando el antibiótico aminoglucósido es paromomicina, la administración es mediante inyección intramuscular o administración oral.

Formulaciones farmacéuticas

[00172] Las formulaciones terapéuticas de los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden preparar, en algunos aspectos, mezclando un antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas, ya sea individualmente en algunas implementaciones, o en combinación, por ejemplo, una formulación terapéutica que comprende solo una cantidad efectiva de un antibiótico aminoglucósido y una cantidad efectiva del compuesto de estimulación de al menos un PMF. Tales formulaciones terapéuticas de los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento incluyen la formulación en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral, e.g., por vía intravenosa; mucosal, e.g., intranasal; enteral, e.g., oral; tópica, e.g., transdérmica; ocular, u otro modo de administración.

[00173] Como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, formas materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento significa un material aceptable farmacéuticamente, composición o vehículo, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, solvente, medios, materiales de encapsulado, ayudas de fabricación (e.g, lubricante, talco magnesio, calcio o

estearato de zinc, o ácido esteárico), o material de encapsulación solvente, que participan en el mantenimiento de la actividad de, llevar, transportar los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF, desde un órgano, o una parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo.

[00174] Algunos ejemplos no limitativos de los vehículos aceptables, excipientes o estabilizantes que no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, incluyen soluciones buffer de pH tal como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; agentes lubricantes, tal como estearato de magnesio, lauril sulfato sódico y talco; excipientes, tal como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya; conservantes (tal como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butilo o alcohol bencílico; alquil parabenos tal como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina, HDL, LDL, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tal como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo manosa, almidones (almidón de maíz o almidón de patata), o dextrinas; celulosa y sus derivados, tal como carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina y acetato de celulosa; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, glucosa, lactosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tal como sal de sodio; complejos metálicos (e.g complejos de Zn-proteína); glicoles, tal como propilenglicol; polioles, tal como glicerina; ésteres, tal como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes buffer,

tal como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; alcoholes C2-C12, tal como etanol; tragacanto en polvo; malta; y/o agentes tensioactivos no iónicos tal como TWEEN™, PLURONIC™ o polietilenglicol (PEG); y u otras sustancias compatibles no tóxicas/empleadas en formulaciones farmacéuticas. También pueden estar presentes en la formulación los agentes humectantes, agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes en la formulación.

[00175] En algunas implementaciones, las formulaciones terapéuticas o composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF comprende una sal farmacéuticamente aceptable, por lo general, e.g., cloruro de sodio, y preferiblemente a aproximadamente concentraciones fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones descritas en este documento pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas implementaciones, la concentración del conservante oscila de 0,1 a 2,0%, típicamente v/v. Los conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las técnicas farmacéuticas. El alcohol bencílico, fenol, metacresol, metilparabeno, y propilparabeno son ejemplos de conservantes. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable en una concentración de 0,005 hasta 0,02%.

[00176] En algunas implementaciones de los aspectos descritos en este documento, un antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF, puede ser especialmente formulado para la administración del compuesto a un sujeto en forma sólida, líquida o en forma de gel, incluyendo las adaptadas para lo

siguiente: (1) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (2) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o spray aplicado a la piel; (3) administración oral, por ejemplo, pócimas (soluciones acuosas o no acuosas o suspensiones), pastillas, grageas, cápsulas, píldoras, tabletas (e.g, los destinados para la administración bucal, sublingual, y la absorción sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua; (4) intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) sub lingual; (6) ocularmente; (7) transdérmicamente; (8) transmucosa; o (9) por vía nasal. Además, un antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF se pueden implantar en un paciente o se inyecta mediante un sistema de administración de fármacos. Ver, por ejemplo, Urquhart, et al., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24: 199-236 (1984); Lewis, ed. "Controlled Release of pesticides and pharmaceutical" (Plenum Press, Nueva York, 1981); Patente U.S. Nº. 3,773,919; y la patente U.S. No. 35 3.270.960. Ejemplos de formas de dosificación incluyen, pero no son limitan a: tabletas, comprimidos oblongos; cápsulas, tal como cápsulas de gelatina dura y cápsulas de gelatina blanda elástica; sellos; trociscos, pastillas, dispersiones, supositorios, ungüentos, cataplasmas (emplastos), pastas, polvos, apósitos, cremas, emplastos, soluciones, parches, aerosoles (e.g, aerosoles nasales o inhaladores); geles; líquidos tal como suspensiones (e.g, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua o emulsiones líquidas agua en aceite), soluciones, y elixires; y sólidos estériles (e.g, sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas.

[00177] En algunas implementaciones, las formas de dosificación parenteral de las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o Compuesto

que estimula la PMF, se puede administrar a un sujeto con una infección crónica o en riesgo de infección crónica por diversas vías, incluyendo, pero no limitado a, subcutánea, intravenosa (incluyendo inyección en bolo), intramuscular e intra-arterial. Puesto que la administración de formas de dosificación parenterales típicamente sobrepasa las defensas naturales del paciente contra los contaminantes, las formas farmacéuticas parenterales son preferiblemente estériles o capaces de ser esterilizadas antes de la administración a un paciente. Los ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen, pero no se limitan a, soluciones listas para inyección, productos secos listos para ser disueltos o suspendidos en un vehículo farmacéuticamente aceptable para inyección, suspensiones listas para inyección, formas de dosificación parenteral de liberación controlada, y emulsiones.

[00178] Los vehículos adecuados que se pueden utilizar para proporcionar formas de dosificación parenterales descritas en este documento son bien conocidas por los versados en el arte. Es entendido por un versado en el arte, que las concentraciones mucho más altas de los compuestos que estimulan la PMF, como la glucosa, se deben proporcionar en cualquier formulación terapéutica, que se encuentra normalmente cuando el compuesto está presente como parte de un vehículo en una forma de dosificación. Los ejemplos de tales vehículos incluyen, sin limitación: agua estéril; agua USP para inyección; solución salina; solución de glucosa; vehículos acuosos tal como, pero no limitado a, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, dextrosa y cloruro de sodio inyectable, y la inyección de Ringer lactato; vehículos miscibles en agua tal como, pero no limitados a, alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol; y vehículos no acuosos tal como, pero no limitados a, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

[00179] Las formas de dosificación tópica de los antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF, también se proporcionan en algunas implementaciones, e incluyen, pero no se limitan a, cremas, lociones, ungüentos, geles, champús, pulverizadores, aerosoles, soluciones, emulsiones y otras formas conocidas para un versado en el arte. Ver, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 18a edición, Mack Publishing, Easton, Pa (1990); e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4^a ed., Lea & Febiger, Filadelfia, Pa. (1985). Típicamente se emplean formas de dosificación tópicas no pulverizables, viscosas hasta formas semi-sólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tiene una viscosidad dinámica preferiblemente mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas, y similares, que son, si se desea, esterilizados o mezclados con agentes auxiliares (e.g, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, buffers, o sales) para influir en diversas propiedades, tal como, por ejemplo, presión osmótica. Otras formas de dosificación tópicas adecuadas incluyen preparaciones en aerosol pulverizables en las que el ingrediente activo, preferiblemente en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un volátil presurizado (e.g, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco. Las cremas hidratantes o humectantes también se pueden añadir a las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Los ejemplos de tales ingredientes adicionales son bien conocidos en el arte. Ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing, Easton, Pa, (1990), e Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4^a ed., Lea & Febiger, Filadelfia, Pa. (1985). Las formas de dosificación adecuadas para tratar los tejidos de la mucosa dentro de la cavidad oral pueden formularse como enjuagues bucales, o como geles orales, o

como parches bucales, las formas de dosificación transdérmica adicionales incluyen parches "tipo depósito" o "tipo matriz", que se pueden aplicar a la piel y dejado por un periodo de tiempo específico para permitir la penetración de una cantidad deseada de ingrediente activo.

