

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 900**

51 Int. Cl.:

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 33/04 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2017 PCT/IB2017/001615**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2018 WO18104777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2017 E 17832550 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2022 EP 3548043**

54 Título: **Composiciones antibióticas que comprenden iones de plata y ebselen**

30 Prioridad:

05.12.2016 US 201662430101 P

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

22.12.2022

73 Titular/es:

THIOREDOXIN SYSTEMS AB (100.0%)

Nanna Svartz Väg 2

171 65 Solna, SE

72 Inventor/es:

LU, JUN;

ZOU, LILI y

HOLMGREN, ARNE

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 930 900 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones antibióticas que comprenden iones de plata y ebselen

5 Antecedentes

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un gran desafío en todo el mundo. Las bacterias Gram negativas representan una gran amenaza para la vida humana y la medicina, ya que casi no quedan antibióticos para el tratamiento, por lo que es urgente encontrar nuevos principios y mecanismos. Un enfoque concertado desde la década de 1990 para abordar el aumento de las bacterias Gram positivas multirresistentes (MDR) en los sistemas de atención médica de EE. UU. y Europa parece haber sido fundamental para estimular la cantidad relativamente grande de productos dirigidos a las bacterias Gram positivas en los últimos años. La aparición de bacterias Gram negativas MDR presenta una gran amenaza para la vida humana y es un desafío para la medicina moderna. Tran et al (2009) *Applied and Environmental Microbiology* 75(11): 3586-3592 describen que un recubrimiento de organoselenio inhibe la formación de biopelículas en la superficie recubierta.

Breve resumen

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. La presente invención proporciona una composición antibiótica, en donde la composición antibiótica comprende: un agente que contiene plata; y un agente de organoselenio, en donde el agente que contiene plata comprende un ion de plata y el agente de organoselenio comprende ebselen.

En algunos casos, el agente que contiene plata puede comprender nitrato de plata. En algunos casos, el agente que contiene plata puede comprender dihidrogenocitrato de plata. El agente que contiene plata se puede proporcionar como iones de plata, nitrato de plata y/o dihidrogenocitrato de plata. El agente de organoselenio comprende un ebselen. El compuesto de organoselenio puede comprender un compuesto de selenazol, un compuesto de benzoisosenazol-3(2H)-ona, además de ebselen. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una forma farmacéutica de una solución o una suspensión. En algunos casos, una concentración del agente que contiene plata en la composición antibiótica puede ser aproximadamente de 0.5 a 50 μM , aproximadamente de 1 a 25 μM o aproximadamente de 1 a 10 μM . En algunos casos, una concentración del agente que contiene plata en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 5 μM . En algunos casos, una concentración del agente de organoselenio en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 4 a 25 μM , aproximadamente de 30 a 200 μM , aproximadamente de 30 a 150 μM o aproximadamente de 30 a 100 μM . En algunos casos, una concentración del agente de organoselenio en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 40 μM o aproximadamente 80 μM . En algunos casos, la relación molar del agente que contiene plata al agente de organoselenio o al revés puede ser de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20, por ejemplo aproximadamente 1:4, 1:8, o 1:16. En algunos casos, la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de aproximadamente 10-100 nM para una o más bacterias Gram negativas. En algunos casos, la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de aproximadamente 10-100 nM para una o más bacterias Gram positivas. En algunos casos, la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de aproximadamente 50 nM o inferior para una o más bacterias Gram negativas. En algunos casos, la una o más bacterias Gram negativas pueden comprender *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 y ebselen. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 4 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 20 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 40 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 80 μM en una forma farmacéutica líquida.

En algunos casos, la presente descripción proporciona una formulación farmacéutica que puede comprender la composición antibiótica descrita en el presente documento. En algunos casos, la formulación farmacéutica puede comprender además un excipiente descrito en el presente documento.

En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para inhibir o matar una o más bacterias, que comprende poner en contacto la composición antibiótica descrita en el presente documento con una o más bacterias. En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para tratar una infección bacteriana, que comprende poner en contacto la composición antibiótica descrita en el presente documento con la infección bacteriana. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram positivas. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias multirresistentes. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas multirresistentes. En algunos casos, la una o más bacterias pueden comprender *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o

cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en una superficie. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en un mamífero. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en un ser humano. En algunos casos, el contacto puede ser por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa o subcutánea. En algunos casos, el contacto puede ser por aplicación tópica. En algunos casos, el contacto puede ser por administración oral. En algunos casos, el contacto dura al menos aproximadamente: 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana o un mes. En algunos casos, el contacto se produce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces por hora o al día. En algunos casos, el contacto se produce aproximadamente cada 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 minutos u horas diariamente. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una sola dosis unitaria. En algunos casos, la cantidad del agente de organoselenio que se pone en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias puede ser aproximadamente de 10 a 100 mg, aproximadamente de 10 a 50 mg o aproximadamente de 20 a 30 mg, por ejemplo, aproximadamente 25 mg, por dosis. En algunos casos, una cantidad de plata puesta en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias puede ser aproximadamente de 1 a 20 mg, aproximadamente de 1 a 10 mg o aproximadamente de 5 a 7 mg, por ejemplo, aproximadamente 6 mg, por dosis.

En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición antibiótica, que comprende mezclar un agente que contiene plata y un agente de organoselenio. En algunos casos, la mezcla se puede realizar en un líquido. En algunos casos, la mezcla puede comprender añadir el agente que contiene plata a un líquido que puede comprender el agente de organoselenio. En algunos casos, la mezcla puede comprender añadir el agente de organoselenio a un líquido que puede comprender el agente que contiene plata.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A y 1B ilustran los efectos de la plata con ebselen en combinación en el crecimiento de *E. coli* y células HeLa. La Fig. 1A es un gráfico de líneas que muestra el efecto sinérgico de ebselen con nitrato de plata (AgNO_3) en combinación en el crecimiento de *E. coli*. Se diluyeron cultivos de una noche de *E. coli* DHB4 1:1000 en 100 μl de medio LB en placas de 96 micropocillos, y se trataron con diluciones seriadas de 100 μl de ebselen y AgNO_3 en combinación durante 16 h, y se determinó la viabilidad celular midiendo la $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$. La Ag^+ sola inhibía el crecimiento de *E. coli* con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 42 μM después de 16 h de tratamiento, mientras que ebselen 2 μM disminuía drásticamente la MIC de la Ag^+ a 4.2 μM ($p=0.00028<0.001$). La Fig. 1B es un gráfico de líneas que muestra los efectos de ebselen con AgNO_3 en combinación en el crecimiento de células HeLa. Las células HeLa se trataron con concentraciones seriadas de ebselen y AgNO_3 durante 24 h, y la toxicidad celular se detectó mediante el ensayo de MTT. La Ag^+ 5.0 μM y ebselen 2.5 μM en combinación no mostraron toxicidad sinérgica en células HeLa humanas ($p=0.98>0.05$). En las Figs. 1A y 1B, los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ (prueba t). La Fig. 1C es un gráfico de barras que muestra que ebselen solo no tiene efecto en el crecimiento de *E. coli*. Se diluyeron cultivos de *E. coli* DHB4 durante la noche a 1:1000 en 100 μl de medio LB en placas de 96 micropocillos y se trataron con diferentes concentraciones de ebselen durante 16 h. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm. Los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ (prueba t).

Las Figuras 2A a 2D ilustran que la plata con ebselen en combinación presentaba efecto bactericida sinérgico. *E. coli* DHB4 cultivada hasta $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ de 0.4 se trató con diluciones seriadas de ebselen y AgNO_3 en combinación. La Fig. 2A es un gráfico de líneas que muestra que la viabilidad celular representada midiendo la $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$. Las curvas de crecimiento mostraban un efecto bacteriostático sinérgico de la Ag^+ con ebselen en combinación en medio LB. La Ag^+ cinco μM y ebselen 40 μM en combinación inhibían el crecimiento de *E. coli* 480 min después del tratamiento ($p=0.0075<0.01$). La Fig. 2B es un gráfico de líneas que muestra los cambios de unidades formadoras de colonias de *E. coli* DHB4 en placas de LB 0, 10, 60, 120 y 240 min después del tratamiento. El efecto bactericida sinérgico de la Ag^+ 5 μM y ebselen 80 μM en combinación se confirmó mediante el ensayo de formación de colonias en placas de LB-agar. La Ag^+ cinco μM y ebselen 80 μM en combinación mataron a la mayoría de *E. coli* 60 min después del tratamiento ($p=0.00021<0.001$). La Fig. 2C es un grupo de gráficos de FACS de *E. coli* DHB4 teñida con yoduro de propidio (PI), y la Fig. 2D es un gráfico de barras que muestra los valores medios \pm s.d. (D) de *E. coli* DHB4 teñida con PI. La Ag^+ cinco μM y ebselen 20 μM en combinación mejoraban la frecuencia de la tinción con yoduro de propidio (PI) ($p=0.00083<0.001$). En las Figs. 2A a 2C, los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ (prueba t).

Las Figuras 3A a 3F ilustran la combinación de plata con ebselen que alteraba directamente los sistemas bacterianos de Trx y GSH. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ de 0.4 se trató con diluciones seriadas de ebselen y AgNO_3 en combinación. La Fig. 3A es un gráfico de barras que muestra que las actividades de TrxR se ensayaron usando reducción de DTNB en presencia de Trx en extractos de *E. coli*, Tris·HCl 50 mM

(pH 7.5), NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, en presencia de TrxR de *E. coli* 100 nM. La Ag⁺ cinco μ M y ebselen 20 μ M en combinación dieron como resultado una pérdida drástica de las actividades de TrxR ($p = 0.00018 < 0.001$). La Fig. 3B es un gráfico de barras que muestra que las actividades de Trx se ensayaron usando reducción de DTNB en presencia de Trx en extractos de *E. coli*, Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, Trx de *E. coli* 5 μ M. La Ag⁺ cinco μ M y ebselen 20 μ M en combinación dieron como resultado una pérdida drástica de las actividades de Trx ($p = 0.0036 < 0.01$). La Fig. 3C es un gráfico de barras que muestra los cambios del estado redox de Trx1 en *E. coli* tras el tratamiento con ebselen y AgNO₃. *E. coli* se hizo precipitar en TCA al 5% y se alquiló con AMS 15 mM, y se analizó el porcentaje de Trx1 reducida por transferencia Western. La Fig. 3D es un grupo de imágenes de transferencia Western que muestran cambios en el estado redox de Trx2 en *E. coli* tras el tratamiento con ebselen y AgNO₃. *E. coli* se hizo precipitar en TCA al 5% y se alquiló con AMS 15 mM, se usó Trx2 oxidada con diamida como control positivo de Trx2, y se analizó el porcentaje de Trx2 reducida por transferencia Western. La Fig. 3E es un gráfico de barras que muestra que las cantidades de GSH se midieron mediante un ensayo de reducción de DTNB acoplado a GR en extractos de *E. coli*, Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, GR 50 nM. El tratamiento con Ag⁺ cinco μ M y ebselen 20 μ M en combinación agotó el GSH funcional en 10 min en comparación con el control ($p = 0.000021 < 0.001$). La Fig. 3F es una imagen de transferencia Western que muestra los cambios de la S-glutacionilación de proteínas en *E. coli*. Las células se cultivaron, lavaron y resuspendieron en tampón de lisis que contenía IAM 30 mM. Después de lisado por sonicación, se llevó a cabo un ensayo de transferencia Western con anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a (VIRGEN, 101-A/D8) para complejos glutatión-proteína. En las Fig. 3A, 3B y 3E, los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (prueba t).

Las Figuras 4A a 4D ilustran los efectos inhibidores de la plata en el sistema de Trx de *E. coli in vitro*. La Fig. 4A es un gráfico de líneas que muestra la inhibición de la TrxR de *E. coli* por el AgNO₃. Se incubaron TrxR recombinante 100 nM pura y una mezcla de Trx 5 μ M con solución de AgNO₃ en presencia de NADPH 200 μ M, y luego se detectaron sus actividades mediante el ensayo de reducción de DTNB. La Fig. 4B es un espectro de fluorescencia de un complejo entre Trx1 reducida de *E. coli* 10 μ M con AgNO₃. La proteína Trx1 reducida de *E. coli* 10 μ M se incubó con una concentración en serie de solución de AgNO₃ y los espectros de fluorescencia se detectaron con una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se usó Trx1 oxidada (Trx-S₂) como control. La Fig. 4C es un gráfico de barras que muestra la inhibición de Trx por el AgNO₃. Después del tratamiento descrito en (B), se ensayó la actividad de Trx por un método de DTNB en presencia de Trx1 de *E. coli*. La Fig. 4D es un gráfico de barras que muestra la reversibilidad de la inhibición de Trx1 de *E. coli* por el AgNO₃. La Trx1 de *E. coli* inhibida con plata se pasó a través de una columna de desalinización para eliminar moléculas pequeñas y luego se midió la actividad de Trx. La Trx1 de *E. coli* sin la inhibición se usó como control. La inhibición de Trx1 por Ag⁺ era irreversible ya que la actividad de Trx1 no se recuperó después de la desalinización ($p = 0.00021 < 0.001$). Los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (prueba t).

Las Figuras 5A a 5C ilustran que ROS era un factor determinante para el efecto bactericida sinérgico de la plata y ebselen. La Fig. 5A muestra histogramas de FACS de *E. coli* teñida con H₂DCF-DA. La Fig. 5B es un gráfico de barras de la MFI media \pm s.d. de *E. coli* teñida con H₂DCF-DA. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con ebselen 20 μ M y AgNO₃ 5 μ M. El nivel de ROS se detectó por citometría de flujo (CyAn adp, Beckman coulter). El tratamiento con Ag⁺ 5 μ M o ebselen 20 μ M solos no cambió las concentraciones de ROS, mientras que la combinación de Ag⁺ 5 μ M y ebselen 20 μ M dieron como resultado un aumento de los niveles de ROS ($p = 0.00012 < 0.001$). La Fig. 5C es un gráfico de barras que muestra la detección de H₂O₂ usando el kit de ensayo de peróxido de hidrógeno/peroxidasa Amplex[®]Red (Invitrogen). Las reacciones que contenían reactivo Amplex[®] Red 50 μ M, HRP 0.1 U/ml y la cantidad indicada de H₂O₂ en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detectaron con absorbancia a 560 nm. El nivel de fondo determinado para una reacción de control sin H₂O₂ se ha sustraído de cada valor. Se verificó el H₂O₂ aumentado generado por células *E. coli* DHB4 tratadas con Ag⁺ 5 μ M y ebselen 20 μ M ($p = 0.00057 < 0.0001$). En las Figs. 5B y 5C, los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (prueba t).

Las Figuras 6A a 6B ilustran el modo de acción de la plata y el ebselen en un modelo de peritonitis leve y aguda en ratone *in vivo*. La Fig. 6A es un gráfico de líneas de mediciones de CFU de *E. coli* durante 36 horas en el modelo de peritonitis leve en ratones. Los ratones se infectaron por administración intraperitoneal de 100 μ l de 1.7×10^6 células de *E. coli* ZY-1. Después de 24 h, 12 ratones por grupo recibieron tratamientos antibacterianos (25 mg de ebselen/kg y 6 mg de AgNO₃/kg de peso corporal). 12, 24 y 36 h después del tratamiento, se recogió el líquido peritoneal para el análisis de la CFU de *E. coli* (n=12 ratones para cada grupo) ($p = 0.0055 < 0.01$), y los datos se presentan como medias \pm s.d. de tres experimentos independientes. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (prueba t). La Fig. 6B es un gráfico de líneas de mediciones de CFU de *E. coli* durante 96 horas en el modelo de peritonitis aguda en ratones. La inoculación se realizó por inyección intraperitoneal de 100 μ l de 6.0×10^6 CFU/ml de inóculos de *E. coli* ZY-1. Después de la inoculación durante 1 h, 10 ratones por grupo recibieron tratamientos antibacterianos y los ratones se observaron durante 7 días para evaluar la supervivencia general (n=10 ratones para cada grupo), y el experimento se realizó por duplicado.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra que el modelo de Bliss para la sinergia confirma un efecto sinérgico, entre la Ag⁺ y 4 antibióticos, frente a un modelo de bacterias Gram negativas, *E. coli*. El grado de sinergia se cuantificó utilizando el modelo de Bliss para sinergia, después de 1 y 4 h de tratamiento con AgNO₃ 5 μM en combinación con los siguientes antibióticos: gentamicina 80 μM, kanamicina 80 μM, geneticina 80 μM, tetraciclina 80 μM y se usó ebselen 80 μM como control positivo.