[00180] Los ejemplos de formas de dosificación transdérmicas y métodos de administración que se pueden utilizar para administrar un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF, incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes U.S. Nos.: 4.624.665; 4.655.767; 4.687.481; 4.797.284; 4.810.499; 4.834.978; 4.877.618; 4.880.633; 4.917.895; 4.927.687; 4.956.171; 5.035.894; 5.091.186; 5.163.899; 5.232.702; 5.234.690; 5.273.755; 5.273.756; 5.308.625; 5.356.632; 5.358.715; 5.372.579; 5.421,816; 5.466,465; 5.494.680; 5.505.958; 5.554.381; 5.560.922; 5.585.111; 5.656.285; 5.667.798; 5.698.217; 5,741,511; 5.747.783; 5.770.219; 5.814.599; 5.817.332; 5.833.647; 5.879.322; y 5.906.830, cada una se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[00181] Los excipientes adecuados (e.g, vehículos y diluyentes) y otros materiales que se pueden utilizar para proporcionar formas de dosificación transdérmicas y de la mucosa de los antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF descritos en el presente documento son bien conocidos por los versados en las artes farmacéuticas, y dependerá del tejido u órgano particular al que se aplicará una composición o forma de dosificación farmacéutica dada. Además, dependiendo del tejido específico a tratar, los componentes adicionales se pueden utilizar antes de, conjuntamente con, o después del tratamiento con un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF. Por ejemplo, se pueden usar los mejoradores de la penetración para ayudar en la entrega de los ingredientes activos a o a través del tejido.

[00182] En algunas implementaciones, las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o Compuesto que estimula la PMF están formulados para ser adecuados para la administración oral, por ejemplo como formas de dosificación discretas, tal como, pero no limitado a, tabletas (incluyendo, sin limitaciones comprimidos ranurados o recubiertos), píldoras, comprimidos oblongos, cápsulas, comprimidos masticables, sobres con polvos, cachets, pastillas, obleas, aerosoles, o líquidos, tal como, pero no limitado a, jarabes, elixires, soluciones o suspensiones en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión de agua en aceite. Tales composiciones contienen una cantidad predeterminada de la sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos, y se pueden preparar por métodos de farmacia bien conocidos por los versados en el arte. Ver, en general, Reminton's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Publishing, Easton, Pa. (1990).

[00183] Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas mas ventajosas de la unidad de dosificación solida oral, en cuyo caso se usan excipientes farmacéuticos sólidos. Si se desea, las tabletas se pueden recubrir por técnicas acuosas o no acuosas estándar. Estas formas de dosificación se pueden preparar por cualquiera de los métodos de farmacia. En general, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación se preparan mezclando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego se da forma al producto en la presentación deseada si es necesario. En algunas implementaciones, las formas de dosificación oral no se utilizan para el antibiótico aminoglucósido.

[00184] Las formas típicas de dosificación oral de las composiciones que comprenden un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se preparan mediante la combinación de la sal farmacéuticamente aceptable del antibiótico aminoglucósido y/o un compuesto que estimula la PMF, en una mezcla íntima con al menos un excipiente de acuerdo con técnicas de composición farmacéuticas convencionales, los excipientes puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de la composición deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en formas de dosificación líquidas o en aerosol orales incluyen, pero no se limitan a, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en formas de dosificación oral sólidas (e.g, polvos, comprimidos, cápsulas, y comprimidos oblongos) incluyen, pero no se limitan a, almidones, azúcares, celulosa microcristalina, caolín, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, y agentes desintegrantes.

[00185] Los aglutinantes adecuados para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, almidón de maíz, almidón de patata, u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tal como acacia, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (e.g, etil celulosa, acetato de celulosa, calcio carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio), polivinilpirrolidona, metil celulosa, almidon pre-gelatinizado, hidroxipropil metil celulosa, (e.g, Nos. 2208, 2906, 2910), celulosa microcristalina, y mezclas de los mismos.

[00186] Los ejemplos de rellenos adecuados para uso en las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a, talco,

carbonato de calcio (e.g, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silícico, sorbitol, almidón, almidón pre-gelatinizado, y mezclas de los mismos. El aglutinante o relleno en las composiciones farmacéuticas descritas en este documento está presente típicamente en de aproximadamente 50 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición farmacéutica.

[00187] Los desintegrantes se utilizan en las formulaciones farmacéuticas orales descritas en este documento para proporcionar comprimidos que se desintegran cuando se exponen a un ambiente acuoso. Se debe utilizar una cantidad suficiente de desintegrante que no es ni muy poco ni demasiado para alterar perjudicialmente la liberación del ingrediente activo para formas solidas de dosificación oral de los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. La cantidad de desintegrante utilizado varía con base en el tipo de formulación, y es fácilmente discernible por los versados en el arte. Los disgregantes que se pueden utilizar para formar formulaciones farmacéuticas orales incluyen, pero no se limitan a, agar, ácido algínico, carbonato de calcio, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina de potasio, glicolato de almidón sódico, almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pre-gelatinizado, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas y mezclas de los mismos.

[00188] Los lubricantes que pueden utilizarse para formar formulaciones farmacéuticas orales del antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio, talco, aceite vegetal hidrogenado (e.g, aceite de cacahuete,

aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soya), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, y mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de sílice Syloide (AEROSIL® 200, fabricado por WR Grace Co. de Baltimore, Md.), un aerosol coagulado de sílice sintética (comercializado por Degussa Co. de Piano, Tex.), CAB-O-SIL® (un producto de dióxido de silicio pirógeno vendido por Cabot Co. de Boston, Mass.), y mezclas de los mismos. Si se usa en todo, los lubricantes se usan típicamente en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de las composiciones farmacéuticas o formas de dosificación en los que se incorporan.

[00189] En otras implementaciones, las formulaciones farmacéuticas libres de latosa y formas de dosificación son proporcionadas, en el que dichas composiciones contienen preferiblemente poca, si alguna, lactosa u otros mono- o di sacáridos. Tal como se utiliza en este documento, el término "libres de latosa" significa que la cantidad de lactosa presente, si la hay, es insuficiente para aumentar sustancialmente la velocidad de degradación de un ingrediente activo. Las composiciones libres de lactosa de la descripción pueden comprender excipientes que son bien conocidos en el arte y se enumeran en la USP (XXI)/NF (XVI), que se incorporan aquí por referencia.

[00190] Las formulaciones orales de los antibióticos aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, abarcan además, en algunas implementaciones, las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o los compuestos que estimulan la PMF descritos como ingredientes activos en este documento, ya que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, la adición de agua (e.g, 5%) es ampliamente aceptada en las técnicas farmacéuticas como un

medio de simular el almacenamiento a largo plazo con el fin de determinar características tal como la vida de estantería o la estabilidad de las formaciones en el tiempo. Ver, por ejemplo, Jens T. Carstensen, Drug Stability: Principles & Practice, 379-80 (2nd ed., Marcel Dekker, NY, N.Y., 1995). Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación anhidras descritas en este documento se pueden preparar usando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad o bajas condiciones de humedad. Las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden lactosa y al menos un ingrediente activo que comprende una amina primaria o secundaria son preferiblemente anhidros si se espera contacto sustancial con humedad y/o humedad durante la fabricación, embalaje, y/o almacenamiento. Las composiciones anhidras se envasan preferiblemente usando materiales conocidos para evitar la exposición al agua de tal manera que puedan ser incluidas en los kits de formulación adecuados. Los ejemplos de envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, lamina selladas herméticamente, plásticos, envases de dosis unitaria (e.g, viales) con o sin desecantes, paquetes de ampollas y paquetes de tiras.

[00191] En algunas implementaciones de los métodos descritos en este documento, un antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF se pueden, administrar directamente a las vías respiratorias en forma de un aerosol o por nebulización. En consecuencia, para uso como aerosoles, en algunas implementaciones, un compuesto antibiótico aminoglucósido y/o y el compuesto que estimula la PMF, se puede envasar en un recipiente de aerosol presurizado junto con propelentes adecuados, por ejemplo, propelentes hidrocarburos como el propano, butano, o isobutano con adyuvantes convencionales. En otras formas de implementación, el antibiótico aminoglucósido y/ el compuesto que estimula la PMF se puede administrar en una forma no presurizada tal como en un nebulizador o atomizador.

[00192] El término "nebulización" es bien conocido en el arte para incluir la reducción de líquido a un aerosol fino. Preferiblemente, mediante tal nebulización se producen pequeñas gotas líquidas de tamaño uniforme a partir de un cuerpo más grande de líquido de una manera controlada. La nebulización se puede lograr por cualquier medio adecuado, incluyendo el uso de muchos nebulizadores conocidos y comercializados en la actualidad. Como es bien sabido, cualquier gas adecuado se puede usar para aplicar presión durante la nebulización, los gases preferidos son aquellos que son químicamente inertes frente a los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. Los gases de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, nitrógeno, argón o helio.

[00193] En otras implementaciones, un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar directamente a las vías respiratorias en forma de un polvo seco. Para uso como un polvo seco, un antibiótico aminoglucósido y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar mediante el uso de un inhalador. Los inhaladores de ejemplo incluyen inhaladores de dosis medidas e inhaladores de polvo seco.

[00194] Las composiciones en polvo adecuadas incluyen, a modo de ilustración, preparaciones en polvo de un antibiótico aminoglucósido y/o compuesto que estimula la PMF, bien mezclados con lactosa, u otros polvos inertes aceptables para, por ejemplo, la administración intrabronquial. Las composiciones en polvo se pueden administrar vía un dispensador de aerosol o encerradas en una cápsula rompible que puede ser insertada por el sujeto en un dispositivo que perfora la cápsula y sopla el polvo en una corriente estable adecuada para la inhalación. Las composiciones pueden incluir propelentes, agentes tensioactivos, y co-solventes y

se pueden llenar en recipientes de aerosol convencionales que se cierran mediante una válvula dosificadora adecuada.

[00195] Los aerosoles para la entrega al tracto respiratorio son conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Adjei, A. y Garren, J. *Pharm. Res.*, 1: 565-569 (1990); Zanen, P. y Lamm, J.-W. *J. Int. J. Pharm.*, 114: 111-115 (1995); Gonda, I. "Aerosols for delivery of therapeutic and diagnostic agents to the respiratory tract," en *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 6: 273-313 (1990); Anderson et al., *Am. Rev. Respir. Dis.*, 140: 1317-1324 (1989)) y tienen un potencial para la administración sistémica de péptidos y proteínas, así (Parten y Platz, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8: 179-196 (1992)); Timsina et al., *Int. J. Pharm.*, 101: 1-13 (1995); y Tansey, I. P., *Spray Technol. Market*, 4: 26-29 (1994); French, D. L., Edwards, D. A. y Niven, R. W., *Aerosol Sci.*, 27: 769-783 (1996); Visser, J., *Powder Technology* 58: 1-10 (1989)); Rudt, S. y R. H. Muller, *J. Controlled Release*, 22: 263-272 (1992); Tabata, Y. y Y. Ikada, *Biomed. Mater. Res.*, 22: 837-858 (1988); Wall, D. A., *Drug Delivery*, 2, 10 1-20 (1995); Patton, J. and Platz, R., *Adv. Drug Del. Rev.*, 8: 179-196 (1992); Bryon, P., *Adv. Drug. Del Rev.*, 5: 107-132 (1990); Patton, J. S., et al., *Controlled Release*, 28: 15 79-85 (1994); Damms, B. y Bains, W., *Nature Biotechnology* (1996); Niven, R. W., et al., *Pharm. Res.*, 12(9): 1343-1349 (1995); y Kobayashi, S., et al, *Pharm, Res*, 13(1): 80-83 (1996), el contenido de todos los cuales se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

[00196] En algunas implementaciones, los ingredientes activos de las formulaciones que comprenden antibióticos aminoglucósidos y/o Compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, también pueden ser atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de co-acervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcapsulas de

hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de entrega de fármacos (e.g, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

[00197] En algunas implementaciones de estos aspectos, los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden administrar a un sujeto por medio de liberación controlada o retardada. Idealmente, el uso de toda la preparación de liberación controlada diseñada óptimamente en el tratamiento médico se caracteriza por un mínimo de sustancia fármaco que se emplea para curar o controlar la condición en una cantidad mínima de tiempo. Las ventajas de las formulaciones de liberación controlada incluyen: 1) ampliar la actividad del fármaco; 2) reducir la frecuencia de dosificación; 3) mayor cumplimiento del paciente; 4) uso menor de drogas totales; 5) reducir los efectos secundarios locales o sistémicos; 6) reducir al mínimo la acumulación del fármaco; 7) reducir las fluctuaciones del nivel de la sangre; 8) mejorar la eficacia del tratamiento; 9) reducir la potenciación o la pérdida de actividad del fármaco; y 10) mejorar la velocidad de control de las enfermedades o condiciones. (Kim, Chong-ju, *Controlled Release Dosage Form Design*, 2 (Technomic Publishing, Lancaster, Pa.: 2000)). Las formulaciones de liberación controlada se pueden usar para controlar, por ejemplo, el comienzo de la acción del antibiótico aminoglucósido, la duración de la acción, los niveles plasmáticos dentro de la ventana terapéutica, y los niveles máximos en sangre. En particular, las formas de dosificación de liberación controlada o liberación prolongada o las formulaciones se pueden utilizar para garantizar que se consiga la eficacia máxima del antibiótico aminoglucósido y/o el compuesto que estimula la PMF, a la vez que minimiza los efectos adversos potenciales y problemas de seguridad, que pueden ocurrir tanto

por debajo de la dosificación de un fármaco (i.e., que va por debajo de los niveles terapéuticos mínimos), así como que exceda el nivel de toxicidad para el medicamento.

[00198] Se pueden adaptar una variedad de formas de dosificación controlada o prolongada conocidas, formulaciones o dispositivos para el uso con los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes U.S. Nos.: 3.845.770; 3,916,899; 3.536.809; 3.598.123; 4.008.719; 5.674.533; 5.059.595; 5.591,767; 5.120.548; 5.073.543; 5.639.476; 5.354.556; 5.733.566; y 6.365.185 B1; cada una de las cuales se incorpora en su totalidad en este documento por referencia. Estas formas de dosificación se pueden utilizar para proporcionar liberación lenta o controlada de uno o más ingredientes activos usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos (como OROS® (Alza Corporation, Mountain View, Calif. U.S.)), recubrimientos multicapa, micropartículas, liposomas, o microesferas o una combinación de los mismos para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. Además, se pueden usar los materiales de intercambio iónico para preparar formas de sal adsorbidas, inmovilizadas de los compuestos descritos y por lo tanto efectuar la entrega controlada del fármaco. Ejemplos de intercambiadores de aniones específicos incluyen, pero no se limitan a, DUOLITE® A568 y DUOLITE® AP143 (Rohm & Haas, Spring House, Pa. U.S.).

[00199] En algunas implementaciones de los aspectos, los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF para uso en las diversas formulaciones terapéuticas y composiciones, y métodos de los mismos, descritos en este documento, se administran a un sujeto mediante liberación sostenida o en

pulsos. La terapia en pulsos no es una forma de administración discontinua de la misma cantidad de una composición con el tiempo, sino que comprende la administración de la misma dosis de la composición en una frecuencia reducida o la administración de dosis reducidas. Las administraciones de liberación sostenida o de pulsos son particularmente preferida en condiciones crónicas, ya que cada dosis de pulso se puede reducir y la cantidad total de un compuesto, tal como, por ejemplo, todos los antibióticos aminoglucósido administrados durante el curso del tratamiento para el paciente se minimiza.