Las Figuras 8A y 8B ilustran que ROS era un factor determinante para los efectos bactericidas sinérgicos de la plata y los antibióticos en combinación. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con antibióticos 80 μM y AgNO₃ 5 μM en combinaciones, y se usó plata y ebselen en combinación como control positivo. La Fig. 8A es un gráfico de barras que muestra que el nivel de ROS se detectó por citometría de flujo (CyAnadp, Beckman Coulter) y se detectaron las MFI medias ± s.d. de *E. coli* teñidas con H₂DCF-DA. La Fig. 8B es un gráfico de barras que muestra la detección de H₂O₂ usando el Kit de ensayo de peróxido de hidrógeno/peroxidasa Amplex[®]Red (Invitrogen). Las reacciones que contenían reactivo Amplex[®] Red 50 μM, HRP 0.1 U/ml y la cantidad indicada de H₂O₂ en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se detectaron con absorbancia a 560 nm. El nivel de fondo determinado mediante una reacción de control sin H₂O₂ se ha sustraído de cada valor. Los datos se presentan como medias ± s.d. de tres experimentos independientes. *: p<0.05, **: p< 0.01, ***: p< 0.001 (prueba t).

Las Figuras 9A a 9C ilustran que los antibióticos solos no podían alterar directamente el sistema de Trx bacteriano. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con combinaciones de antibióticos y AgNO₃ durante 10 min, y se usó ebselen y AgNO₃ en combinación como control positivo. La Fig. 9A es un gráfico de barras que muestra las actividades de Trx ensayadas usando reducción de DTNB en presencia de Trx en extractos de *E. coli*. La Fig. 9B es un gráfico de barras que muestra las actividades de TrxR ensayadas usando reducción de DTNB en presencia de TrxR en extractos de *E. coli*. La Fig. 9C es una imagen de transferencia Western que muestra el porcentaje de Trx1 reducida. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con combinaciones de antibióticos y AgNO₃ durante 60 min, y se usó ebselen y AgNO₃ en combinación como control positivo. Se hicieron precipitar extractos de *E. coli* en TCA al 5% y se alquilaron con AMS 15 mM, y se analizó el porcentaje de Trx1 reducida por transferencia Western. Se representó la media ± s.d. de tres experimentos independientes. Se calcularon las significaciones de la prueba t entre los grupos de control y de descanso, y *: p< 0.05, **: p<0.01, ***: p< 0.001.

Las Figuras 10A y 10B ilustran que la plata y los antibióticos convencionales en combinación no podían alterar directamente el sistema de GSH bacteriano durante 10 minutos. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con combinaciones de antibióticos y AgNO₃ durante 10 min, y se usó ebselen y AgNO₃ en combinación como control positivo. La Fig. 10A es un gráfico de barras que muestra las cantidades totales de GSH medidas mediante el ensayo de reducción de DTNB acoplado a GR en extractos de *E. coli*. La Fig. 10B es una imagen de transferencia Western que muestra los cambios de la S-glutacionilación de proteínas en *E. coli*. Se representó la media ± s.d. de tres experimentos independientes. Se calcularon las significaciones de la prueba t entre los grupos de control y de ensayo, y *: p< 0.05, **: p<0.01, ***: p< 0.001.

Las Figuras 11A y 11B ilustran que la plata y los antibióticos convencionales en combinación no podían alterar directamente el sistema de GSH bacteriano durante 60 minutos. *E. coli* DHB4 cultivada hasta una OD_{600 nm} de 0.4 se trató con combinaciones de antibióticos y AgNO₃ durante 60 min, y se usó ebselen y AgNO₃ en combinación como control positivo. La Fig. 11A es un gráfico de barras que muestra las cantidades totales de GSH medidas mediante el ensayo de reducción de DTNB acoplado a GR en extractos de *E. coli*. La Fig. 11B es una imagen de transferencia Western que muestra los cambios de la S-glutacionilación de proteínas en *E. coli*. Se representó la media ± s.d. de tres experimentos independientes. Se calcularon las significaciones de la prueba t entre los grupos de control y de descanso, y *: p< 0.05, **: p<0.01, ***: p< 0.001.

Descripción detallada

La materia de la invención se define por las reivindicaciones. La presente descripción, en la medida en que no esté cubierta por las reivindicaciones, no forma parte de la invención.

La descripción del presente documento se dirige en general a composiciones antibióticas que comprenden múltiples agentes farmacéuticamente activos (dos, tres, cuatro o más) que son útiles en combinación como agentes terapéuticos antimicrobianos que tratan y/o previenen la infección bacteriana al matar o inhibir el crecimiento de bacterias. Por ejemplo, una composición que puede comprender un agente que contiene metal (p. ej., ion plata) y un agente antimicrobiano (p. ej., ebselen) en la combinación sinérgica descrita en el presente documento se dirige a los sistemas bacterianos de tioredoxina y glutatión y es potente contra infecciones bacterianas tales como las causadas por bacterias Gram negativas.

Una "cantidad eficaz" cuando se usa en relación con una composición o agente activo descrito en el presente documento es una cantidad suficiente para producir un resultado terapéutico en un sujeto que lo necesite. Por

ejemplo, un resultado terapéutico incluye tratar, prevenir, mejorar o disminuir la infección bacteriana y/o cualquier síntoma de la misma, tal como inflamación, fiebre, tos, estornudos, congestión nasal, secreción nasal, dolor de garganta, dolor, náuseas, vómitos o estreñimiento en un sujeto.

- 5 El término "aproximadamente" significa la indicación numérica a la que se hace referencia más o menos el 15% de esa indicación numérica a la que se hace referencia.

10 La presente descripción muestra que las bacterias Gram negativas multirresistentes (MDR) son muy sensibles a la plata y ebselen en una combinación sinérgica. Por el contrario, la plata no muestra toxicidad sinérgica con el ebselen contra células de mamíferos. Los experimentos bioquímicos pusieron de manifiesto que la plata y el ebselen producían un rápido agotamiento del glutatión y la inhibición del sistema de tiorredoxina en las bacterias. Los iones de plata se identificaron como fuertes inhibidores de la tiorredoxina y la tiorredoxina reductasa de *E. coli*, que son necesarias para la ribonucleótido reductasa y la síntesis del ADN y para la defensa contra el estrés oxidativo. La eficacia bactericida de la plata y el ebselen que causan estrés oxidativo se verificó además en el tratamiento de la peritonitis leve y aguda por *E. coli* MDR en ratones. Estos resultados demuestran que los sistemas redox dependientes de tiol en las bacterias podrían ser el objetivo en el diseño de nuevos fármacos antibacterianos. La plata y el ebselen actúan como una sonda para dirigirse a los sistemas bacterianos esenciales que podrían desarrollarse para nuevos tratamientos eficientes contra las infecciones bacterianas de Gram negativas MDR. La plata actuaba con sinergia fuerte con el fármaco de selenazol ebselen, para combatir las bacterias Gram negativas MDR difíciles de tratar en clínica, dirigiéndose a los sistemas antioxidantes dependientes de tiol. Los resultados se demostraron además mediante el tratamiento exitoso de ratones con peritonitis leve o aguda causada por *E. coli* MDR. El sistema redox es un sistema antioxidante universal que es esencial para el organismo vivo, la inhibición del sistema redox dará como resultado estrés oxidativo, lo que muestra un principio antibacteriano novedoso para detectar y usar nuevos antibióticos.

25 En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento mata bacterias Gram negativas MDR. En algunos casos, la composición antibiótica se dirige selectivamente a los sistemas redox bacterianos dependientes de tiol a través del fuerte efecto bactericida de la plata y el ebselen en combinación sinérgica contra las infecciones bacterianas positivas para GSH, particularmente en bacterias Gram negativas MDR. En algunos casos, los iones de plata son fuertes inhibidores tanto de la Trx como de TrxR de *E. coli*, y la combinación con ebselen agota el GSH y produce un fuerte aumento en la generación de ROS. En algunos casos, la presencia de ebselen mejora la eficacia de la plata y, por lo tanto, disminuye la concentración antibacteriana de plata necesaria para provocar un efecto, con una toxicidad selectiva altamente significativa en bacterias frente a células de mamíferos. Esta toxicidad selectiva facilita la aplicación médica sistémica de la plata en el tratamiento de bacterias Gram negativas MDR. En algunos casos, el efecto bactericida sinérgico de la Ag⁺ con ebselen en combinación es eficaz contra estos patógenos Gram negativos MDR (Tabla 1). Además, los resultados de los experimentos con animales indicaron que esta combinación de antibióticos puede considerarse candidata para ensayos clínicos contra bacterias MDR (Figs. 6A-6B, Tabla 1). La plata y el ebselen juntos pueden considerarse como una sonda que se dirige a funciones esenciales en las bacterias. Los resultados experimentales presentados aquí proponían mecanismos para el efecto antibacteriano sinérgico de la Ag⁺ con ebselen en combinación. La plata y el ebselen pueden inhibir directamente la TrxR de *E. coli* y agotar rápidamente el GSH, lo que daba como resultado la elevación de la producción de ROS para determinar la muerte celular (sinopsis). Las rutas redox dependientes de tiol regulan varias funciones celulares centrales. Así, la Ag⁺ con ebselen en combinación puede reaccionar con los grupos SH en el GSH, y particularmente Trx y TrxR y posiblemente muchas otras proteínas, lo que indica que el efecto inhibitorio de la Ag⁺ con ebselen en combinación puede involucrar varios objetivos celulares. Además, la Ag⁺ y el ebselen podrían dirigirse a otras moléculas: por ejemplo, la diguanilato ciclasa y el antígeno 85 de *M. tuberculosis*. Esto puede perjudicar el desarrollo de resistencia a los antibióticos en las bacterias.

50 Agentes activos

En el presente documento se describe una combinación de un agente que contiene metal y un agente antimicrobiano. El agente que contiene metal según la invención es un agente que contiene plata que comprende iones de plata. Un agente que contiene metal según la presente descripción puede comprender un metal o un ion metálico descrito en el presente documento. El agente que contiene metal puede comprender un ion metálico que posee actividad antibiótica, por ejemplo, iones de plata, cobre, zinc, mercurio, estaño, plomo, bismuto, cadmio, cerio, cromo y talio. Los iones metálicos antimicrobianos de plata, oro, cobre y zinc pueden considerarse seguros para uso in vivo y no son absorbidos sustancialmente en el cuerpo. El agente antimicrobiano puede ser un antibiótico tal como gentamicina, kanamicina, geneticina, tetraciclina, un agente que no sea oragoselenio o un agente organoselenio. En algunos casos, un agente que contiene metal (p. ej., plata) mejora los efectos antibacterianos de un agente de organoselenio (p. ej., ebselen) o ciertos antibióticos contra las bacterias Gram negativas dirigiéndose directamente al sistema bacteriano de tiorredoxina (Trx), el sistema de glutatión (GSH), o ambos. En ciertas ocasiones, dirigirse/atacar el sistema de GSH aumenta la eficacia de una composición antibiótica para matar una o más bacterias. En algunos casos, una composición antibiótica puede comprender un agente de plata y un antibiótico descrito en el presente documento.

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender un agente que contiene metal, ya sea en forma de un átomo metálico o un ion metálico no unido o unido a otra molécula por un enlace covalente o no covalente (p. ej., iónico). Los agentes que contienen plata pueden incluir compuestos covalentes tales como dihidrogenocitrato de plata, sulfadiazina de plata y sales de plata tales como óxido de plata, carbonato de plata, desoxicolato de plata, salicilato de plata, yoduro de plata, nitrato de plata, paraaminobenzoato de plata, paraaminosalicilato de plata, acetilsalicilato de plata, ácido etilendiaminotetraacético de plata. ("Ag EDTA"), picrato de plata, proteína de plata, citrato de plata, lactato de plata y laurato de plata. Los agentes de plata pueden ser compuestos covalentes o, por ejemplo, sales de plata, iones complejos de plata, plata coloidal, materiales compuestos de plata/zeolita, plata/fosfato, plata/partículas de vidrio (antimicrobiano, liberación controlada), o cualquier mezcla de los mismos. En algunos casos, las sales de plata son cloruro de plata, nitrato de plata, acetato de plata, benzoato de plata, bromato de plata, clorato de plata, lactato de plata, molibdato de plata, nitrito de plata, óxido de plata (I), perclorato de plata, permanganato de plata, selenato de plata, selenita de plata, sulfadiazina de plata, sulfato de plata y mezclas de los mismos. En algunos casos, los iones complejos de plata son iones complejos de cloro-plata, iones complejos de tiosulfato de plata o mezclas de los mismos. En algunos casos, las partículas de plata coloidal son nanopartículas de plata.

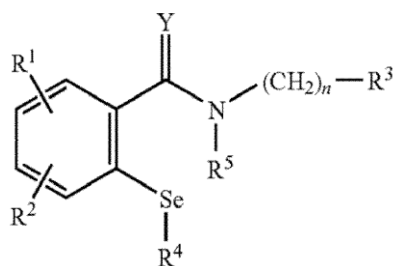
En algunos casos, el agente que contiene metal puede comprender una sal metálica. La sal metálica puede ser una sal de plata como nitrato de plata, acetato de plata, benzoato de plata, carbonato de plata, yodato de plata, yoduro de plata, lactato de plata, laurato de plata, óxido de plata, palmitato de plata, proteína de plata o sulfadiazina de plata. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de cobre tal como nitrato de cobre (II), sulfato de cobre, perclorato de cobre, acetato de cobre, tetraciano de cobre y potasio;. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de zinc tal como nitrato de zinc (II), sulfato de zinc, perclorato de zinc, acetato de zinc y tiocianato de zinc; una fuente de iones de mercurio como perclorato de mercurio, nitrato de mercurio y acetato de mercurio. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de estaño tal como sulfato de estaño. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de plomo tal como sulfato de plomo y nitrato de plomo. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de bismuto tal como cloruro de bismuto y yoduro de bismuto. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de cadmio tal como perclorato de cadmio, sulfato de cadmio, nitrato de cadmio y acetato de cadmio. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones cromo tal como perclorato de cromo, sulfato de cromo, sulfato de cromo y amonio y acetato de cromo. El agente que contiene metal puede comprender una fuente de iones de talio tal como una fuente de iones de talio como perclorato de talio, sulfato de talio, nitrato de talio o acetato de talio. La plata se puede proporcionar en una forma soluble o insoluble, tal como cloruro de plata, adsorbido sobre un soporte o partículas seleccionadas del grupo que consiste en óxido de titanio, óxido de magnesio, óxido de aluminio, óxido de silicio, óxido de calcio, óxido de bario, hidroxiapatita de calcio, yeso, carbonatos de calcio naturales triturados o precipitados, carbonatos de calcio y magnesio, silicatos, silicatos laminares, zeolitas, arcillas, bentonitas y óxido de titanio. La plata insoluble sobre un material de soporte puede ser útil para la aplicación tópica. La composición descrita en el presente documento también puede incluir una cantidad eficaz de un dispersante, tal como polinaftalenosulfonato, naftalenosulfonato o alquilsulfosuccinato.

En algunos casos, la concentración inhibitoria mínima (MIC) para una o más bacterias para un metal antibiótico (p. ej., plata) contenido en una composición antibiótica descrita en el presente documento puede ser menor que aproximadamente: 50 μ M, 25 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M, 0.5 μ M, 0.1 μ M, 50 nM, 25 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM o 1 nM.