[00200] El intervalo entre pulsos, cuando sea necesario, se puede determinar por un versado en el arte. A menudo, el intervalo entre pulsos se puede calcular mediante la administración de otra dosis de la composición cuando la composición o el componente activo de la composición ya no son detectable en el sujeto antes de la entrega del siguiente pulso. Los intervalos también se pueden calcular a partir de la vida media *in vivo* de la composición. Los intervalos podrán calcularse como mayor que la vida media *in vivo*, o 2, 3, 4, 5 y hasta 10 veces mayor que la vida media de la composición. Se describen varios métodos y aparatos para composiciones pulsantes por infusión u otras formas de suministro al paciente, en las patentes U.S. Nos.: 4.747.825; 4.723.958; 4.948.592; 4.965.251 y 5.403.590.

[00201] En algunas implementaciones, las preparaciones de liberación sostenida que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF se pueden preparar. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el inhibidor, en el que las matrices están en la forma de artículos hechos, e.g., películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli (vinilalcohol), polilactidas (Patente U.S. No.

3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno vinilo acetato no degradable, copolímeros degradable de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas del copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico.

[00202] Las formulaciones que comprenden los antibióticos aminoglucósidos y/o compuestos que estimulan la PMF descritos en este documento, que se utilizarán para la administración *in vivo* están preferiblemente estériles. Es decir, ya acabadas por filtración a través de, por ejemplo, membranas de filtración estériles, y otros métodos conocidos por un versado en el arte.

[00203] Los siguientes ejemplos de métodos que se utilizaron para demostrar la fuerza protón-motriz inducen metabolitos aminoglucósidos potenciados contra las persistencias bacterianas, y se pueden utilizar, por ejemplo para identificar además los compuestos que estimulan la PMF y adyuvantes para uso en los métodos y composiciones descritos en este documento.

EJEMPLOS

[00204] La resistencia a los antibióticos se está convirtiendo en un desafío médico importante. Los datos recopilados de la European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2005-2010 muestran un descenso sin obstáculos de la susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos más importantes de toda Europa. La resistencia a la aminopenicilina observada en enterobacteriaceae, resistencia a la meticilina en *S. aureus*, y la aparición de resistencia al glicopéptido en enterococci son algunas de las principales preocupaciones. La situación es aún más grave teniendo en cuenta el ritmo lento

de la química médica para producir nuevas sustancias antimicrobianas. Como una consecuencia ejemplar, los carbapenemas siguen siendo la última clase de antimicrobianos cuando se trata de β -lactamasas de espectro expandido o microbios portadores de ESBL. La aparición de resistencias a los carbapenémicos allana el camino a la "era post-antibióticos". Clásicamente los mecanismos descritos para la resistencia incluyen mutaciones del DNA que alteración los objetivos del antibiótico (quinolonas y rifampicina) y la transferencia horizontal de genes (e.g, β -lactamasas).

[00205] Sin embargo, un mecanismo cada vez más reconocido inicialmente identificado por Bigger es la "persistencia" (también llamado "tolerancia"). La persistencia se define como células dentro de una población bacteriana de antecedentes genéticos compartidos que entran en un estado metabólico reducido o estado latente, que muestra susceptibilidad reducida a los antibióticos. Estas células son llamadas persistencias. Este fenotipo no es fijo ni hereditario y la persistencia puede volverse espontáneamente al estado normal o activo. En la presencia de la presión antibiótica, las persistencias son favorecidas y sobreviven más tiempo; a través del estrés repetido de antibióticos, que pueden dar lugar, en última instancia, a través de mutagénesis o transferencia horizontal de genes, a células resistentes. Las persistencias también han sido implicadas en la formación de biopelículas (infección de cuerpo extraño) y las infecciones crónicas. Hasta la fecha, sin embargo, no existe una estrategia antimicrobiana contra ellos.

[00206] La fibrosis quística (CF) es un ejemplo clínico relevante para la persistencia. La enfermedad genética letal más común entre los caucásicos, con una frecuencia de 1 en 2000 a 3000 nacidos vivos. Es un trastorno autosómico recesivo debido a mutaciones en el gen de la fibrosis quística transmembrana reguladora de la conductancia (CFTR), que actúa entre otros como un canal de

cloruro. El transporte alterado de cloruro y otros iones afectados por CFTR (sodio y bicarbonato predominantemente), conduce a las secreciones viscosas en los pulmones, el páncreas, el hígado, el intestino y el tracto reproductivo que alteran su función, y al aumento del contenido de sal en las secreciones de las glándulas sudoríparas, el aclaramiento impedido de secreciones viscosas en los pulmones hace los pacientes propensos a la infección crónica.

[00207] Actualmente, la principal carga de los pacientes CF es complicaciones respiratorias que representan más del 80% de los casos de mortandad relacionadas con la CF. La morbilidad pulmonar de un paciente CF depende en gran medida de episodios infecciosos pulmonares. La colonización por *P. aeruginosa* de la vía pulmonar alterada, un entorno ideal para la bacteria, se correlaciona con una aceleración de la disminución de la función pulmonar y representa una causa principal de mortandad. La persistencia *P. aeruginosa* está bien documentada y se cree que desempeña un papel importante en la infección crónica en pacientes con CF. Inicialmente, las *Pseudomonas* crecen en las vías respiratorias como una cepa no mucoide que puede ser erradicada, sin embargo, con infección crónica, las células de *Pseudomonas* adoptan progresivamente un metabolismo de persistencia formando colonias mucoides y variantes de colonias pequeñas (SCV) llegando a ser muy difícil de erradicar. La *P. aeruginosa* SCV en pacientes -CF se correlaciona con el desarrollo de resistencia a los antibióticos. La acumulación de mutaciones en los genes asociados a resistencia puede dar lugar a cepas para las que no hay prácticamente ninguna opción terapéutica izquierda. Además, hay un beneficio de supervivencia para los pacientes restantes pronunciado libre de *P. aeruginosa*, por lo que su erradicación es un objetivo terapéutico altamente relevante.

[00208] Los contenidos de los cuales se incorporan por referencia en su totalidad en este documento y, en parte, en la PCT/US12/36492, son los métodos para la identificación de productos del metabolismo intermediario que potencian los antibióticos en las infecciones bacterianas.

[00209] Entre los metabolitos analizados, los componentes del TCA fuera de la vía alternativa del glioxilato resultaron más efectivos. La β -oxidación derivada de propionato recapitula las gripes de algún efecto, ya que puede entrar en el ciclo de Krebs a nivel succinilCoA. Por último, la glucosa, gluconato y piruvato, como miembros de la vía Entner-Doudoroff muestran niveles variables de eficiencia. Los miembros de la Embden Meyerhof (manitol y fructosa) no son eficientes, lo que es consistente con la ausencia en *Pseudomonas* de 6-Fosfofructokinasa.

Métodos

[00210] Erradicación de células persistentes

[00211] Las células madre congeladas se cultivan durante la noche a 37°C, después de lo cual una sola unidad formadora de colonia (CFU) se cultiva en caldo Luria-Bertani (LB) a 300 r.p.m. y 80% de humedad a una densidad óptica a 600 nm (OD600) de 0,3. Las células luego se diluyen 1: 1,000 en 25 ml de LB y se cultivan durante 16 horas a 37°C, 300 r.p.m, y 80% de humedad en frascos de 250 ml. La ciprofloxacina se añade en una concentración de 5 mg/l a los cultivos antes mencionados por 4 h. Después, las células se lavan y se centrifugan a 5000 rpm durante 15 minutos. A continuación, las muestras se lavan con 20 ml de PBS 1x filtrado y de nuevo se centrifugan a 5000 rpm durante 15 nims y se re-suspenden en medio mínimo M9. Las fuentes de carbono y antibióticos (tobramicina 40mg/l) se añaden y las muestras se incuban a 37°C, 300 r.p.m., y 80% de humedad.

[00212] En los puntos de tiempo especificados, se retiraron alícuotas 10- μ l de células, se diluyeron en serie y se sembraron (spot-plated) sobre placas de agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias por ml (c.f.u.ml/l). La concentración de las fuentes de carbono se normalizó para entregar 60 mM de carbono (e.g, glucosa 10 mM, fumarato 15 mM, piruvato 20 mM, etc.), los sobrevivientes se enumeraron por alícuotas de 10 μ l en placas con diluciones seriadas tomadas desde 1 ml centrifugado y lavado con PBS (AB restante). Solamente se contaron las diluciones que rindieron 4-40 colonias. La supervivencia se determinó dividiendo el c.f.u. ml⁻¹ de una muestra en cada punto de tiempo inicial por el c.f.u. ml⁻¹ para esa muestra. Los resultados muestran una mortandad mejorada de 1000-10000 veces (FIGs.1A-1b).

Erradicación de células en fase estacionaria.

[00213] Las células madre congeladas se cultivan durante la noche a 37°C, después de lo cual una sola unidad formadora de colonia (CFU) se cultiva en caldo Luria-Bertani (LB) a 300 r.p.m. y 80% de humedad a una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0,3. Las células luego se diluyen 1: 1,000 en 25 ml de LB y se cultivan durante 16 horas a 37°C, 300 r.p.m, y 80% de humedad en frascos de 250 ml. Las células luego se lavan (velocidad 5000 rpm (Centrífuga Thennofisher) durante 15 mins. a continuación, las muestras se lavan con 20 ml de PBS 1x filtrado (de nuevo velocidad de 5000 rpm durante 15 minutos) y se resuspenden en medio mínimo M9. Se añadieron fuentes de carbono y antibióticos (tobramicina 40mg/l) y las muestras se incubaron a 37°C, 300 r.p.m. y 80% de humedad.

[00214] En los puntos de tiempo especificados, se retiraron alícuotas de 10 μ l de células y se lavaron con PBS, diluido en serie y se detectaron en placas sobre agar LB para determinar las unidades formadoras de colonias por ml (c.f.u. ml⁻¹).

Las concentraciones de las fuentes de carbono se normalizaron para entregar 60 mM de carbono (e.g, glucosa 10 mM, fumarato 15 mM, piruvato 20 mM, etc.). Los sobrevivientes se enumeraron por alícuotas de 10 μ l en placas con diluciones seriadas tomadas desde 1 ml centrifugado y lavado con PBS (AB restante). Solamente se contaron las diluciones que rindieron 4-40 colonias. La supervivencia se determinó dividiendo el c.f.u. ml⁻¹ de una muestra en cada punto de tiempo inicial por el c.f.u. ml⁻¹ para esa muestra. Los resultados muestran una mortandad mejorada de 10000-100000 veces (Fig. 2A-2B).

Antibióticos y productos químicos

[00215] En este estudio se utilizaron las siguientes concentraciones de antibióticos; 10 μ g ml⁻¹ gentamicina, 30 μ g ml⁻¹ Kanamicina, 50 μ g ml⁻¹ estreptomicina, 5 μ g ml⁻¹ ofloxacina, 100 μ g ml⁻¹ ampicilina, 40 μ g ml⁻¹ tetraciclina, 50 μ g ml⁻¹ cloramfenicol, 100 μ g ml⁻¹ espectinomicina, 20 μ g ml⁻¹ cabonilcianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP); se utilizó en los experimentos para suprimir la fuerza protón-motriz. El cianuro de potasio 1mM se utilizó para inhibir la respiración aeróbica. Se hizo una solución madre de CCCP, en dimetilsulfoxido a 500 μ M y se almaceno a 4°C. Todos los antibióticos y productos químicos se adquirieron de Sigma y Fisher.

Cepas

[00216] Las cepas parentales utilizadas en este estudio fueron *E. coli* (K 12 EMG 2 y *S. aureus* (ATCC 25923). Todos los *E. coli* nocaout (ver Tabla 2) fueron transducidos en la cepa EMG2 a partir de cepas de la colección KEJO nocaout utilizando el método del fago P1. Todas las cepas se curaron usando pCP20 y procedimientos estándar de laboratorio antes de su uso en ensayos.

Ensayos de persistencia

[00217] Para los ensayos de persistencia con *E. coli*, las muestras se cultivaron hasta la fase estacionaria como se describió anteriormente. Los cultivos se trataron durante 4 horas con ofloxacina 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en las condiciones de crecimiento establecidas anteriormente. Trabajos previos demostraron que el tratamiento durante 3 h bajo estas condiciones elimina todas las células no persistentes susceptibles²⁵.

Captación de rojo Texas por gentamicina

[00218] El complejo rojo Texas-Gentamicina se hizo como se ha descrito anteriormente²⁷. 4 °C, se disolvió 1 mg de rojo Texas (invitrogen en 50 μl de N,N dimetilformamida anhidra de alta calidad. El rojo Texas disuelto se agregó lentamente a 2.3 ml de solución de gentamicina 10 mg ml^{-1} en K_2CO_3 100mM a 4°C.

[00219] La captación de rojo Texas gentamicina inducida por las fuentes de carbono en las células en fase estacionarias se determinó mediante la adición de fuentes de carbono concentradas (ver sección sobre medio y condiciones de crecimiento para las concentraciones) para los cultivos en fase estacionaria y la incubación de los mismos durante 30 minutos a 37°C, 300 rpm, y 80% de humedad. Luego se añadió el rojo Texas gentamicina concentrado a una concentración final de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y las muestras se incubaron por 5 min. Luego se lavaron 100 μl de cada muestra con 1 ml de PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Después se añadieron 200 μl de la muestra resuspendida a 800 μl de PBS en tubos de flujo. Las muestras fueron analizadas en un citometro de flujo BD FACS Aria II con las siguientes condiciones: Voltaje mCherry, 650 V: umbral de

FSC, 1000; eventos registrados, 100.000; eventos mCherry de salida cerrada, <30.

Mediciones de potencial de membrana

[00220] El KIT DE POTENCIAL DE MENBRANA BACTERIANA DE FONDO BACLIGHT (B34950, Invitrogen) se puede utilizar para evaluar el cambio en la fuerza protón-motriz inducida por los metabolitos. El potencial de membrana inducida por fuentes de carbono en células en fase estacionaria se puede determinar mediante la adición de fuentes de carbono concentradas (ver sección de medios y condiciones de crecimiento para concentraciones) y 10 µl de DiOC2 (3) (tinción de membrana) a cultivos en fase estacionaria, seguido de incubación durante 30 min a 37°C, 300 rpm, y 80% de humedad. Se añadieron 10 µl de los cultivos a 1 ml de PBS en tubos de flujo inmediatamente antes del análisis. Las muestras pueden ser analizadas en un citometro de flujo BD FACS Aria II con los ajustes optimizados de acuerdo con el manual del kit Baclight. Los ajustes que se pueden utilizar son: Voltaje FITC, 250 V: Voltaje mCherry, 650 V; umbral FSC, 1000; eventos registrados 100.000. FSC y SSC, los valores extremos fueron cerrados mediante inspección visual antes de la adquisición de datos, se determinaron y normalizaron los valores de rojo/verde (mCherry/FITC) para cada célula, a continuación, en comparación se compararon con las muestras sin metabolitos para determinar el cambio relativo en la PMF.

Experimentos anaerobios

[00221] La *Escherichia coli* se cultivó en una OD₆₀₀ de 0,3, después se diluyó 1:1000 en 25 ml de LB anaeróbico NaNO₃ 10 mM y se cultivaron durante 16 horas a 37°C, 200 r.p.m, 1,5-2,0 de hidrógeno y <50 p.p.m. de oxígeno en frascos de 250

ml. Los cultivos se trataron a continuación con una fuente de carbono y metabolito en presencia o ausencia de un NaNO_3 adicional 10 mM. Se añadió el NaNO_3 para determinar si incrementando la concentración del aceptor terminal de electrones podría aumentar la potenciación del aminoglucósido.