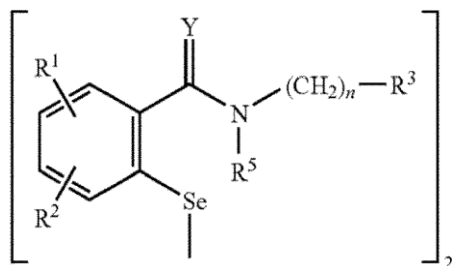
Los agentes de organoselenio según la invención deben comprender ebselen. Los agentes de organoselenio, tal como se describen actualmente, son compuestos químicos que contienen enlaces químicos de carbono a selenio. El selenio puede existir con estado de oxidación -2, +2, +4, +6, p. ej., Se (II). Los agentes de organoselenio incluyen selenoles, diseleniuros, haluros de selenilo, seleniuros (selenoéteres), selenóxidos, selenonas, ácidos selenínicos, ácidos perselénicos, selenuranos, seleniranos, selenas (p. ej., selenourea), selenocisteína, selenometionina, difenildiselenida, bencenoselenol. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un compuesto de selenazol o isoselenazol, por ejemplo, un compuesto de benzoisoselenazol-3(2H)-ona, por ejemplo, ebselen (Nombre químico: 2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3(2H)-ona, nombre IUPAC: 2-fenil-1,2-benzoselenazol-3-ona), diseleniuro de ebselen, o un análogo estructural tal como los descritos en el presente documento.

En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) o (I'):

60



(1)



(1')

- 5 en donde R¹ y R² representan independientemente un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo trifluorometilo y similares; R³ representa un grupo arilo, un grupo heterocíclico aromático y similares; R⁴ representa un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo -S-α-aminoácido y similares; R⁵ representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁-C₆; Y representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre; n representa un número entero de 0 a 5; y el átomo de selenio puede estar oxidado, cuyo ejemplo incluye 2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3(2H)-ona o una forma de anillo abierto de la misma. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un compuesto seleccionado del grupo que consiste en 2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3(2H)-ona o una forma de anillo abierto del mismo y una de sus sales fisiológicamente aceptables. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender una sustancia seleccionada del grupo que consiste en 2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3(2H)-ona o una forma de anillo abierto de la misma y una de sus sales fisiológicamente aceptables. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender una sustancia seleccionada del grupo que consiste en 2-fenil-1,2-bencisoselenazol-3(2H)-ona o una forma de anillo abierto de la misma y una de sus sales fisiológicamente aceptables.

20 Como el grupo alquilo C₁-C₆ representado por R¹ y R², se puede usar un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada, y los ejemplos incluyen grupo metilo, grupo etilo, grupo n-propilo, grupo isopropilo, grupo ciclopropilo, grupo n-butilo, grupo sec-butilo, grupo isobutilo, grupo terc-butilo, grupo n-pentilo y grupo n-hexilo. Como el grupo alcoxilo C₁-C₆ representado por R¹ y R², se puede usar un grupo alcoxilo de cadena lineal o ramificada, y los ejemplos incluyen grupo metoxi, grupo etoxi, grupo n-propoxi, grupo isopropoxi, n-butoxi grupo sec-butoxi, grupo terc-butoxi, grupo n-pentoxi y grupo n-hexoxi.

25 Como grupo arilo representado por R³, por ejemplo, se puede usar un grupo arilo de monocíclico a tricíclico, preferiblemente monocíclico o bicíclico que tiene de 6 a 14 átomos de carbono, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono. Más específicamente, se prefieren el grupo fenilo o el grupo naftilo y similares. Como grupo heterocíclico aromático representado por R³, por ejemplo, se puede usar un grupo heterocíclico aromático de monocíclico a tricíclico, preferiblemente uno monocíclico o uno bicíclico que contiene uno o más heteroátomos tales como átomo de nitrógeno, átomo de oxígeno y átomo de azufre. Cuando están contenidos dos o más heteroátomos, pueden ser iguales o diferentes. Los ejemplos incluyen grupo tienilo, grupo furilo, grupo pirrolilo, grupo imidazolilo, grupo pirazolilo, grupo isoxazolilo, grupo piridilo, grupo pirazinilo, grupo pirimidinilo, grupo piridazinilo, grupo indolizínilo, grupo isoindolilo, grupo indolilo, grupo isoquinolilo, grupo quinolilo, grupo ftalazinilo, grupo naftilidínilo, grupo quinoxalinilo, grupo quinazolinilo, grupo cinolinilo, grupo pteridinilo, grupo carbazolilo, grupo acridínilo, grupo fenantridínilo y grupo fenotiazínilo.

40 El grupo arilo, el grupo heterocíclico aromático, el grupo cicloalquilo de 5 a 7 miembros o el grupo cicloalqueno de 5 a 7 miembros representado por R³ puede tener uno o más sustituyentes en el anillo. Cuando el anillo está sustituido con dos o más sustituyentes, pueden ser iguales o diferentes. La posición del sustituyente no está particularmente limitada y el sustituyente puede estar presente en cualquier posición del anillo. El tipo de sustituyente no está particularmente limitado, y los ejemplos incluyen un grupo alquilo C₁-C₆, un grupo alqueno C₂-C₆, un grupo alquínilo C₂-C₆, un grupo arilo C₆-C₁₄, un grupo heterocíclico (el heterociclo usado en el presente documento incluye grupos heterocíclicos aromáticos y grupos heterocíclicos parcialmente saturados o saturados), un átomo de halógeno (el átomo de halógeno usado en el presente documento puede ser uno cualquiera de átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo o átomo de yodo), grupo hidroxilo, grupo oxo, grupo amino, grupo amonio, grupo imino, grupo mercapto, grupo tioxo, grupo ciano, grupo nitro, grupo

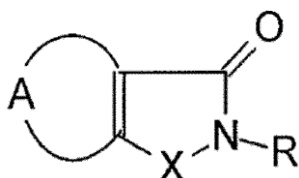
carboxilo, grupo fosfato, grupo sulfo, grupo hidrazino, un grupo ureido C₁-C₆, un grupo imido C₁-C₆, grupo isotiocianato, grupo isocianato, grupo alcoxilo C₁-C₆, grupo alquiltio C₁-C₆, un grupo ariloxi C₆-C₁₄, un grupo heterociclo-oxi, un grupo ariltio C₆-C₁₄, un grupo heterociclo-tio, un grupo aralquilo C₇-C₁₅, un grupo heterocicloalquilo, un grupo aralquiloxi C₇-C₁₅, un grupo heterociclo-alquiloxi, un grupo alcoxycarbonilo C₁-C₆, un grupo ariloxycarbonilo C₆-C₁₄, un grupo heterociclo-oxycarbonilo, un grupo alquilcarbonilo C₂-C₇, un grupo arilcarbonilo C₆-C₁₄, un grupo heterociclo-carbonilo, un grupo alquilcarboniloxi C₂-C₇, un grupo arilcarboniloxi C₆-C₁₄, un grupo heterociclo-carboniloxi, un grupo alquilcarbonilamino C₂-C₈, un grupo sulfonilo C₁-C₆, un grupo sulfinilo C₁-C₆, un grupo sulfonilamino C₁-C₆, un grupo carbamoilo C₁-C₆ y un grupo sulfamoilo C₂-C₆.

Los sustituyentes ejemplificados anteriormente pueden estar sustituidos además con uno o más de otros sustituyentes. Los ejemplos de tales sustituyentes incluyen un grupo hidroxil-alquilo C₁-C₆, un grupo alquilo C₁-C₆ halogenado, un grupo mono- o di-alquilamino C₁-C₆, un grupo alquilcarbonilo C₁-C₆ halogenado, un grupo arilo C₆-C₁₄ halogenado, un grupo hidroxiarilo C₆-C₁₄ y un grupo mono- o di-alquilcarbamoilo C₁-C₆. Sin embargo, los sustituyentes explicados anteriormente se mencionan solo a modo de ejemplo.

Aunque el tipo de grupo -S- α -aminoácido representado por R⁴ no está particularmente limitado, el grupo puede ser preferiblemente un resto de aminoácido que contiene un grupo tiol. El resto de -S- α -aminoácido puede ser un resto de un aminoácido que constituye una proteína o un compuesto peptídico. El tipo de proteínas o compuestos peptídicos no está particularmente limitado siempre que sean fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, se pueden usar preferiblemente proteínas séricas tales como albúmina y globulina. Entre las proteínas séricas, se prefiere más la albúmina y se prefiere particularmente la albúmina humana. Los ejemplos del grupo aralquilo representado por R⁴ cuyo resto arilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes incluyen el grupo bencilo, grupo parahidroxibencilo y grupo 2,4-dihidrobencilo. R⁴ y R⁵ pueden combinarse entre sí para representar un enlace simple y, en ese caso, se forma un anillo de 5 miembros que contiene el átomo de nitrógeno unido a R⁵ y el átomo de selenio. Como grupo alquilo C₁-C₆ representado por R⁵, se pueden usar los ilustrados anteriormente.

Pueden usarse sales fisiológicamente aceptables de los compuestos representados por la fórmula general (I) o (I') antes mencionada. La sal fisiológicamente aceptable la puede elegir adecuadamente el experto en la técnica. También pueden usarse hidratos de los compuestos en forma libre o sales fisiológicamente aceptables. Cuando el compuesto representado por la fórmula general (I) o (I') mencionada anteriormente tiene uno o más átomos de carbono asimétricos, se pueden usar estereoisómeros tales como isómeros ópticos y diastereoisómeros, cualquier mezcla de los estereoisómeros, racematos y similares.

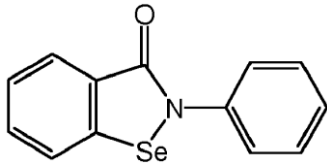
En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un ebselen o un análogo del mismo, tal como un compuesto que tiene una fórmula de:



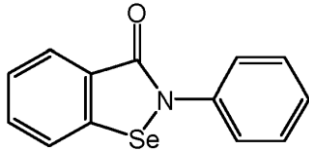
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde X es selenio o azufre, y

en donde R se selecciona de la grupo que consiste en: H, alquilo que tiene una cadena de carbonos de 1 a 14 átomos de carbono en donde la cadena de carbonos está ramificada o sin ramificar, que está opcionalmente sustituido con bensisoselenazol-3(2H)-ona-2-ilo, bensisotiazol-3(2H)-ona-2-ilo, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, arilo que está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₅, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, CHO, NO₂, F, Cl, Br, I y heteroarilo que está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₅, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, CHO, NO₂, F, Cl, Br y I, arilo que está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₅, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, CHO, NO₂, F, Cl, Br y I, heteroarilo que está opcionalmente sustituido con alquilo C₁-C₅, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, CHO, NO₂, F, Cl, Br y I, y en donde A representa una cadena de carbonos de 3 a 6 miembros saturada, insaturada o poliinsaturada en donde N puede sustituir opcionalmente a uno o más carbonos, y que está opcionalmente sustituido con uno o más de OR, SR y alquilamino, alquilo C₁-C₅, OH, alcoxilo, SH, NH₂, N-alquilamino, N,N-dialquilamino, COOH, CHO, NO₂, F, Cl, Br y I.

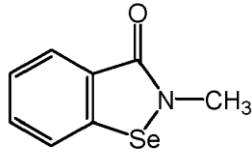
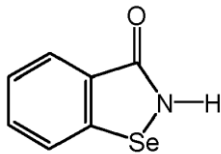
En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un ebselen que tiene una estructura química de:



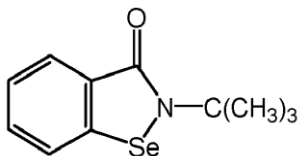
(EbSe 1). En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un análogo estructural de ebselen, tal como de las clases de bencisoselenazol-3(2H)-ona-arilo, -alquilo, 2-piridilo o bencisoselenazol-3(2H)-onas sustituidas con 4-piridilo, bisbencisoselenazol-3(2H)-onas, 7-azabencisoselenazol-3(2H)-ona, selenamida y diseleniuro de bis(2-carbamoil)fenilo, p. ej., que tienen una estructura química como sigue.



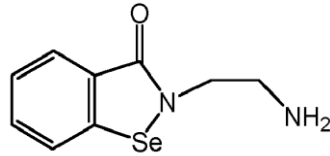
EbSe 2



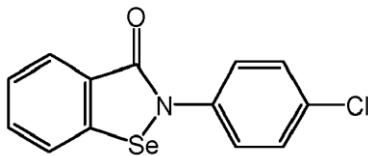
EbSe 3



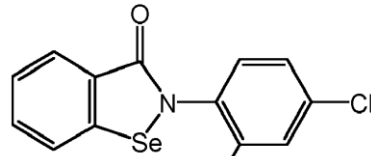
EbSe 4



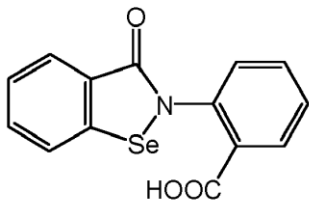
EbSe 5



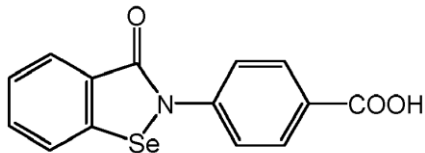
EbSe 6



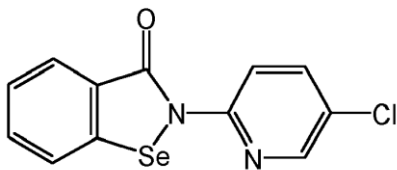
EbSe 7



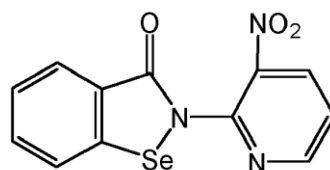
EbSe 8



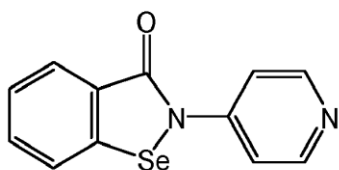
EbSe 9



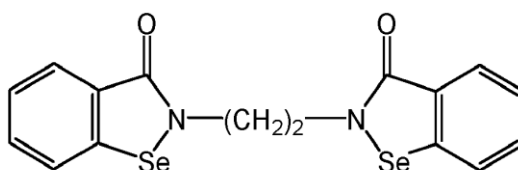
EbSe 10



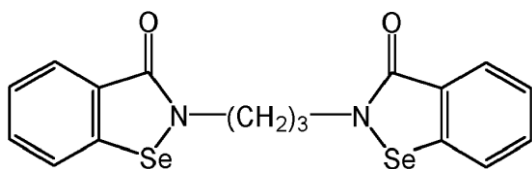
EbSe 11



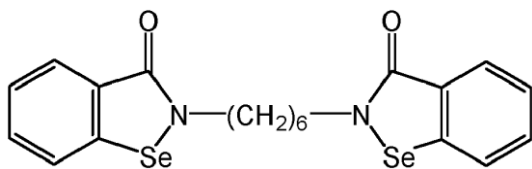
EbSe 12



EbSe 13

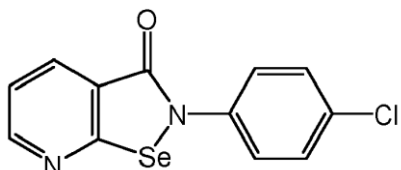


EbSe 14

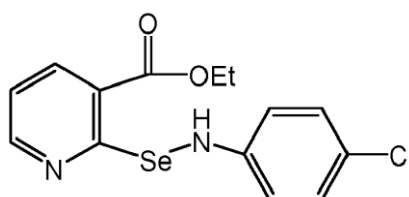


EbSe 15

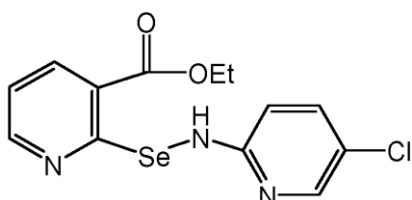
5



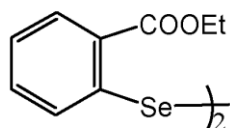
EbSe 16



EbSe 17



EbSe 18



EbSe 19

10

En algunos casos, la concentración inhibitoria mínima (MIC) para una o más bacterias para un agente de organoselenio (p. ej., ebselen) contenido en una composición antibiótica descrita en el presente documento puede ser menor que aproximadamente: 100 μM , 90 μM , 80 μM , 70 μM , 60 μM , 50 μM , 40 μM , 30 μM , 25 μM , 20 μM , 15 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 0.5 μM o 0.1 μM .

15

Los métodos y composiciones presentados en el presente documento pueden utilizar un agente activo en forma de base libre, sal, hidrato, polimorfo, isómero, diastereoisómero, profármaco, metabolito, complejo de par iónico o quelato. Se puede formar un agente activo usando una base o ácido no tóxico farmacéuticamente aceptable, que incluye una base o ácido inorgánico, o una base o ácido orgánico. En algunos casos, un agente activo que se puede usar en relación con los métodos y composiciones presentados en el presente documento puede ser una sal farmacéuticamente aceptable derivada de ácidos que incluyen los siguientes: ácido acético, algínico, antranílico, benenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múxico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico o *p*-toluenosulfónico. En algunos casos, el agente activo puede ser una sal de ácido metanosulfónico.

20

25

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender además o se puede administrar conjuntamente con uno o más fármacos antibacterianos/antimicrobianos, por ejemplo

amikacina, azitromicina, cefixima, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, colistina, domeclociclina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, mafenida, metaciclina, minociclina, neomicina, norfloxacin, ofloxacin, oxitetraciclina, polimixina B, pirimetamina, sulfacetamida, sulfisoxazol, tetraciclina, tobramicina, trimetoprima o cualquier combinación de los mismos.

5

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender o administrarse conjuntamente con fármaco(s) antibacteriano(s) de oxazolidinona, y/o uno o más fármacos seleccionados de acebutolol, aceclidina, ácido acetilsalicílico, N4-acetilsulfisoxazol, alclofenaco, alprenolol, amfenac, amilorida, ácido aminocaproico, aminoclonidina, aminozolamida, anisindiona, apafant, atenolol, bacitracina, benoxaprofeno, benoxinato, benzofenaco, bepafant, betametasona, betaxolol, betanecol, brimonidina, bromfenaco, bromhexina, ácido buclórico, bupivacaína, butibufeno, carbachol, carprofeno, celecoxib, cefalexina, cloranfenicol, clordiazepóxido, clorprocaína, clorpropamida, clortetraciclina, cicloprofeno, cinmetacina, ciprofloxacina, clidanac, clindamicina, clonidina, clonixina, clopirac, cocaína, cromolín, ciclopietolato, ciproheptadina, demecario, dexametasona, dibucaína, diclofenaco, diflusinal, dipivefrina, dorzolamida, enoxacina, epinefrina, eritromicina, eserina, estradiol, ácido etacrínico, etidocaína, etodolaco, fenbufeno, fenclofenaco, fenclorac, fenoprofeno, fentiazac, ácido flufenámico, flufenisal, flunoxaprofeno, fluorocinolona, fluorometolona, flurbiprofeno y sus ésteres, propionato de fluticasona, furaprofeno, furobufeno, furofenaco, furosemida, ganciclovir, gentamicina, gramicidina, hexilcaína, homatropina, hidrocortisona, ibufenaco, ibuprofeno y sus ésteres, idoxuridina, indometacina, indoprofeno, interferones, isobutilmetilxantina, isofluorofato, isoproteraprenol, isoxepac, ketoprofeno, ketorolaco, labetalol, lactoralac, latanoprost, levobunolol, lidocaína, lonazolac, loteprednol, meclofenamato, medrisona, ácido mefenámico, mepivacaína, metaproterenol, metanamina, metilprednisolona, metiazínico, metoprolol, metronidazol, minopafant, miroprofeno, MK-663, modipafant, nabumetona, nadolol, namoxirato, nafazolina, naproxeno y sus ésteres, neomicina, nepafenac, nitroglicerina, norepinefrina, norfloxacin, nupafant, olfloxacin, olopatadina, oxaprozina, oxepinaco, oxifenbutazona, oxiprenolol, oxitetraciclina, parecoxib, penicilinas, perfloxacin, fenacetina, fenazopiridina, feniramina, fenilbutazona, fenilefrina, fenilpropanolamina, fosfolina, pilocarpina, pindolol, pirazolac, piroxicam, piroprofeno, polimixina, polimixina B, prednisolona, prilocaína, probenecid, procaína, proparacaína, ácido protizínico, rimexolona, rofecoxib, salbutamol, escopolamina, sotalol, sulfacetamida, ácido sulfanílico, sulindac, suprofeno, tenoxicam, terbutalina, tetracaína, tetraciclina, teofilamina, timolol, tobramicina, tolmetina, triamcinolona, trimetoprima, trospectomicina, valdecoxib, vancomicina, vidarabina, vitamina A, warfarina, zomepirac y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10

15

20

25

30

35

Formulaciones

En algunos casos, la presente descripción proporciona una composición antibiótica, en donde la composición antibiótica comprende: un agente que contiene plata; y un agente de organoselenio. En algunos casos, el agente que contiene plata puede comprender un ion de plata. En algunos casos, el agente que contiene plata puede comprender nitrato de plata. En algunos casos, el agente que contiene plata puede comprender dihidrogenocitrato de plata. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un compuesto de selenazol. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un compuesto de benzoiselenazol-3(2H)-ona. En algunos casos, el agente de organoselenio puede comprender un ebselen. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una forma farmacéutica de solución o suspensión. En algunos casos, la concentración del agente que contiene plata en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 0.5 a 50 μM , aproximadamente de 1 a 25 μM o aproximadamente de 1 a 10 μM . En algunos casos, la concentración del agente que contiene plata en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 5 μM . En algunos casos, la concentración del agente de organoselenio en la composición antibiótica puede ser aproximadamente de 4 a 25 μM , aproximadamente de 30 a 200 μM , aproximadamente de 30 a 150 μM o aproximadamente de 30 a 100 μM . En algunos casos, la concentración del agente de organoselenio en la composición antibiótica puede ser de aproximadamente 40 μM o aproximadamente 80 μM . En algunos casos, el agente que contiene plata y el agente de organoselenio pueden tener una relación molar de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:20. En algunos casos, la relación molar del agente que contiene plata al agente de organoselenio puede ser de aproximadamente 1:4, 1:8 o 1:16. En algunos casos, la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de aproximadamente 10-100 nM para una o más bacterias Gram positivas. En algunos casos, la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de aproximadamente 50 nM o inferior para una o más bacterias Gram negativas o bacterias Gram positivas. En algunos casos, la una o más bacterias Gram negativas pueden comprender *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 y ebselen. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede estar en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 4 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 20 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 40 μM en una forma farmacéutica líquida. En algunos casos, la composición antibiótica puede comprender AgNO_3 5 μM y ebselen 80 μM en una forma

65

farmacéutica líquida.

En algunos casos, la presente descripción proporciona una formulación farmacéutica que puede comprender la composición antibiótica descrita en el presente documento. En algunos casos, la formulación farmacéutica puede comprender además un excipiente descrito en el presente documento.

En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición antibiótica, que comprende mezclar un agente que contiene plata y un agente de organoselenio. En algunos casos, la mezcla se puede llevar a cabo en un líquido descrito en el presente documento, por ejemplo, una suspensión, un coloide o una solución. En algunos casos, el líquido comprende uno o más agentes activos o excipientes descritos en el presente documento. En algunos casos, la mezcla puede comprender añadir el agente que contiene plata a un líquido que puede comprender el agente de organoselenio. En algunos casos, la mezcla puede comprender añadir el agente de organoselenio a un líquido que puede comprender el agente que contiene plata.

En algunos casos, un agente activo descrito en el presente documento puede estar presente en aproximadamente: 0.01-0.1, 0.1-1, 1-10, 1-20, 5-30, 5-40, 5-50, 10-20, 10-25, 10-30, 10-40, 10-50, 15-20, 15-25, 15-30, 15-40, 15-50, 20-30, 20-40, 20-50, 20-100, 30-40, 30-50, 30-60, 30-70, 30-80, 30-90, 30-100, 40-50, 40-60, 40-70, 40-80, 40-90, 40-100, 50-60, 50-70, 50-80, 50-90, 50-100, 50-150, 50-200, 50-300, 100-300, 100-400, 100-500, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 µM, o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, un agente activo descrito en el presente documento puede estar presente en aproximadamente: 1 mg -2.5 mg, 2.5-25 mg, 2.5-30 mg, 5-20 mg, 5-15 mg, 5-10 mg, 10-15 mg, 10-20 mg, 10-25 mg, 11.5-13 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg, 10 mg, 10.5 mg, 11 mg, 11.5 mg, 12 mg, 12.5 mg, 13 mg, 13.5 mg, 14 mg, 14.5 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg o 20 mg. En algunos casos, un agente activo descrito en el presente documento puede estar presente en aproximadamente: 5-50 mg, 5-40 mg, 5-30 mg, 10-25 mg, 15-20 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 24 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg o 50 mg, o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, dos agentes activos están presentes en una relación molar o en peso por peso de aproximadamente: 1:10 a 1:30, 1:20 a 1:30, 1:10 a 1:20, 1:1 a 1:15, o 1:1 a 1:0, 1:1 a 1:5, 1:1 a 1:4, 1:1 a 1:3, o 1:1 a 1:2. En algunos casos, dos agentes activos están presentes en una relación molar o en peso por peso de aproximadamente: 1:30, 1:29, 1:28, 1:27, 1:26, 1:25, 1:24, 1:23, 1:22, 1:21, 1:20, 1:19, 1:18, 1:17, 1:16, 1:15, 1:14, 1:13, 1:12, 1:11, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 o 1:1.

En algunos casos, una composición antibiótica puede comprender múltiples agentes activos administrados en al menos aproximadamente 0.001 mg, por ejemplo, al menos aproximadamente 0.01 mg, 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg, 0.4 mg, 0.5 mg, 0.6 mg, 0.7 mg, 0.8 mg, 0.9 mg, 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg o 10 mg, por kg de peso corporal de un sujeto que lo necesite. La composición en polvo puede comprender una dosis total de un agente activo administrado en aproximadamente de 0.1 a aproximadamente 10.0 mg, por ejemplo, aproximadamente 0.1-10.0 mg, aproximadamente 0.1-9.0 mg, aproximadamente 0.1-8.0 mg, aproximadamente 0.1-7.0 mg, aproximadamente 0.1-6.0 mg, aproximadamente 0.1-5.0 mg, aproximadamente 0.1-4.0 mg, aproximadamente 0.1-3.0 mg, aproximadamente 0.1-2.0 mg, aproximadamente 0.1-1.0 mg, aproximadamente 0.1-0.5 mg, aproximadamente 0.2-10.0 mg, aproximadamente 0.2-9.0 mg, aproximadamente 0.2-8.0 mg, aproximadamente 0.2-7.0 mg, aproximadamente 0.2-6.0 mg, aproximadamente 0.2-5.0 mg, aproximadamente 0.2-4.0 mg, aproximadamente 0.2-3.0 mg, aproximadamente 0.2-2.0 mg, aproximadamente 0.2-1.0 mg, aproximadamente 0.2-0.5 mg, aproximadamente 0.5-10.0 mg, aproximadamente 0.5-9.0 mg, aproximadamente 0.5-8.0 mg, aproximadamente 0.5-7.0 mg, aproximadamente 0.5-6.0 mg, aproximadamente 0.5-5.0 mg, aproximadamente 0.5-4.0 mg, aproximadamente 0.5-3.0 mg, aproximadamente 0.5-2.0 mg, aproximadamente 1.0-4.0 mg, aproximadamente 1.0-3.0 mg, aproximadamente 1.0-2.0 mg, aproximadamente 2.0-10.0 mg, aproximadamente 2.0-9.0 mg, aproximadamente 2.0-8.0 mg, aproximadamente 2.0-7.0 mg, aproximadamente 2.0-6.0 mg, aproximadamente 2.0-5.0 mg, aproximadamente 2.0-4.0 mg, aproximadamente 2.0-3.0 mg, aproximadamente 5.0-10.0 mg, aproximadamente 5.0-9.0 mg, aproximadamente 5.0-8.0 mg, aproximadamente 5.0-7.0 mg, aproximadamente 5.0-6.0 mg, aproximadamente 6.0-10.0 mg, aproximadamente 6.0-9.0 mg, aproximadamente 6.0-8.0 mg, aproximadamente 6.0-7.0 mg, aproximadamente 7.0-10.0 mg, aproximadamente 7.0-9.0 mg, aproximadamente 7.0-8.0 mg, aproximadamente 8.0-10.0 mg, aproximadamente 8.0-9.0 mg, o aproximadamente 9.0-10.0 mg, por kg de peso corporal de un sujeto que lo necesite.

En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede comprender dos o más agentes activos (p. ej., un compuesto metálico, ebselen o un derivado del mismo), cada uno de los cuales puede estar presente de forma independiente en una dosis de aproximadamente: 1-10 mg, 2.5-30 mg, 2.5-20 mg, 1-20 mg, 1-30 mg, 5-30 mg, 10-40 mg, 20-50 mg, 30-60 mg, 40-70 mg, 50-80 mg, 60-90 mg o 1-100 mg, incluyendo aproximadamente: 1.0 mg, 1.5 mg, 2.5 mg, 3.0 mg, 4.0 mg, 5.0 mg, 6.0 mg, 6.5 mg, 7.0 mg, 7.5 mg, 8.0 mg, 8.5mg, 9.0 mg, 9.5 mg, 10.0, 10.5 mg, 11.0 mg, 12.0 mg, 12.5 mg, 13.0 mg, 13.5mg, 14.0 mg, 14.5 mg, 15.0

mg, 15.5 mg, 16 mg, 16.5 mg, 17 mg, 17.5 mg, 18 mg, 18.5 mg, 19 mg, 19.5 mg, 20 mg, 20.5 mg, 21 mg, 21.5 mg, 22 mg, 22.5 mg, 23 mg, 23.5 mg, 24 mg, 24.5 mg, 25 mg, 25.5 mg, 26 mg, 26.5 mg, 27 mg, 27.5 mg, 28 mg, 28.5 mg, 29 mg, 29.5 mg, 30 mg, 30.5 mg, 31 mg, 31.5 mg, 32 mg, 32.5 mg, 33 mg, 33.5 mg, 36 mg, 36.5 mg, 37 mg, 37.5 mg, 38 mg, 38.5 mg, 39 mg, 39.5 mg, 40 mg, 40.5 mg, 41 mg, 41.5 mg, 42 mg, 42.5 mg, 43 mg, 43.5 mg, 44 mg, 44.5 mg, 45 mg, 45.5 mg, 46 mg, 46.5 mg, 47 mg, 47.5 mg, 48 mg, 48.5 mg, 49 mg, 49.5 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg o 100 mg.

Excipientes

10 En algunos casos, la composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender además uno o más excipientes, p. ej., diferente sustancia o la misma sustancia, pero de diferentes tamaños. En algunos casos, el excipiente puede comprender un vehículo, p. ej., un polisacárido u oligosacárido insoluble en agua. En algunos casos, el vehículo se puede seleccionar de un grupo que consiste en acetato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato propionato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, quitosano, β-ciclodextrina, etilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), celulosa microcristalina, almidón, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el excipiente puede comprender un agente espesante, p. ej., un polisacárido soluble en agua. En algunos casos, el agente espesante se puede seleccionar del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), goma arábiga, ácido algínico, dióxido de silicón coloidal, carboximetilcelulosa cálcica, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (hipromelosa), metilcelulosa, sacarosa, alginato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el excipiente puede comprender un primer excipiente (cualquier excipiente descrito en el presente documento) y un segundo excipiente (cualquier excipiente descrito en el presente documento). En algunos casos, el excipiente puede comprender un vehículo (p.ej., celulosa microcristalina) y un agente espesante (p. ej., HPMC).