Ensayo de Biopelícula

[00222] Se diluyeron en LB cultivos que crecieron durante la noche 1: 200 en LB precalentado que luego se agregó a las placas MBEC (Innovotech) a 150 μl por pozo. Las placas se incubaron a 35°C, 150 r.p.m., por 24 h., a continuación, se lavaron las clavijas en una placa de microtitulación con 200 μl de PBS 1x por pozo. Las clavijas luego se agregaron a una placa de microtitulación que contiene 200 μl de sales mínimas M9 (para *E. coli*) o filtrado esteril de los medios de la fase estacionaria (para *S. aureus*, además de una fuente de carbono y antibióticos. Las placas se incubaron a 35°C, 150 r.p.m. por 4 h, las clavijas se lavaron dos veces en placas de microtitulación con 200 μl de PBS 1x por pozo. Para desalojar las células de la biopelícula, las clavijas se colocaron en una placa microtituladora de 145 μl de PBS 1x por pozo y se sometieron a ultrasonidos en un baño de agua durante 30 minutos a 40 kHz. Las diluciones seriales y las sembradas (spot-plated) se realizaron para determinar las c.f.u. viables por clavija. Para la determinación de la dependencia de la eliminación de la biopelícula de *E. coli* con el pH, se llevó a cabo el procedimiento anterior en sales M9 tamponadas a un pH apropiado con ácido cítrico, en oposición a KH_2PO_4 que es usado típicamente para M9. Ensayo de infección crónica del tracto urinario del ratón.

[00223] Los ratones hembra Charles River BALB/e (con un peso 22-26 g) recibieron implantación quirúrgica en el tracto urinario de tubos de catéter PE50 de 6 mm que habían sido incubados en cultivos de *E. Coli* uropatogénica por 24 h

para formar biopelículas. Después de 48 h de cirugía, los ratones recibieron, bien sea ningún tratamiento o tratamiento dos veces al día, por vía intravenosa con gentamicina (1 mg kg^{-1}) o manitol ($1,5 \text{ g kg}^{-1}$) mas gentamicina (1 mg kg^{-1}) durante 3 días. En cada grupo se incluyeron siete u ocho ratones. 24 h después del tratamiento se extrajo el tubo del catéter para determinar la viabilidad de la biopelícula y se retiraron los riñones para determinar la carga bacteriana, los materiales de ratón fueron proporcionados por Vivisource Laboratories, una instalación aprobada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y por la Oficina de Bienestar de los Animales de Laboratorio, donde se realizó todo el trabajo experimental *in vivo*. El estudio se hizo de acuerdo con el cuidado animal institucional de Vivisource y las políticas y normas de procedimiento.

Análisis de microarreglos de *Staphylococcus aureus*

[00224] Los datos de los microarreglos en bruto (Archivos .CEL;) para dos fases exponenciales (GSM524189, GSM 524193) y dos fase estacionarias (GSM 524362, GSM 524363) de cultivos *S. aureus* se descargaron del Gene Expression Omnibus (GEO) series GSE20973 (Majerczyk, C.D et al los blancos directos de CodY en *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol. 192, 2861-2877 (2010); Majerczyk, C.D. et al blancos directos de CodY en *Staphylococcus aureus* J. Bacteriol, 192, 2861-2877, (2010)). Los datos fueron procesados con RMA expresp usando ajuste de fondo, normalización cuartil y resumen perfeccionado de la mediana) para calcular los valores de la expresión RMA_{30} . Los valores promedio de expresión se calcularon para los datos de la fase exponencial y la fase estacionaria y los cambios relativos de repetición (estacionaria/exponencial) se reportan en la tabla 3.

Software

[00225] Se utilizó MATLAB (Marhworks) para procesar los datos citométricos de flujo. Para el análisis de datos de microarreglos y generar mapas de calor a escala utilizando la función de imágenes. Se utiliza Microsoft Excel para trazar ensayos de supervivencia.

Tabla 1: Enzimas inactivadas para determinar la fuente de generación de NADH.

Enzima	Gen(es)	Equivalente de reducción
Glucosa 6-fosfato-1-deshidrogenasa	<i>Zwf</i>	NADPH*
6-fosfofructoquinasa	<i>pfkA pfkB</i>	NADH
Citrato/metilcitrato sintasa	<i>gltA prpC</i>	NADH
Piruvato deshidrogenasa	<i>aceE</i>	NADH

* El NADPH se puede convertir en NADH por la piridina nucleótido transhidrogenasa (sthA)

Tabla 2: Primers de chequeo para cepas genéticas nocaut

Gen	Primers hacia delante	Primers inverso
<i>mltD</i>	CTCCTCACGGAGAGGGTTT (SEQ ID NO: 1)	TCAAGCACACGGTTTTTCAAA (SEQ ID NO: 2)
<i>zwf</i>	CGTAATCGCACGGGTGGATAA (SEQ ID NO: 3)	TTATGACTGAAACGCCTGTAACCG (SEQ ID NO: 4)
<i>pfkA</i>	CCAGGGAGGGTAAACGGTCTATG (SEQ ID NO: 5)	GGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCC (SEQ ID NO: 6)
<i>pfkB</i>	ATTTCTTCACTTTCCGCTGATTCTG (SEQ ID NO: 7)	ATTTCCCTCATCATCCGTCATAGTG (SEQ ID NO: 8)
<i>poxB</i>	TGGTCGGGTAACGGTATCAC (SEQ ID NO: 9)	ACCGTTAGTGCCTCCTTTCTCT (SEQ ID NO: 10)
<i>gltA</i>	TAAAGCCAGGTTGATGTGCGAA (SEQ ID NO: 11)	AAGTATTGGGTTGCTGATAATTTGAGC (SEQ ID NO: 12)
<i>prpC</i>	GACCCTACAAATGATAACAATGACGAGG (SEQ ID NO: 13)	GACGATATCAACGATTTCACGATCAAA (SEQ ID NO: 14)
<i>aceE</i>	GTGAGCGTTCTCTGCGTCGTCT (SEQ ID NO: 15)	TCTCTTTCACGGTGCCAGCAA (SEQ ID NO: 16)
<i>cyoA</i>	TTCCCGTAAAATGCCACAC (SEQ ID NO: 17)	TAATGCCAGCGATCGTAACC (SEQ ID NO: 18)
<i>cydB</i>	GCCCAAGCAGCCTGAAAA (SEQ ID NO: 19)	CGGTGATTACCCCAAACGAA (SEQ ID NO: 20)
<i>appB</i>	TGCAGAAATATGCCCGTCTG (SEQ ID NO: 21)	AGGGTGGAGAGCGAACACAT (SEQ ID NO: 22)
<i>ndh</i>	GCGAAGAACATTTTCATTGCTGTA (SEQ ID NO: 23)	GATCGCGCTGTTCTCAAG (SEQ ID NO: 24)
<i>nuoI</i>	TGTCCTTCGGCTGAAAAATC (SEQ ID NO: 25)	CTCGCAAGGTCGCAAGTATG (SEQ ID NO: 26)
<i>kanR</i>		GGTCCGCCACACCCAGCC (SEQ ID NO: 27)

Tabla 3: Regulación del pliegue de la fase estacionaria de los transportadores de metabolitos.