25 En algunos casos, la composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticos, por ejemplo, ácido ascórbico, EDTA dihidrato, glicerina, ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio dihidrato, benzoato de sodio, propionato de sodio, solución de sorbitol al 70%, sucralosa, FD&C amarillo n.º 6, sabor a naranja artificial, sabor a menta artificial, agua purificada o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el uno o más excipientes farmacéuticos comprenden ácido ascórbico, EDTA dihidrato, glicerina, ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio dihidrato, propilparabeno, metilparabeno, propilenglicol, solución de sorbitol al 70%, sucralosa, FD&C amarillo n.º 6, sabor a naranja artificial, sabor a menta artificial, agua purificada o cualquier combinación de los mismos.

30 Los conservantes adecuados incluyen, de manera no restrictiva, sustancias que contienen mercurio tales como sales fenilmercuríicas (p. ej., acetato, borato y nitrato fenilmercuríico) y timerosal; dióxido de cloro estabilizado; compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio; imidazolidinilurea; parabenos tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno, y sales de los mismos; fenoxietanol; clorofenoxietanol; fenoxipropanol; clorobutanol; clorocresol; alcohol feniletílico; EDTA disódico; y ácido sórbico y sales de los mismos.

40 Se pueden incluir uno o más agentes de ajuste de pH y/o agentes de tamponamiento aceptables en una composición descrita en el presente documento, que incluyen ácidos tales como ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases tales como hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio y tris-hidroximetilaminometano; y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio y cloruro de amonio. Dichos ácidos, bases y tampones se incluyen en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo farmacéuticamente aceptable.

45 En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender un agente de ajuste del pH. En algunos casos, el agente de ajuste del pH se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido ascórbico, ascorbato de sodio, ácido tartárico, tartrato de sodio, tartrato de potasio, tartrato de calcio, tartrato de litio, ácido cítrico, citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de calcio, citrato de litio, ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de sodio, monohidrogenofosfato de sodio, fosfato de litio, fosfato de potasio, fosfato de calcio, carbonato de sodio, hidrogenocarbonato de sodio, ácido láctico, lactato de sodio, lactato de potasio, lactato de calcio, ácido acético, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de calcio, ácido propiónico, ácido sulfúrico, sulfato de sodio, sulfato de potasio, ácido bórico, borato de sodio, ácido maleico, maleato de litio, maleato de sodio, maleato de potasio, maleato de calcio, ácido succínico, succinato de litio, succinato de sodio, succinato de potasio, succinato de calcio, ácido fumárico, ácido glutámico, ácido fórmico, ácido málico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina, diisopropanolamina, solución de amoniaco, monoetanolamina, dietanolamina, trietanolamina meglumina, citrato de sodio, bicarbonato de sodio, bicarbonato de potasio y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, un agente de ajuste del pH descrito en el presente documento puede ser ácido acético; ácido adípico; sulfato de amonio y aluminio; bicarbonato de amonio; carbonato de amonio; citrato de amonio, dibásico; citrato de amonio, monobásico; hidróxido de amonio; fosfato de amonio, dibásico; fosfato de amonio, monobásico; acetato de calcio; pirofosfato ácido de calcio; carbonato de calcio; cloruro de calcio; citrato de calcio; fumarato de calcio; gluconato de calcio; hidróxido de calcio; lactato de calcio; óxido de calcio; fosfato de

calcio, dibásico; fosfato de calcio, monobásico; fosfato de calcio, tribásico; sulfato de calcio; dióxido de carbono; ácido cítrico; cremor tártaro; ácido fumárico; ácido glucónico; glucono-delta-lactona; ácido clorhídrico; ácido láctico; carbonato de magnesio; citrato de magnesio; fumarato de magnesio; hidróxido de magnesio; óxido de magnesio; fosfato de magnesio; sulfato de magnesio; ácido málico; sulfato de manganeso; ácido metatartárico; ácido fosfórico; tartrato ácido de potasio; sulfato de potasio y aluminio; bicarbonato de potasio; carbonato de potasio; cloruro de potasio; citrato de potasio; fumarato de potasio; hidróxido de potasio; lactato de potasio; fosfato de potasio, dibásico; fosfato de potasio, tribásico; sulfato de potasio; tartrato de potasio; tripolifosfato de potasio; acetato sódico; pirofosfato ácido de sodio; tartrato ácido de sodio; fosfato de sodio y aluminio; sulfato de sodio y aluminio; bicarbonato de sodio; bisulfato de sodio; carbonato de sodio; citrato de sodio; fumarato de sodio; gluconato de sodio; hexametáfosfato de sodio; hidróxido de sodio; lactato de sodio; fosfato de sodio, dibásico; fosfato de sodio, monobásico; fosfato de sodio, tribásico; hexametáfosfato de sodio y potasio; tartrato de sodio y potasio; tripolifosfato de sodio y potasio; pirofosfato de sodio, tetrabásico; tripolifosfato de sodio; ácido sulfúrico; ácido sulfuroso; ácido tartárico; o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede comprender un alcohol de azúcar. En algunos casos, el alcohol de azúcar se puede seleccionar del grupo que consiste en manitol, glicerol, galactitol, fucitol, inositol, volemitol, maltotriitol, maltoetetrailol, poliglicitol, eritritol, treitol, ribitol, arabitol, xilitol, alitol, dulcitol, glucitol, sorbitol, altritol, iditol, maltitol, lactitol, isomalt y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el alcohol de azúcar tiene 3, 4, 5, 6, 7, 12, 18 o 24 carbonos.

En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede comprender aditivos adecuados, incluidos diluyentes, aglutinantes, tensioactivos, lubricantes, deslizantes, materiales de recubrimiento, plastificantes, colorantes, aromatizantes o materiales farmacéuticamente inertes. Los ejemplos de diluyentes incluyen, por ejemplo, celulosa; derivados de celulosa tales como celulosa microcristalina y similares; almidón; derivados de almidón tales como almidón de maíz, ciclodextrina y similares; azúcar; alcohol de azúcar tal como lactosa, D-manitol y similares; diluyentes inorgánicos tales como gel de hidróxido de aluminio seco, carbonato de calcio precipitado, aluminometasilicato de magnesio, fosfato dibásico de calcio y similares. Los ejemplos de aglutinantes incluyen, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa (hidroxipropilmetilcelulosa), povidona, dextrina, pululano, hidroxipropilalmidón, poli(alcohol vinílico), goma arábiga, agar, gelatina, tragacanto, macrogol y similares. Los ejemplos de tensioactivos incluyen, por ejemplo, ésteres de sacarosa de ácidos grasos, estearato de polioxilo, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno, polioxipropilenglicol polioxietileno, sesquioleato de sorbitán, trioleato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, polisorbato, monoestearato de glicerilo, laurilsulfato de sodio, lauromacrogol, sales de amonio cuaternario (p. ej., cloruro de bencildimetiltetradecilamonio hidrato, cloruro de bencetonio, cloruro de bencilcetildimetilamonio hidrato, cloruro de bencildimetilestearilamonio hidrato, cloruro de bencildodecildimetilamonio dihidrato, bromuro de bencildodecildimetilamonio) y similares. Los ejemplos de lubricantes incluyen, por ejemplo, ácido esteárico, estearato de calcio, estearato de magnesio, talco y similares. Los ejemplos de deslizantes incluyen, por ejemplo, gel de hidróxido de aluminio seco, silicato de magnesio y similares. Los ejemplos de materiales de recubrimiento incluyen, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa 2910, copolímero E de metacrilato de aminoalquilo, dietilaminoacetato de polivinilacetato, macrogol 6000, óxido de titanio y similares. Los ejemplos de plastificantes incluyen, por ejemplo, citrato de trietilo, triacetina, macrogol 6000 y similares.

Formas farmacéuticas

En algunos casos, los agentes activos descritos en el presente documento se formulan como una forma farmacéutica de comprimido, cápsula, gel, piruleta, infusión parenteral, intraespinal, inhalación, aerosol, parche transdérmico, transporte por iontoforesis, gel absorbente, líquido, tanato líquido, supositorios, inyección, goteo intravenoso o una combinación de los mismos para tratar sujetos. En algunos casos, los agentes se formulan como una forma farmacéutica oral única, tal como comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas de liberación prolongada, comprimidos de tanato, comprimidos de disgregación oral, comprimidos multicapa, comprimidos efervescentes, perlas, líquido, suspensión oral, pastilla masticable, solución oral, pastilla, piruleta, jarabe oral, polvo envasado estéril que incluye excipientes farmacéuticamente aceptables, otras formas farmacéuticas orales o una combinación de los mismos. En algunos casos, una composición de la descripción del presente documento se puede administrar utilizando una o más formas farmacéuticas diferentes que se describen más adelante en el presente documento. Por ejemplo, una composición que comprende múltiples agentes activos puede administrarse en forma sólida, semisólida, microemulsión, gel, parche o líquida. Se describen adicionalmente en el presente documento dichas formas farmacéuticas. En algunos casos, la descripción del presente documento se refiere a métodos y composiciones formuladas para la administración oral a un sujeto que lo necesite. En algunos casos, se puede formular una composición para así administrar uno o más agentes farmacéuticamente activos a un sujeto a través de una capa mucosa en la boca o el esófago. En algunos casos, la composición se puede formular para administrar uno o más agentes farmacéuticamente activos a un sujeto a través de una capa mucosa en el estómago y/o intestinos.

En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se proporcionan en formas

farmacéuticas de liberación modificada (tal como liberación inmediata, liberación controlada o ambas), que comprenden una cantidad eficaz de un agente activo; y uno o más excipientes que controlan la liberación como se describe en el presente documento. Los vehículos de dosificación de liberación modificada adecuados incluyen dispositivos de matriz hidrofílicos o hidrofóbicos, recubrimientos de capas de separación solubles en agua, recubrimientos entéricos, dispositivos osmóticos, dispositivos multipartículas y combinaciones de los mismos. En algunos casos, las composiciones comprenden excipientes que no controlan la liberación. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se proporcionan en formas farmacéuticas con recubrimiento entérico. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento comprenden excipientes que no controlan la liberación. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se proporcionan en formas farmacéuticas efervescentes. En algunos casos, las composiciones comprenden excipientes que no controlan la liberación.

En algunos casos, una composición descrita en el presente documento se puede proporcionar en una forma farmacéutica que tiene al menos un componente que facilita la liberación inmediata de un agente activo y al menos un componente que puede facilitar la liberación controlada de un agente activo. En algunos casos, la forma farmacéutica puede ser capaz de dar una liberación discontinua del compuesto en forma de al menos dos pulsos consecutivos separados en el tiempo desde 0.1 hasta 24 horas. Las composiciones pueden comprender uno o más excipientes que controlan la liberación y que no controlan la liberación, tales como los excipientes adecuados para una membrana semipermeable rompible y como sustancias hinchables. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento se puede proporcionar en una forma farmacéutica para la administración oral a un sujeto, que comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, encerrados en una capa reactiva intermedia que comprende un material polimérico en capas resistente al jugo gástrico parcialmente neutralizado con álcali y que tiene capacidad de intercambio catiónico y una capa exterior resistente al jugo gástrico. En algunos casos, las composiciones comprenden además celulosa, hidrogenofosfato disódico, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, lactosa, manitol o laurilsulfato de sodio. En algunos casos, las composiciones comprenden además monoestearato de glicerilo 40-50, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, estearato de magnesio, copolímero de ácido metacrílico tipo C, polisorbato 80, esferas de azúcar, talco o citrato de trietilo. En algunos casos, las composiciones comprenden además cera de carnauba, crospovidona, monoglicéridos diacetilados, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hipromelosa, estearato de magnesio, manitol, hidróxido de sodio, estearilfumarato de sodio, talco, dióxido de titanio u óxido férrico amarillo. En algunos casos, las composiciones comprenden además estearato de calcio, crospovidona, hidroxipropilmetilcelulosa, óxido de hierro, manitol, copolímero de ácido metacrílico, polisorbato 80, povidona, propilenglicol, carbonato de sodio, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio y citrato de trietilo.

En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento están en formas farmacéuticas unitarias o formas farmacéuticas múltiples. Las formas farmacéuticas unitarias, tal como se usan en el presente documento, se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas para la administración a sujetos humanos o animales no humanos y envasadas individualmente. Cada dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de ingrediente(s) activo(s) suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con los vehículos o excipientes farmacéuticos requeridos. Los ejemplos de formas farmacéuticas unitarias incluyen ampollas, jeringas y comprimidos o cápsulas envasados individualmente. En algunos casos, las formas farmacéuticas unitarias se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma farmacéutica múltiple puede ser una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias idénticas envasadas en un único recipiente, que se administra en forma de dosis unitarias segregadas. Los ejemplos de formas farmacéuticas múltiples incluyen viales, frascos de comprimidos o cápsulas. En algunos casos, las formas farmacéuticas múltiples comprenden diferentes agentes farmacéuticamente activos.

En algunos casos, se puede proporcionar un kit que comprende una composición antibiótica descrita en el presente documento. En algunos casos, el kit puede comprender además un conjunto de instrucciones.

En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular en formas farmacéuticas para administración oral, parenteral o tópica. En algunos casos, las composiciones se pueden formular como una forma farmacéutica de liberación modificada, que incluye liberación inmediata, retardada, extendida, prolongada, sostenida, pulsátil, controlada, extendida, acelerada y rápida, dirigida, programada y formas farmacéuticas de retención gástrica. En algunos casos, las composiciones pueden estar en una o más formas farmacéuticas. Por ejemplo, una composición se puede administrar en forma sólida o líquida. Los ejemplos de formas farmacéuticas sólidas incluyen unidades discretas en cápsulas o comprimidos, como un polvo o gránulos, o presentes en un comprimido formado convencionalmente por moldeo por compresión. En algunos casos, dichos comprimidos por compresión se preparan comprimiendo en una máquina adecuada los tres o más agentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los comprimidos moldeados se pueden recubrir o ranurar opcionalmente, teniendo marcas inscritas en ellos y se pueden formular de manera que produzcan una liberación inmediata, sustancialmente inmediata, lenta, controlada o prolongada de los agentes activos descritos en el presente documento. En algunos casos, las formas farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden sales o vehículos aceptables conocidos en la técnica, tales como los descritos en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986). En

- algunos casos, uno o más agentes farmacéuticamente activos se mezclan con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que comprende una mezcla homogénea de los compuestos descritos en el presente documento. Cuando se hace referencia a composiciones descritas en el presente documento como "homogéneas", se puede entender que los agentes están dispersos uniformemente por toda la composición de modo que la composición se puede subdividir en formas farmacéuticas unitarias tales como comprimidos o cápsulas. En algunos casos, esta composición de preformulación sólida se puede subdividir en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que comprenden, por ejemplo, de aproximadamente 1.0 mg a aproximadamente 15 mg de un agente activo descrito en el presente documento.
- En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se formulan, en el caso de cápsulas o comprimidos, para tragarlas enteras, por ejemplo, con agua. Se cree que la inclusión del agente que reduce los efectos secundarios tal como un antihistamínico o antiemético para reducir los síntomas comunes de náuseas y vómitos es beneficiosa porque la prometazina o una sal de la misma, o similar, eliminará o minimizará la cantidad de malestar. Los efectos adversos reducidos o eliminados incluyen náuseas, vómitos, otros trastornos gástricos, estreñimiento, erupciones cutáneas, reacciones alérgicas tales como hinchazón, dificultad para respirar, cierre de la garganta, dolor abdominal, sangrado o hematomas inusuales, supresión del SNC y supresión respiratoria.
- En algunos casos, una forma farmacéutica descrita en el presente documento se puede fabricar usando procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para la fabricación de comprimidos (incluidos comprimidos de una sola capa, bicapa, recubiertos o multicapa) o cápsulas, los agentes se pueden dispersar uniformemente en uno o más excipientes, por ejemplo, utilizando granulación de alto cizallamiento, granulación de bajo cizallamiento, granulación en lecho fluido o mezclando para compresión directa. Los excipientes incluyen diluyentes, aglutinantes, disgregantes, dispersantes, lubricantes, deslizantes, estabilizantes, tensioactivos y colorantes. Los diluyentes, también denominados "cargas", se utilizan para aumentar el volumen de un comprimido de modo que se pueda proporcionar un tamaño práctico para la compresión. Los ejemplos no limitantes de diluyentes incluyen lactosa, celulosa, celulosa microcristalina, manitol, almidón seco, almidones hidrolizados, azúcar en polvo, talco, cloruro de sodio, dióxido de silicio, óxido de titanio, fosfato dicálcico dihidratado, sulfato de calcio, carbonato de calcio, alúmina y caolín. En algunos casos, los aglutinantes imparten cualidades cohesivas a la formulación de un comprimido, o a una formulación de partículas en una cápsula, y se usan para ayudar a que el comprimido permanezca intacto después de la compresión. Los ejemplos no limitantes de aglutinantes adecuados incluyen almidón (incluyendo almidón de maíz y almidón pregelatinizado), gelatina, azúcares (p. ej., glucosa, dextrosa, sacarosa, lactosa y sorbitol), celulosas, polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas, p. ej., goma arábiga, tragacanto, alginato de sodio y polímeros sintéticos tales como polimetacrilatos y polivinilpirrolidona. En algunos casos, los lubricantes facilitan la fabricación de comprimidos; los ejemplos no limitantes de los mismos incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y polietilenglicol. En algunos casos, los disgregantes facilitan la disgregación del comprimido después de la administración, y los ejemplos no limitantes de los mismos incluyen almidones, ácido algínico, polímeros reticulados tales como, p. ej., polivinilpirrolidona reticulada, croscarmelosa sódica, glicolato potásico o sódico de almidón, arcillas, celulosas, almidones, gomas y similares. Los ejemplos no limitantes de deslizantes adecuados incluyen dióxido de silicio, talco y similares. En algunos casos, los estabilizantes inhiben o retardan las reacciones de descomposición del fármaco, incluidas las reacciones oxidativas. En algunos casos, un tensioactivo puede ser aniónico, catiónico, anfótero o no iónico. En algunos casos, los comprimidos (o partículas) comprenden sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes de tamponamiento del pH, conservantes, p. ej., antioxidantes, agentes humectantes o emulsionantes, agentes solubilizantes, agentes de recubrimiento, agentes aromatizantes y similares. En algunos casos, los ejemplos de excipientes incluyen éteres de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa (p. ej., Methocel K4M) o celulosa microcristalina silicificada; excipientes a base de poli(acetato de vinilo) tales como, p. ej., Kollidon SR, y polímeros y copolímeros a base de metacrilatos y ácido metacrílico tales como, p. ej., Eudragit NE 30D; celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica, glicolato sódico de almidón, almidón de maíz, sílice coloidal, laurilsulfato sódico, estearato de magnesio, Prosolve SMCC (HD90), croscarmelosa sódica, crospovidona NF, Avicel PH200 o una combinación de los mismos. En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento comprenden una o más combinaciones de excipientes que ralentizan la liberación de los agentes mediante el recubrimiento o la unión temporal o la disminución de la solubilidad de los agentes activos. Ejemplos de estos excipientes incluyen éteres de celulosa tales como hidroxipropilmetilcelulosa (p. ej., Methocel K4M) o celulosa microcristalina silicificada, excipientes a base de poli(acetato de vinilo) tal como, p. ej., Kollidon SR, y polímeros y copolímeros a base de metacrilatos y ácido metacrílico tales como, p. ej., Eudragit NE 30D.
- En algunos casos, las composiciones comprenden uno o más vehículos que protegen a los agentes contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación prolongada. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, incluidos, por ejemplo, sistemas de administración microencapsulados. En algunos casos, los agentes activos se incluyen en el vehículo farmacéuticamente aceptable en cantidades suficientes para tratar el dolor de un sujeto, con efectos adversos reducidos. En algunos casos, las composiciones están en forma farmacéutica oral y comprenden una matriz que incluye, por ejemplo, un agente activo formulado para liberación controlada. En algunos casos, la matriz se puede

comprimir en un comprimido y se puede recubrir opcionalmente con un recubrimiento que controla la liberación del agente activo de la composición. En algunos casos, los niveles de analgésicos en sangre se mantienen dentro de un intervalo terapéutico durante un periodo de tiempo prolongado. En ciertos casos, la matriz se puede encapsular. Los comprimidos o cápsulas que contienen una composición descrita en el presente documento se pueden recubrir o formar compuestos de otra forma para proporcionar una forma farmacéutica que logre la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o cápsula contiene un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto en el duodeno o que se controle su liberación. En algunos casos, para la liberación prolongada controlada, la cápsula tiene orificios microperforados. En algunos casos, se puede preparar un recubrimiento que comprende un compuesto que reduce los efectos secundarios mezclando un compuesto como prometazina con polivinilpirrolidona (PVP) 29/32 o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y agua/alcohol isopropílico y acetato de trietilo. Dicho recubrimiento se puede aplicar como recubrimiento por pulverización sobre los núcleos de los comprimidos. En algunos casos, el recubrimiento se puede aplicar usando un procedimiento de recubrimiento por presión con una mezcla que consiste en 80% en peso de prometazina y 20% en peso de lactosa e hidroxipropilmetilcelulosa tipo 2910. Las técnicas de recubrimiento por presión son conocidas en la técnica y se describen en la patente de EE. UU. N° 6,372,254.

En algunos casos, una forma farmacéutica descrita en el presente documento puede ser una forma farmacéutica efervescente. Efervescente significa que la forma farmacéutica, cuando se mezcla con líquido, incluyendo agua y saliva, desarrolla un gas. Algunos agentes efervescentes (o parejas efervescentes) desprenden gas por medio de una reacción química que tiene lugar tras la exposición del agente de disgregación efervescente al agua y/o a la saliva en la boca. Esta reacción puede ser el resultado de la reacción de una fuente de ácido soluble y una fuente de monocarbonato o carbonato alcalino. La reacción de estos dos compuestos generales produce dióxido de carbono gaseoso al entrar en contacto con agua o saliva. Una pareja efervescente (o el ácido y la base individuales por separado) se puede recubrir con un recubrimiento entérico o protector de disolventes para evitar la reacción prematura. En algunos casos, dicha pareja se puede mezclar con partículas previamente liofilizadas (tal como uno o más agentes farmacéuticamente activos recubiertos con un recubrimiento entérico o protector de disolventes. En algunos casos, la fuente de ácido puede ser cualquiera que sea segura para el consumo humano e incluye ácidos alimentarios, antiácidos hidratos y ácidos tales como, por ejemplo: cítrico, tartárico, amálico, fumérico, adípico y succínicos. Las fuentes de carbonato incluyen carbonato sólido seco y sal de bicarbonato tal como, por ejemplo, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, bicarbonato de potasio y carbonato de potasio, carbonato de magnesio y similares. También se incluyen los reaccionantes que desprenden oxígeno u otros gases y que son seguros para el consumo humano. En algunos casos, se puede usar ácido cítrico y bicarbonato de sodio.

En algunos casos, una forma farmacéutica descrita en el presente documento puede estar en forma de caramelo (p. ej., matriz), tal como una piruleta o una pastilla. En algunos casos, uno o más agentes farmacéuticamente activos se dispersan dentro de una matriz de caramelo. En algunos casos, la matriz de caramelo puede comprender uno o más azúcares (tales como dextrosa o sacarosa). En algunos casos, la matriz de caramelo puede ser una matriz sin azúcar. La elección de una matriz de caramelo en particular puede estar sujeta a una amplia variación. En algunos casos, se utilizan edulcorantes convencionales tales como sacarosa, o se pueden emplear alcoholes de azúcar adecuados para uso con pacientes diabéticos, tales como sorbitol o manitol. En algunos casos, otros edulcorantes, tales como los aspartamos, se incorporan fácilmente a una composición de acuerdo con las composiciones descritas en el presente documento. La base de caramelo puede ser muy blanda y de disolución rápida, o puede ser dura y de disolución más lenta. Varias formas tendrán ventajas en diferentes situaciones. En algunos casos, una masa de caramelo que comprende al menos un agente farmacéuticamente activo se puede administrar por vía oral a un sujeto que lo necesite, de manera que el agente se liberará en la boca del sujeto a medida que se disuelva la masa de caramelo. El fármaco entra rápidamente en el torrente sanguíneo del sujeto y, lo que es más importante, la sangre de las venas que drena de la boca y las zonas faríngea y esofágica pasa a través de una parte sustancial del cuerpo (de manera que el fármaco puede ser absorbido) antes de que la sangre pase por el hígado (donde el fármaco puede ser inactivado). En algunos casos, un sujeto que lo necesite puede ser un adulto humano o un niño que padece tos y/o dolor. En algunos casos, una matriz de caramelo (p. ej., piruleta o pastilla) descrita en el presente documento puede comprender una composición que carece de estimulante. En algunos casos, la composición tiene un efecto sedante además de aliviar la tos y/o el dolor a un sujeto que lo necesite. En algunos casos, la matriz de caramelo (piruleta o pastilla) puede comprender una composición que puede comprender un estimulante. En algunos casos, la composición proporciona un efecto antisedante además de aliviar la tos y/o el dolor a un sujeto que lo necesite. En algunos casos, una masa de caramelo descrita en el presente documento puede comprender una o más capas que comprenden diferentes agentes farmacéuticamente activos y/o velocidades de disolución. En algunos casos, una masa de caramelo multicapa (tal como una piruleta) puede comprender una capa externa con una concentración de uno o más agentes farmacéuticamente activos que difiere de la de una o más capas internas. Tal sistema de administración de fármacos tiene una variedad de aplicaciones. A modo de ejemplo, puede ser deseable obtener rápidamente una dosis predeterminada de un primer agente farmacéuticamente activo en el torrente sanguíneo para obtener el efecto

deseado y luego usar una capa interna diferente para administrar uno o más agentes. Las opciones de matriz y la concentración del fármaco en la matriz son factores importantes con respecto a la velocidad de absorción del fármaco. En algunos casos, una matriz que se disuelve rápidamente libera el fármaco en la boca del paciente para que se absorba más rápidamente que una matriz que puede disolverse lentamente. En algunos casos, una matriz de caramelo que contiene uno o más agentes farmacéuticamente activos en una alta concentración libera más del uno o más agentes farmacéuticamente activos en un periodo de tiempo determinado que un caramelo que tiene una concentración baja.

En algunos casos, las formas farmacéuticas descritas en el presente documento tienen la forma de partículas farmacéuticas fabricadas por una variedad de métodos, que incluyen homogeneización a alta presión, molienda de bolas húmeda o seca, o precipitación de partículas pequeñas (p. ej., NanoSpray de nGimat). Otros métodos útiles para preparar una formulación en polvo adecuada son la preparación de una solución de principios activos y excipientes, seguida de precipitación, filtración y pulverización, o seguida de la eliminación del disolvente por liofilización, seguida de la pulverización del polvo al tamaño de partículas deseado. En algunos casos, las partículas farmacéuticas tienen un tamaño final de 3-1000 µm, tal como, como máximo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 µm. En algunos casos, las partículas farmacéuticas tienen un tamaño final de 10-500 µm. En algunos casos, las partículas farmacéuticas tienen un tamaño final de 50-600 µm. En algunos casos, las partículas farmacéuticas tienen un tamaño final de 100-800 µm. En algunos casos, estas formas farmacéuticas incluyen partículas de liberación inmediata en combinación con partículas de liberación controlada en una proporción suficiente útil para administrar las dosis deseadas de agentes activos.

Composiciones líquidas

En algunos aspectos, las composiciones líquidas descritas en el presente documento son estables en anaquel, por ejemplo, las composiciones líquidas no se separan en el almacenamiento (tanto flotando como sedimentándose) o no requieren agitación vigorosa (lo que afecta en gran medida a la consistencia de la dosificación). En algunos casos, uno o más agentes activos en las composiciones líquidas descritas en el presente documento se proporcionan en liberación modificada, p. ej., liberación controlada, liberación inmediata o mixta. En algunos casos, uno o más agentes activos en las composiciones líquidas descritas en el presente documento pueden comprender un descongestionante, antitusígeno, expectorante o analgésico en una matriz formulada para liberación modificada. Los ejemplos de expectorantes incluyen cloruro de amonio, N-acetilcisteína, ambroxol, guaifenesina (p. ej., glicerol, guayacolato), hidrato de terpina, guayacolato de glicerilo, yoduro de potasio, citrato de potasio, guaicol sulfonato de potasio, extracto de hoja de orégano 25-500 mg (que puede ser un extracto líquido), trébol rojo 25-500 mg, raíz de espino 25-500 mg, fenogreco 25-500 mg, o cualquier mezcla de los mismos. Los ejemplos de vehículos para los principios activos incluyen cualquier polímero degradable, parcialmente degradable o no degradable y generalmente biocompatible, p. ej., polistirex, polipropileno, polietileno, poliacrilix, poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) y/o poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico) (PGLA), p. ej., en forma de líquido, matriz o perla.

En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento tiene una viscosidad (viscosidad del husillo) de aproximadamente 150 a aproximadamente 1000 centipoises a 50 RPM, por ejemplo, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 centipoises a 50 RPM o de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 centipoises a 50 RPM; o de aproximadamente 150 a aproximadamente 1200 centipoises medidos a 10 RPM. La viscosidad se puede medir por un método de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos), seleccionado de <911> Viscosidad-Métodos viscosímetros capilares, <912> Métodos de reómetro rotacional, y/o <913> Método del viscosímetro de bola rodante. En algunos casos, la cantidad de modificador de la viscosidad utilizada depende del "espesor" deseado de la composición y del tipo de modificador de la viscosidad utilizado. En algunos casos, se emplean combinaciones de modificadores de la viscosidad. Por ejemplo, en una realización de ejemplo con una viscosidad de aproximadamente 1500 a aproximadamente 4500 cps, se puede usar hasta aproximadamente 1.0 p/v de goma xantana con el uso de hasta aproximadamente 3.0 p/v de celulosa microcristalina como un modificador de la viscosidad. En algunos casos, el pH de una composición líquida descrita en el presente documento puede ser de aproximadamente: 2.5-5, 6-8, 5-9, 4-10, 7-8, 7-9, 7-10, 6-7, 5-7 o 4-7. En algunos casos, el pH de una composición líquida descrita en el presente documento puede ser de aproximadamente: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. En algunos casos, el pH puede ser de aproximadamente 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.8, 7.9, 7.10, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 6.8 a aproximadamente 7.4.

En un aspecto, una composición líquida descrita en el presente documento puede ser una suspensión que comprende perlas (p. ej., microperlas), en donde una parte de una o más perlas tiene un perfil de liberación inmediata y otra parte tiene un perfil de liberación controlada. En algunos casos, una o más perlas incluyen un recubrimiento entérico, un recubrimiento de resina, un recubrimiento de laca, un recubrimiento sensible al pH, una matriz de polímero biodegradable, una matriz soluble en agua, una matriz iónica o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, una o más perlas incluyen uno o más polímeros seleccionados de celulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, propilcelulosa, metoxipropilcelulosa, nitrato de celulosa, poli(alcohol vinílico), poli(cloruro de vinilo), poliestireno, polietileno, polipropileno, poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido

5 hidroxibutírico), poli(ácido hidroxivaleriánico-co-ácido hidroxibutírico), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico-co-ácido-glicólico), poli(.épsilon.-caprolactonas), poli(.epsilon.-caprolactona-co-ácido DL-láctico), poli(anhídrido maleico), poliamidas, gelatina, quitosano, colágeno, poli(hidroxialquil)-L-glutaminas, poli(.gamma.-L-glutamato de etilo-co-ácido glutámico), poli(L-leucina-co-ácido L-aspártico), poli(prolina-co-ácido glutámico), poli(2-cianoacrilatos de alquilo), poliuretanos, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico) y poli(metacrilato-co-metacrilato de hidroxipropilo), poliestireno, polistirex, polacrilex, sales de los mismos y cualquier combinación de los mismos.