Nombre del Gen	# de Acceso UniProt	Replicado Exponencial 1	Replicado Exponencial 2	Replicado Estacionario 1	Replicado Estacionario 2	Veces de Cambio Extacionario/ Potencial	Descripción
Crr	Q5HF29, P60856, P60857	100.18	107.50	120.26	131.12	1.21	Eenzima IIA fosfotransferasa específica de glucosa
ptsG	Q5HJI3, Q7A807, Q99X32	233.59	218.12	72.59	60.48	0.29	Componente del sistema PTS de EIICBA glucosa específico.
mtlA	Q5HE48, Q7A4B3, Q99SA3	5.59	4.61	3.21	3.28	0.64	Componente del sistema PTS-manitol específico EIICB
mtlF	Q5HE46, P0A0D7, P0A0D8	23.64	16.75	14.62	23.53	0.94	Componente de la enzima fosfotransferasa II A manitol específica
SACOL 2662	Q5HCQ6, Q7A374, Q99QZ7	8.93	8.18	206.91	150.47	20.88	componente IIABC sistema PTS fructosa-específica

Resumen de Resultados

[00226] Los aminoglucósidos son el pilar de la supresión crónica CF y parte del tratamiento de las exacerbaciones pulmonares agudas. Sin embargo, requieren el transporte activo para su entrada en la célula y por lo tanto tienen una débil actividad frente a células latentes como las células planctónicas de Pseudomonas o persistentes, sin embargo, recientemente se mostró en *E. coli* que los aminoglucosidos se podrían potenciar por estimulación metabólica.

[00227] Hemos probado si la estimulación metabólica podría potenciar los aminoglucósidos contra las Pseudomonas persistentes. Tenemos pruebas de metabolitos de las vías Entner-Doudoroff, la vía Pentosa, así como los componentes del ciclo del ácido tricarboxílico (RCA) y un conector entre la β-oxidación y el TCA que podría restaurar la mortalidad aminoglucósidos de las células persistentes. Las persistentes se aislaron a partir de células en fase

estacionaria profunda a través de la selección ciprofloxacina y se resuspendieron en medio mínimo que contiene la fuente de carbono específica. La concentración de la fuente de carbono se normalizó para entregar 60 mM de carbono (en forma de fumarato que contiene 4 átomos de carbono, se administró a 15 mM).

[00228] La tobramicina se potenció por fuentes de carbono específicas de la ruta Entner-Doudoroff y el ciclo TCA (Fig. 1), pero no de las vías de Pentosa. En consonancia con el hecho que la *Pseudomonas* no tiene 6-fosfofructoquinasa las moléculas de la vía Embden-Meyerhof no tuvo ningún efecto. Los más potentes metabolitos fueron succinato y fumarato, que se encuentran en una posición en el exterior del TCA de la desviación del glioxilato. Sin desear estar limitado por la teoría, estos datos indican que la derivación glioxilato en *P. aeruginosa* juega un papel en la derivación de las fuentes de carbono fuera del TCA para disminuir la tasa metabólica y serían consistentes con las observaciones en *Micobacterias tuberculosis* que isocitrato liasa es crítica para la persistencia in vivo. También documentamos la cinética de esta potenciación y se probó si otras clases de antibióticos bacterianos (β -lactamas y quinolonas se potenciaron pero sólo se encontró una potenciación marginal (Fig. 1).

[00229] Como se mencionó anteriormente, las células de *Pseudomonas* en fase estacionaria planctónicas son sólo débilmente sensibles a aminoglucosidos. Nosotros probamos si nuestra mejor fuente de carbono utilizada (i.e., fumarato) podría potenciar la tobramicina persistente y se encontró que (1) las dosis crecientes de fumarato conducen al aumento de la mortandad de las células para una dosis dada de Tobramicina (FIG. 2B) y que (2) para una dosis creciente dada de fumarato la tobramicina también conducen a un aumento de mortandad (Fig. 2A).

[00230] Entre los metabolitos probados, los componentes del TCA fuera de la vía alternativa del glioxilato probaron ser los más efectivos. El propionato recapitulado derivado de la β -oxidación tiene algún efecto, ya que puede entrar en el ciclo TCA al nivel succinilCoA, Por último, la glucosa, el gluconato y el piruvato, como miembros de la vía Entner-Doudoroff mostraron niveles variables de eficacia. Es de destacar que los miembros de la vía Embden-Meyerhof (Manitol y fructosa) no fueron eficientes, lo que es coherente con la deficiencia en las *Pseudomonas* de la 6-fosfofructokinasa.

[00231] Se demostró la potenciación de los animoglucosidos con base en metabolitos de las células en fase estacionaria *P. aeruginosa*. **La FIG. 3A** muestra que la selección de los compuestos del metabolismo intermediario se hizo para evaluar la potenciación de la tobramicina (TBR), incluyendo la glicólisis, la vía de Pentosa, el ciclo del ácido tricarboxílico, que comprende la derivación del glioxilato y los compuestos fuera de él, así como un enlace con la β -oxidación. **La FIG. 3B** muestra la supervivencia en CFU por ml para las células no tratadas (sin AB) y las células tratadas con tobramicina (TBR) en una concentración de 40 [mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RIB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), α -cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP), mpentse en fase estacionaria, las concentraciones de fuentes de carbono fueron emparejados para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 3C** muestra los efectos de fumarato (FMR) y glioxilato (GLX) que fueron comparados sin fuente de carbono con una dosis más alta de tobramicina (320 [mg/l]). **La FIG. 3D** muestra la cinética de potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina sola, el fumarato solo o sin tratamiento. **La FIG. 3E** muestras las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina

(TBR) a una concentración de [40mg/L] se graficaron para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 3F** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[00232] Se demostró la potenciación de los animoglucosidos con base en *P. aeruginosa* persistente. **La FIG. 4A** muestra el establecimiento de persistencia por selección de la ciprofloxacina; las condiciones incluyen, sin tratamiento (línea de color negro, ○), 5 mg/l (▼), 10 mg/l (▲), 20 mg/l (■), 40 mg/l (●) de ciprofloxacina. **La Fig. 4B** muestra un panel de metabolitos que también se ensayó para la potenciación de la tobramicina (TBR) en una concentración de [40 mg/l], sin fuente de carbono (CTRL), o ribosa (RLB), arabinosa (ARA), fructosa (FRU), manitol (MAN), glucosa (GLC), gluconato (GLN), piruvato (PRV), acetato (ACE), oxaloacetato (OXA), citrato (CIT), glioxilato (GLX), alfa-cetoglutarato (aKG), succinato (SUC), fumarato (FUM), y propionato (PRP). Las concentraciones de las fuentes de carbono fueron emparejadas para tener 60 mM de carbono. **La FIG. 4C** muestra la cinética de la potenciación de la tobramicina por fumarato (FMR) en comparación a la tobramicina. **La FIG. 4D** muestra las curvas de respuesta a la dosis de las células persistentes sin antibiótico o con dosis fijas de la tobramicina (TBR) a una concentración de [40 mg/L] graficadas para dosis crecientes de fumarato (FMR) en comparación con solo fumarato. **La FIG. 4E** muestra la respuesta dependiente de la dosis a la tobramicina en presencia o ausencia de fumarato.

[00233] La también se muestran la potenciación en contextos clínicos relevantes. **Las Figs. 5A-5B Muestran** las curvas de mortandad para células en fase estacionaria de pacientes CF derivadas de cepas no mucoides tratadas con dosis crecientes de la tobramicina y sin fuentes de carbono (CTRL), el fumarato

(FMR) o piruvato (PRV). **La FIG. 5C** muestra las mismas curvas de mortandad con un paciente CF derivada de cepas no mucoides. **La FIG. 5D** muestra las mismas curvas de mortandad con una cepa derivada de pacientes CF con un alto perfil de resistencia a los antibióticos. **La FIG. 5E** muestra la mortandad antibiótica de biopelículas con tobramicina (TBR) sin fuente de carbono adicional (CTRL) o fumarato (FMR).

[00234] También se muestra la potenciación de las fuentes de carbono que provocan aumento en la absorción de la tobramicina a través de la acumulación PMF. **La FIG. 6A** muestra las medidas con base en la cartometría de flujo de la tobramicina etiquetada con fluorescencia en células PAO1, tratadas respectivamente, con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6B** muestra la medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de las células PAO1 tratadas respectivamente con fumarato (FMR), piruvato (PRV), glioxilato (GLX) o sin tratamiento (CTRL). **La FIG. 6C** muestra la evaluación de la criometría de flujo de la absorción de la tobramicina en ausencia o presencia de un inhibidor de PMF (NaN₃). **La FIG. 6D** muestra la evaluación mediante el ensayo de supervivencia del impacto de varios inhibidores de PMF en la letalidad de la tobramicina en fase estacionaria tratada con fuentes de carbono.