10 En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento puede ser un jarabe, una suspensión lista para usar o un jarabe o suspensión líquida preparado extemporáneamente tal como, por ejemplo, polvo seco para reconstitución con agua, concentrado líquido para dilución, comprimido o cápsula dispersable. En el caso de jarabe o suspensión preparados extemporáneamente, la concentración de los ingredientes puede basarse en el producto reconstituido. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida puede ser para administración oral, inyección intravenosa, inyección intramuscular o para administración tópica (p. ej., como una crema, gel, pomada o vendaje). Una forma farmacéutica líquida administrada por vía oral puede ser beneficiosa para sujetos que tienen disfagia o dificultad para tragar. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida incluye uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, la composición farmacéutica líquida contiene uno o más agentes activos, p. ej., presentes en cantidades terapéuticamente eficaces en la forma farmacéutica. Estas cantidades difieren dependiendo del medicamento y las pautas posológicas prescritas. Por ejemplo, las preparaciones líquidas destinadas a bebés contienen altas concentraciones de fármaco para permitir dosis pequeñas y una frecuencia administración reducida. En algunos casos, una cantidad de fármaco en la composición puede ser de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 15 por ciento en peso, p. ej., de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 por ciento en peso de la composición total. En el caso de polvo seco para reconstituir con agua, el fármaco puede estar presente como partículas recubiertas o no recubiertas.

30 En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento puede comprender una base de excipiente líquido que enmascara el sabor para la administración de un medicamento de sabor desagradable. En algunos casos, dicha base de excipiente tiene viscosidades superiores a las normales, p. ej., debido a la presencia de polietilenglicol y/o carboximetilcelulosa de sodio. En algunos casos, la base de excipiente líquida de alta viscosidad proporciona beneficios de enmascaramiento del sabor en la medida en que se pueden preparar composiciones extra fuertes que contienen concentraciones aumentadas de composiciones farmacéuticas de sabor adverso. Por ejemplo, un agente activo normalmente administrado en dosis de no más de 100 miligramos en 5 mililitros de líquido puede administrarse en dosis de 200 miligramos en el mismo volumen de líquido sin que el paciente experimente un sabor indebidamente adverso.

40 En otro aspecto, un método descrito en el presente documento aumenta la vida en anaquel y la estabilidad de los agentes activos, p. ej., evitando la separación de los componentes tomando medidas para reducir o eliminar la formación de burbujas. En algunos casos, los pasos para minimizar, reducir y/o eliminar la formación de burbujas incluyen usar los siguientes pasos solos o en combinación: usar una bomba de diafragma para combinar, por ejemplo, el agua y el agente tixotrópico y uno o más conservantes, colorantes y saborizantes; colocar el tubo de recirculación por debajo de la superficie del líquido; añadir líquidos a lo largo del lateral de un recipiente que contiene el líquido; rociar perlas (p. ej., una o más perlas que incluyen uno o más agentes activos) sobre la superficie del líquido; mezclar la solución en ausencia de una o más paletas que raspen el recipiente; mezclar la solución con un mezclador de hélice; mezclar la solución con un mezclador de hélice a una velocidad que reduzca o minimice la cavitación y combinaciones de dos o más de estos pasos.

50 En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento puede utilizarse para tratar una enfermedad o afección descrita en el presente documento, p. ej., tos, alergia, resfriado o síntomas asociados. En algunos casos, un sujeto (p. ej., una persona) que padece un resfriado o síntomas similares al resfriado encuentra alivio al ingerir por vía oral una cantidad segura y eficaz de las composiciones líquidas como se ha descrito anteriormente. La cantidad segura y eficaz de composición líquida puede depender de la concentración de los componentes terapéuticos presentes en las composiciones líquidas. En algunos casos, la cantidad segura y eficaz de composición líquida puede estar en un intervalo de 1-30 ml, p. ej., 1-10 ml, por dosis de la composición líquida. En algunos casos, un niño puede consumir de forma segura una composición líquida descrita en el presente documento. En algunos casos, un sujeto (p. ej., una persona) puede estar tomando múltiples dosis (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis) de la composición líquida al día. En algunos casos, una composición líquida en el presente documento proporciona una cantidad eficaz de uno o más agentes activos durante 2-4 horas, 4-6 horas, 6-8 horas, 12 horas o 24 horas. En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento se puede administrar a un sujeto (p. ej., una persona) en forma líquida (p. ej., mediante un vaso dosificador o un depósito tal como una cuchara) o se puede encapsular en una cápsula de gelatina blanda que el individuo puede masticar o tragar. En algunos casos, la composición líquida se puede mezclar con composiciones tales como hielo, leche, soda, jugo o alguna otra composición comestible y administrar al individuo.

65 En algunos casos, una forma farmacéutica líquida descrita en el presente documento puede ser para

administración oral, inyección intravenosa, inyección intramuscular o administración tópica (p. ej., como crema o gel). Una forma farmacéutica líquida administrada por vía oral puede ser beneficiosa para sujetos que tienen disfagia o dificultad para tragar. Una dosis única de una forma farmacéutica líquida administrada por vía oral puede tener un volumen de 1 ml a aproximadamente 500 ml, o más. Por ejemplo, la dosis única de una forma farmacéutica líquida administrada por vía oral puede ser de aproximadamente 1-500 ml, 1-250 ml, 1-100 ml, 1-50 ml, 1-30 ml, 1-20 ml, 1-15 ml, 1-10 ml, 1-5 ml, 1-2.5 ml, 2.5-50 ml, 2.5-30 ml, 2.5-20 ml, 2.5-15 ml, 2.5-10 ml, 2.5-5 ml, 5-50 ml, 5-30 ml, 5-20 ml, 5-15 ml, 5-10 ml, 10-50 ml, 10-30 ml, 10-20 ml, 10-15 ml, 15-50 ml, 15-30 ml, 15-20 ml, 20-50 ml, 20-30 ml, 30-50 ml, 1 ml, 1.5 ml, 2 ml, 2.5 ml, 3 ml, 3.5 ml, 4 ml, 4.5 ml, 5 ml, 5.5 ml, 6 ml, 6.5 ml, 7 ml, 7.5 ml, 8 ml, 8.5 ml, 9 ml, 9.5 ml, 10 ml, 11 ml, 12 ml, 13 ml, 14 ml, 15 ml, 16 ml, 17 ml, 18 ml, 19 ml, 20 ml, 21 ml, 22 ml, 23 ml, 24 ml, 25 ml, 30 ml, 35 ml, 40 ml, 45 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 110 ml, 120 ml, 130 ml, 140 ml, 150 ml, 160 ml, 170 ml, 180 ml, 190 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml o 500 ml.

En algunos casos, los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento incluyen agente(s) modificador(es) del pH (p. ej., agente(s) de tamponamiento, agente(s) estabilizante(s), agente(s) espesante(s), agente(s) edulcorante(s), agente(s) aromatizante(s), agente(s) colorante(s), agente(s) conservante(s), agente(s) emulsionante(s), agente(s) solubilizante(s), agente(s) antioxidante(s), o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, un agente estabilizante descrito en el presente documento incluye cualquier componente de monohidroxifenol o componente de polihidroxifenol adecuado, o una combinación de los mismos. En algunos casos, dichos agentes estabilizantes también funcionan como agentes antioxidantes o agentes antimicrobianos. En algunos casos, un agente espesante o un agente potenciador de la viscosidad descrito en el presente documento mejora la sensación en la boca de la forma farmacéutica oral líquida y/o ayuda a recubrir el revestimiento del tracto gastrointestinal. Los ejemplos de agentes espesantes incluyen goma arábiga, ácido algínico bentonita, carbómero, carboximetilcelulosa cálcica o sódica, alcohol cetosteárico, metilcelulosa, etilcelulosa, glicerina, gelatina, goma guar, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa ("HPMC"), cualquier otro componente adecuado basado en celulosa, maltodextrina, poli(alcohol vinílico), povidona, carbonato de propileno, alginato de propilenglicol, alginato de sodio, glicolato sódico de almidón, tragacanto de almidón y goma xantana, o una combinación de los mismos. El agente espesante, cuando se incluye, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1 por ciento en volumen a 20 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. En un ejemplo, la glicerina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 por ciento en volumen a 10 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. Cantidades de ejemplo de agente espesante incluyen de aproximadamente 1 por ciento en volumen a 12 por ciento en volumen (v/v), y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 4 por ciento en volumen a 10 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. Una cantidad de ejemplo incluye aproximadamente de 6 a 10 por ciento en volumen (v/v). En algunos casos, se puede incluir opcionalmente un agente edulcorante en la forma farmacéutica líquida oral. Ejemplos de agentes edulcorantes incluyen sorbitol, sacarina, acesulfamo, p. ej., acesulfamo de potasio, sucralosa, xilitol, maltitol, sacarosa, aspartamo, fructosa, neotamo, glicerina, sacarato de sodio, glicirricina dipotásica, acesulfamo K, manitol, azúcar invertido y combinaciones de los mismos, o se pueden añadir componentes que contienen un agente edulcorante, tales como uno o más componentes que contienen sucralosa o componentes que contienen sacarina, para modificar el sabor de la composición. Alternativamente, o además, se puede usar un edulcorante viscoso tal como una o más soluciones de sorbitol, un jarabe (solución de sacarosa) o jarabe de maíz con alto contenido de fructosa y, además de los efectos edulcorantes, puede ser útil para aumentar la viscosidad y para retardar la sedimentación. En algunos casos, el agente edulcorante incluye un componente que contiene acesulfamo, sucralosa o sacarina. En algunos casos, el agente edulcorante incluye glicerina, sacarina, azúcar líquido (solución de sacarosa) o una combinación de los mismos. Tal agente edulcorante, si está presente, puede estar presente en una cantidad suficiente para minimizar o enmascarar cualquier sabor desagradable en el sabor de los agentes activos, y también para minimizar o enmascarar cualquier otro componente de sabor desagradable incluido en la formulación si se desea. El(los) agente(s) edulcorante(s), cuando se incluye, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0.1 por ciento en volumen a 85 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. En un ejemplo, el agente edulcorante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5 por ciento en volumen a 70 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. Cantidades de ejemplo de glicerina incluyen aproximadamente de 2 por ciento en volumen a 18 por ciento en volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente de 5 por ciento en volumen a 10 por ciento en volumen (v/v). En algunos casos, las cantidades de ejemplo de azúcar líquido incluyen aproximadamente de 40 por ciento en volumen a 75 por ciento en volumen (v/v), preferiblemente aproximadamente de 60 por ciento en volumen a 70 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. En algunos casos, ciertos tipos de agente espesante o agente edulcorante actúan como un agente solubilizante o agente estabilizante, o ambos, o tienen otras propiedades, cuando se incluyen como componente de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, un agente edulcorante tal como la glicerina actúa como agente espesante. En algunos casos, una forma farmacéutica líquida oral contiene, además de un agente edulcorante, un agente saborizante, por ejemplo, uno o más de frutas naturales y artificiales, plátano artificial, fresa y piña. En algunos casos, un agente colorante, cuando se incluye en la forma farmacéutica líquida, se puede proporcionar en una cantidad

suficiente para proporcionar a las composiciones un aspecto más estético y/o distintivo. Los ejemplos de agentes colorantes incluyen uno o más aditivos alimentarios orgánicos sintéticos (p. ej., colorantes alimentarios tales como el colorante rojo alimentario n.º 2 y 3, colorante amarillo alimentario n.º 4 y 5 y el colorante azul alimentario n.º 1 y 2), colorantes laca insolubles en agua (p. ej., sales de aluminio de los aditivos alimentarios orgánicos sintéticos anteriores, etc.) y pigmentos naturales (p. ej., betacaroteno, clorofila, óxido de hierro rojo, etc.). Otros colorantes adecuados incluyen D&C Rojo n.º 33, FD&C Rojo n.º 3, FD&C Rojo n.º 40, D&C Amarillo n.º 10 y C Amarillo n.º 6, o cualquier combinación de estos o los colorantes anteriores. En algunos casos, se incluye(n) opcionalmente agente(s) conservante(s) adecuado(s) en la forma farmacéutica líquida. El(los) agente(s) conservante(s) puede(n) estar en una cantidad suficiente para extender la vida en anaquel o la estabilidad en el almacenamiento, o ambos, de la forma farmacéutica líquida. Ejemplos de agentes conservantes incluyen benzoato de sodio, ésteres de ácido paraoxibenzoico, metil, etil, butil y propil-parabenos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol feniletílico, ácido deshidroacético, ácido sórbico, cloruro de benzalconio (BKC), cloruro de bencetonio, fenol, nitrato fenilmercúrico, timerosal, y una combinación de los mismos. En algunos casos, el pH de la forma farmacéutica líquida puede ajustarse mediante un agente de tamponamiento. El agente de tamponamiento puede estar presente en una cantidad suficiente para tamponar el pH de la solución y minimizar la degradación de los principios activos. En algunos casos, algunos agentes de tamponamiento también modulan la solubilidad del principio activo en la forma farmacéutica líquida. Los ejemplos de agentes de tamponamiento incluyen uno o más de gluconato, lactato, citrato, acetato, fosfato, benzoato y/o sales de carbonato. El pH se puede ajustar con una combinación de dos o más de estos agentes de tamponamiento, p. ej., ácido cítrico y benzoato de sodio. El agente de tamponamiento puede estar presente como una solución tampón. En otro ejemplo, el agente de tamponamiento incluye un fosfato, tal como fosfato de potasio o fosfato de sodio, o una combinación de los mismos. En algunos casos, los agentes emulsionantes pueden incluirse en la forma farmacéutica líquida en una cantidad suficiente para facilitar una dispersión más uniforme de uno o más principios activos u otro excipiente farmacéuticamente aceptable que puede no ser en general soluble en el líquido. Los agentes emulsionantes de ejemplo incluyen gelatina, yema de huevo, caseína, colesterol, goma arábiga, tragacanto, chondrus, pectina, metilcelulosa, carbómero, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, o una combinación de los mismos. Los agentes solubilizantes se pueden incluir en la forma farmacéutica líquida, p. ej., en una cantidad suficiente para facilitar una disolución mayor o más rápida de uno o más principios activos u otros excipientes. Los ejemplos de agentes solubilizantes incluyen un alcohol, p. ej., alcohol etílico al 95%, un glicol, glicerina, D-manitol, trehalosa, benzoato de bencilo, trisaminometano, colesterol, trietanolamina, carbonato de sodio, citrato de sodio, salicilato de sodio, acetato de sodio y una combinación de los mismos. Los ejemplos de alcoholes incluyen etanol, isopropanol, t-butanol, fenol, cresol, un alcohol bencílico o una combinación de los mismos. Los ejemplos de glicoles incluyen alquenos C2-20 funcionalizados con un glicol, que incluyen propilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol, etc., o una combinación de los mismos. Se puede incluir un agente solubilizante en una cantidad de aproximadamente 1 por ciento en volumen a 20 por ciento en volumen (v/v), o aproximadamente de 4 por ciento en volumen a 15 por ciento en volumen (v/v), basado en el volumen total de la solución. Los ejemplos de cantidades de agente solubilizante incluyen aproximadamente de 7 por ciento en volumen a 12 por ciento en volumen (v/v) basado en el volumen total de la solución. En algunos casos, se puede incluir un agente estabilizante en la forma farmacéutica líquida. Los ejemplos de agentes estabilizantes incluyen, por ejemplo, uno o más excipientes líquidos tales como etanol, glicerina; uno o más glicoles, tales como polietilenglicol, p. ej., PEG-400, propilenglicol o polipropilenglicol; un componente a base de celulosa, tal como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) o hidroximetilcelulosa (HMC); o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, ciertos agentes solubilizantes funcionan eficazmente como un agente estabilizante. Por ejemplo, el propilenglicol funciona tanto como un agente solubilizante como agente estabilizante. En algunos casos, se pueden incluir un antioxidante(s) en la forma farmacéutica líquida. Los ejemplos de antioxidantes incluyen uno o más flavonoides, antocianidinas, antocianinas, proantocianidinas y combinaciones de los mismos. El(los) antioxidante(s), cuando se usan, pueden ayudar a proporcionar estabilidad a largo plazo a las composiciones líquidas, p. ej., en condiciones ambientales durante al menos aproximadamente un mes, preferiblemente durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 24 meses o más, dependiendo del tipo y concentración de antioxidante utilizado y dependiendo de otros componentes del microambiente de almacenamiento, tales como el pH, el agente de tamponamiento, etc.