Referencias

1. Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622–1625 (2004).
2. Gefen, O., Gabay, C., Mumcuoglu, M., Engel, G. & Balaban, N. Q. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 6145–6149 (2008).
3. Gefen, O. & Balaban, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 704–717 (2009).
4. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nature Rev. Microbiol.* 5, 48–56 (2007).
5. Smith, P. A. & Romesberg, F. E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nature Chem. Biol.* 3, 549–556 (2007).
6. Levin, B. R. & Rozen, D. E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 4, 556–562 (2006).
7. Dhar, N. & McKinney, J. D. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 30–38 (2007).
8. Shah, D. et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 6, 53 (2006).
9. Vakulenko, S. B. & Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 430–450 (2003).
10. Magnet, S. & Blanchard, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.* 105, 477–498 (2005).
11. Davis, B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.* 51, 341–350 (1987).
12. Weisblum, B. & Davies, J. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. *Bacteriol. Rev.* 32, 493–528 (1968).
13. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. & Collins, J. J. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135, 679–690 (2008).
14. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 8172–8180 (2004).
15. Spoering, A. L. & Lewis, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746–6751 (2001).
16. Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. & Arrow, A. S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* 51, 439–457 (1987).
17. Bryan, L. E. & Kwan, S. Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23, 835–845 (1983).

18. Hill, S., Viollet, S., Smith, A. T. & Anthony, C. Roles for enteric d-type cytochrome oxidase in N₂ fixation and microaerobiosis. *J. Bacteriol.* 172, 2071–2078 (1990).
19. Govantes, F., Albrecht, J. A. & Gunsalus, R. P. Oxygen regulation of the *Escherichia coli* cytochrome d oxidase (cydAB) operon: roles of multiple promoters and the Fnr-1 and Fnr-2 binding sites. *Mol. Microbiol.* 37, 1456–1469 (2000).
20. Walters, M. C. III, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 317–323 (2003).
21. Mates, S. M. et al. Membrane potential and gentamicin uptake in *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79, 6693–6697 (1982).
22. Fraimow, H. S., Greenman, J. B., Leviton, I. M., Dougherty, T. J. & Miller, M. H. Tobramycin uptake in *Escherichia coli* is driven by either electrical potential or ATP. *J. Bacteriol.* 173, 2800–2808 (1991).
23. Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* 3, 91 (2007).
24. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797–810 (2007).
25. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. & Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* 230, 13–18 (2004).
26. Hansen, S., Lewis, K. & Vulic, M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2718–2726 (2008).
27. Sandoval, R., Leiser, J. & Molitoris, B. A. Aminoglycoside antibiotics traffic to the Golgi complex in LLC-PK1 cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 167–174 (1998).
28. Lu, T. K. & Collins, J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 11197–11202 (2007).
29. Majerczyk, C. D. et al. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 192, 2861–2877 (2010).
30. Irizarry, R. A. et al. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31, e15 (2003).
31. Lewis, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5, 48–56 (2007).
32. Gefen, O. & Balaban, N. Q. The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol Rev* 33, 704–717 (2009).
33. Bigger, J. W. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization. *Lancet* ii, 497–500 (1944).
34. Jayaraman, R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. *J Biosci* 33, 795–805 (2008).

35. Smith, P.A. & Romesberg, F.E. Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nat Chem Biol* 3, 549-556 (2007).
36. Levin, B.R. & Rozen, D.E. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 4, 556-562 (2006).
37. Lewis, K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Mosc)* 70, 267-274 (2005).
38. Kussell, E., Kishony, R., Balaban, N.Q. & Leibler, S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. *Genetics* 169, 1807-1814 (2005).
39. Harrison, J.J. et al. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* 151, 3181-3195 (2005).
40. Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y. & Lewis, K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett* 230, 13-18 (2004).
41. Moyed, H.S. & Bertrand, K.P. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol* 155, 768-775 (1983).
42. Rotem, E. et al. Regulation of phenotypic variability by a threshold-based mechanism underlies bacterial persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12541- 12546 (2010).
43. Korch, S.B., Henderson, T.A. & Hill, T.M. Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol Microbiol* 50, 1199-1213 (2003).
44. Spoering, A.L., Vulic, M. & Lewis, K. *GlpD* and *PlsB* participate in persister cell formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5136-5144 (2006).
45. McKinney, J.D. et al. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735- 738 (2000).
46. Dorr, T., Vulic, M. & Lewis, K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the *TisB* toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* 8, e1000317.
47. Hansen, S., Lewis, K. & Vulic, M. Role of global regulators and nucleotide metabolism in antibiotic tolerance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2718-2726 (2008).
48. Dorr, T., Lewis, K. & Vulic, M. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5, e1000760 (2009).
49. Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L. & Leibler, S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* 305, 1622-1625 (2004).
50. Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 377-392 (1997).
51. Drlica, K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol* 2, 504-508 (1999).
52. Tomasz, A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol* 33, 113-137 (1979).

53. Joers, A., Kaldalu, N. & Tenson, T. The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J Bacteriol* 192, 3379-3384 (2010).
54. Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N. & Lewis, K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186, 8172-8180 (2004).
55. Shah, D. et al. Persisters: a distinct physiological state of *E. coli*. *BMC Microbiol* 6, 53
56. Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F. & Arrow, A.S. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* 51, 439-457 (1987).
57. Davis, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol Rev* 51, 341-350 (1987).
58. Campbell, B.D. & Kadner, R.J. Relation of aerobiosis and ionic strength to the uptake of dihydrostreptomycin in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 593, 1-10 (1980).
59. Guest, J.R., Roberts, R.E. & Stephens, P.E. Hybrid plasmids containing the pyruvate dehydrogenase complex genes and gene-DNA relationships in the 2 to 3 minute region of the *Escherichia coli* chromosome. *J Gen Microbiol* 129, 671-680 (1983).
60. Costerton, J.W., Stewart, P.S. & Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322 (1999).
61. Singh, R., Ray, P., Das, A. & Sharma, M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65, 1955-1958 (2010).
62. Mah, T.F. & O'Toole, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9, 34-39 (2001).
63. Walters, M.C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J. & Stewart, P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 317-323 (2003).
64. Lewis, K. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol* 64, 357-372 (2010).
65. Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G. & Read, R.R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res* 66, 86-92 (2002).
66. Rediske, A.M. et al. Pulsed ultrasound enhances the killing of *Escherichia coli* biofilms by aminoglycoside antibiotics in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 771-772 (2000).
67. Lu, T.K. & Collins, J.J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11197-11202 (2007).
68. Spoering, A.L. & Lewis, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 183, 6746-6751 (2001).
69. Majerczyk, C.D. et al. Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192, 2861-2877 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina en combinación con fumarato.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad de fumarato está entre 5 mM y 30 mM.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad de fumarato está entre 10 mM y 20 mM.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente efectiva de tobramicina está entre 20 mg/L y 320 mg/L, inclusive.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: 16058124
Recibo: 17-103933
Fecha: 26/12/2017

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 141114
CUS: 303853323

Patente PCT
PRODUCTOS DEL METABOLISMO INTERMEDIARIO PARA POTENCIAR LOS ANTIBIOTICOS
AMINOGLUCÓSIDOS EN INFECCIONES BACTERIANAS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-01	Solicitud examen de patentabilidad Patente de Invención (DESCUENTO INTERNET	1	\$ 996,000	\$ 996,000
TOTAL					\$ 996,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: contactenos@sic.gov.co Conmutador: (571)5870000 Contact Center: (571)5920400