En algunos casos, una composición descrita en el presente documento presenta un rendimiento mejorado o más deseado con respecto a la concentración, disolución, dispersión, estabilidad, seguridad, emulsificación, eficacia, sabor, observancia del paciente, biodisponibilidad, y/u otras propiedades farmacocinéticas, químicas y/o físicas del fármaco. En algunos casos, se puede disolver una cantidad eficaz de uno o más agentes activos para generar una solución sustancialmente estable o estable con uno o más de los vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables como se describe en el presente documento. En algunos casos, una forma farmacéutica líquida oral descrita en el presente documento puede ser una forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada. La forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede proporcionar la liberación controlada o sostenida de uno o más principios activos de un gel, matriz, cápsula o material de resina, o cualquier combinación de tecnología de liberación controlada o sostenida que pueda suspenderse o disolverse en una composición líquida. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender uno o más excipientes, tales como goma xantana, alginato de sodio, pares de coacervados complejos, tales como gelatina u otros polímeros y carragenina, y formulaciones de metilcelulosa

de gelificación térmica. Dichos excipientes pueden influir en la velocidad de disolución y/o difusión de un principio activo suspendido para modificar las características de absorción del principio activo en comparación con una forma farmacéutica líquida oral convencional. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada se puede administrar en una composición normalmente líquida y solo posteriormente forma una matriz persistente semisólida o similar a un gel en el entorno del estómago. En algunos casos, una forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender una solución o suspensión acuosa, parcialmente acuosa o no acuosa de goma xantana, alginato de sodio o alginato de sodio LV (baja viscosidad, empobrecido en calcio), gelatina y carragenina, metilcelulosa, o una combinación de los mismos. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender goma xantana (p. ej., Kelco SS-4749 y otros tipos disponibles comercialmente) en una cantidad de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 3.0 por ciento en peso. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender goma xantana en una cantidad de aproximadamente 1.0 por ciento en peso. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender alginato de sodio en una cantidad de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 3.0 por ciento en peso, o de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 1.5 por ciento en peso de cada gelatina y carragenina. En algunos casos, cada carragenina tipo iota y gelatina tipo B puede estar presente en niveles de al menos aproximadamente 0.5 por ciento en peso. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender al menos aproximadamente 1 por ciento en peso de alginato de sodio. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender metilcelulosa (p. ej., Tipo A15C, Dow Chemical Co.) en una cantidad de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 3.0 por ciento en peso. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender metilcelulosa (p. ej., Tipo A15C, Dow Chemical Co.) en una cantidad de aproximadamente 2.0 por ciento en peso. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada comprende otros excipientes tales como, por ejemplo, goma de algarroba, sales tales como NaCl, azúcares tales como sorbitol, Na₃PO₄, CaCO₃, Ca₂HPO₄ y similares. La forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada puede comprender compuestos de carbonato tales como carbonato de calcio. El carbonato de calcio puede "mantener a flote" la matriz gelatinosa en una región predeterminada del estómago para que pueda ponerse en contacto con el ambiente de pH más apropiado durante un periodo de tiempo prolongado debido al retraso en el vaciamiento gástrico. En algunos casos, la forma farmacéutica líquida oral de liberación controlada incluye soluciones o suspensiones acuosas, soluciones o suspensiones parcialmente acuosas tales como, por ejemplo, glicerina de alto o bajo peso molecular, alcoholes y glicoles o incluso soluciones o suspensiones no acuosas tales como, por ejemplo, glicerina, alcoholes y glicoles de alto o bajo peso molecular.

En algunos casos, una composición líquida descrita en el presente documento puede comprender además uno o más excipientes: ácido ascórbico, EDTA dihidrato, glicerina, ácido cítrico monohidrato, citrato de sodio dihidrato, solución de sorbitol (p. ej., 70%), sucralosa, colorante alimentario (p. ej., FD&C amarillo n.º 6), sabor a comida o fruta (p. ej., sabor a naranja artificial o natural), sabor a menta (p. ej., sabor a menta artificial o natural), o agua. En algunos casos, la composición líquida puede comprender además uno de o tanto benzoato de sodio como propionato de sodio. En algunos casos, la composición líquida puede comprender además uno o más de propilparabeno, metilparabeno o propilenglicol. En algunos casos, la composición líquida puede comprender además pseudoefedrina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma (p. ej., pseudoefedrina HCl).

Métodos para preparar composiciones líquidas

En un aspecto, un método para preparar una composición líquida descrita en el presente documento incluye mezclar una o más perlas que tienen uno o más agentes activos con una solución tixotrópica densa que tiene una densidad que puede ser o ser aproximadamente la densidad de una o más perlas y un agente tixotrópico, agua y uno o más conservantes en condiciones que reduzcan la formación de burbujas. En otro aspecto, un método para preparar una composición líquida incluye combinar una mezcla que comprende una o más perlas que comprenden uno o más agentes activos, un agente espesante y un tensioactivo mezclando con una hélice de baja cavitación y recirculando la mezcla debajo de la superficie de la mezcla para minimizar la formación de burbujas. En otro aspecto, un método para preparar una composición líquida incluye combinar una mezcla que comprende uno o más agentes activos sobre o alrededor de un vehículo un agente espesante en condiciones que minimizan la introducción de aire. Las condiciones para para minimizar, reducir y/o eliminar la introducción de aire y/o la formación de burbujas incluyen uno o más de los siguientes pasos usados solos, en combinación y/o en cualquier orden: usar una bomba de diafragma para combinar, p. ej., el agua y el agente tixotrópico y uno o más conservantes, colorantes y saborizantes; colocar el tubo de recirculación por debajo de la superficie del líquido; añadir líquidos a lo largo del lateral de un recipiente que contiene el líquido; rociar perlas (p. ej., una o más perlas que incluyen uno o más agentes activos) sobre la superficie del líquido; mezclar la solución en ausencia de una o más paletas que raspen el recipiente; mezclar la solución con un mezclador de hélice; mezclar la solución con un mezclador de hélice a una velocidad que reduzca o minimice la cavitación y combinaciones de dos o más de estos pasos. En otro aspecto, un método para preparar una composición líquida incluye combinar una mezcla de una o más perlas de liberación controlada con uno o más agentes activos sobre un vehículo en una solución que tiene una concentración iónica baja y un agente tixotrópico, en condiciones que minimizan la introducción de burbujas de aire.

Como se usa en el presente documento, el término "tixotrópico" se puede usar para describir uno o más agentes, p. ej., ciertos geles, que licúan cuando se someten a fuerzas vibratorias como una simple agitación y luego solidifican nuevamente cuando se dejan reposar. El comportamiento tixotrópico se puede observar cuando las moléculas de cadena larga tienden a orientarse en la dirección del flujo; a medida que se puede aumentar la fuerza aplicada, se puede disminuir la resistencia al flujo. Sin embargo, cuando se puede eliminar el alto esfuerzo cortante, la solución volverá rápidamente a su estado viscoso original. Algunas celulosas presentan un comportamiento tixotrópico en donde la solución vuelve a su estado viscoso durante un periodo de tiempo. Los ejemplos de agentes tixotrópicos incluyen celulosa (p. ej., carboximetilcelulosa), gomas (p. ej., xantana), colágeno, gelatina y aerogeles.

En algunos casos, cuando se formulan con partículas, p. ej., micropartículas o nanopartículas, el perfil de liberación de uno o más agentes activos se puede adaptar fácilmente agregando un recubrimiento, p. ej., un recubrimiento de gelatina dura o blanda, un recubrimiento de almidón, una resina o recubrimiento de polímero y/o un recubrimiento celulósico. Dichas formas farmacéuticas se pueden recubrir adicionalmente, por ejemplo, con un recubrimiento de sellado, un recubrimiento entérico, un recubrimiento de liberación prolongada o un recubrimiento de liberación retardada dirigida. Se puede aplicar un recubrimiento a un principio activo que se puede comprimir, moldear o extruir. Se puede aplicar un recubrimiento mediante una dispersión acuosa o después de disolverlo en un disolvente apropiado.

En algunos casos, un vehículo descrito en el presente documento puede ser total o parcialmente biodegradable. Los ejemplos de vehículos incluyen matrices o polímeros permeables y semipermeables que controlan las características de liberación de la formulación. Dichos polímeros incluyen, por ejemplo, acilatos y acetatos de celulosa, así como polímeros selectivamente permeables formados por la coprecipitación de un policatión y un polianión. Otros vehículos incluyen, p. ej., almidón, almidón modificado y derivados del almidón, gomas, goma xantana, ácido alginico, otros alginatos, benitonita, veegum, agar, guar, goma de algarroba, goma arábica, membrillo, psyllium, semilla de lino, goma de okra, arabinoglactina, pectina, tragacanto, escleroglucano, dextrano, amilosa, amilopectina, dextrina, etc., polivinilpirrolidona reticulada, resinas de intercambio iónico, tales como poli(metacrilato de potasio), carragenano (y derivados), goma karaya, goma biosintética, etc. Otros polímeros útiles incluyen: policarbonatos (poliésteres lineales de ácido carbónico); materiales microporosos (bisfenol, un poli(cloruro de vinilo) microporoso, poliamidas microporosas, copolímeros modacrílicos microporosos, estireno-acrílico microporosos y sus copolímeros); polisulfonas porosas, polivinilideno halogenado, policloroéteres, polímeros de acetal, poliésteres preparados por esterificación de un ácido o anhídrido dicarboxílico con un alquilenpoliol, poli(sulfuros de alquileno), fenoles, poliésteres, polímeros porosos asimétricos, polímeros de olefinas reticuladas, homopolímeros microporosos hidrófilos, copolímeros o interpolímeros que tienen una densidad aparente reducida y otras materias similares, poliuretano, poliuretano reticulado de cadena extendida, poli(imidas), poli(bencimidazoles), colodión, proteínas regeneradas, poli(vinilpirrolidona) semisólida reticulada. Los aditivos adicionales y sus niveles, y la selección de un material o materiales de recubrimiento primario dependerán de las siguientes propiedades: resistencia a la disolución y desintegración en el estómago; impermeabilidad a los fluidos gástricos y fármaco/vehículo/enzima mientras está en el estómago; capacidad para disolverse o desintegrarse rápidamente en el sitio del intestino objetivo; estabilidad física y química durante el almacenamiento; no toxicidad; fácil aplicación como recubrimiento (respetuoso con el sustrato); y factibilidad económica.

45 Tratamientos y Usos

En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para inhibir o matar una o más bacterias, que comprende poner en contacto la composición antibiótica descrita en el presente documento con una o más bacterias. En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para tratar una infección bacteriana, que comprende poner en contacto la composición antibiótica descrita en el presente documento con la infección bacteriana. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas. En algunos casos, la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas multirresistentes. En algunos casos, la una o más bacterias pueden comprender *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en una superficie. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en un mamífero. En algunos casos, la infección bacteriana o una o más bacterias pueden estar en un ser humano. En algunos casos, el contacto puede ser por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa o subcutánea. En algunos casos, el contacto puede ser por aplicación tópica. En algunos casos, el contacto puede ser por vía oral. En algunos casos, el contacto dura al menos aproximadamente: 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 4 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 18 horas, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana o un mes. En algunos casos, el contacto se produce 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 veces por hora o al día. En algunos casos, el contacto ocurre aproximadamente cada 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 minutos u horas diariamente. En algunos casos, la composición antibiótica puede estar en una sola dosis unitaria. En algunos casos, la cantidad del agente de organoselenio que se pone en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias puede ser

aproximadamente de 10 a 100 mg, aproximadamente de 10 a 50 mg o aproximadamente de 20 a 30 mg, por ejemplo, aproximadamente 25 mg, por dosis. En algunos casos, una cantidad de plata puesta en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias puede ser aproximadamente de 1 a 20 mg, aproximadamente de 1 a 10 mg o aproximadamente de 5 a 7 mg, por ejemplo, aproximadamente 6 mg, por dosis.

5

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento se puede usar para tratar o prevenir infecciones bacterianas o infecciones virales y, en algunos casos, infecciones por protozoos. En algunos casos, el tratamiento inhibe o mata una o más bacterias. En algunos casos, la composición antibiótica puede administrarse como medida preventiva (profiláctica) a poblaciones de riesgo, tales como aquellas con un sistema inmunitario debilitado (particularmente en casos de VIH para prevenir la neumonía), quienes toman medicamentos inmunosupresores, pacientes con cáncer y quienes tienen cirugía. En algunos casos, la composición antibiótica se puede usar en procedimientos quirúrgicos para ayudar a prevenir la infección de las incisiones realizadas. En algunos casos, la composición antibiótica se puede utilizar en la profilaxis antibiótica dental para prevenir la bacteriemia y la consiguiente endocarditis infecciosa. En algunos casos, la composición antibiótica se puede usar para prevenir infecciones en casos de neutropenia, particularmente relacionada con el cáncer.

10

15

20

En algunos casos, la composición antibiótica se puede aplicar por vía oral, tópica o por inyección, p. ej., por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. En algunos casos, la composición antibiótica se puede administrar por vía tópica, por ejemplo para algunas afecciones de la piel, incluido el acné y la celulitis, o en forma de colirios sobre la conjuntiva para la conjuntivitis o gotas para los oídos para infecciones del oído y casos agudos de oído de nadador. En algunos casos, las ventajas de la aplicación tópica incluyen lograr una concentración alta y sostenida de antibiótico en el sitio de la infección; reducir el potencial de absorción sistémica y toxicidad, y se reducen los volúmenes totales de antibiótico requeridos, lo que también reduce el riesgo de uso indebido de antibióticos. En algunos casos, la composición antibiótica se puede aplicar por vía tópica sobre ciertos tipos de heridas quirúrgicas para reducir el riesgo de infecciones en el sitio quirúrgico.

25

30

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento, tal como en forma de recubrimiento, se usa para esterilizar una superficie. Por ejemplo, la composición antibiótica se puede aplicar al equipo quirúrgico y a cualquier superficie en contacto con el equipo quirúrgico antes de una operación. El equipo científico también se puede recubrir con dicha composición antibiótica para evitar la contaminación cruzada de ciertos microbios que podrían interferir con una medición que se va a tomar con el equipo. En algunos casos, la composición antibiótica se puede aplicar en forma de una película, lámina, líquido, aerosol o recubrimiento a una superficie biológica o no biológica. Otras aplicaciones pueden incluir adherir una composición antibiótica a un órgano trasplantado para prevenir la infección por un patógeno durante un procedimiento de trasplante.

35

40

En algunos casos, un sujeto adecuado para el tratamiento puede ser una superficie. En algunos casos, un sujeto adecuado para el tratamiento puede ser un mamífero, p. ej., un ser humano, ratón, rata, cobayo, perro, gato, caballo, vaca, cerdo o un primate no humano, tal como un mono, chimpancé o babuino. En algunos casos, el sujeto puede ser un ser humano. En algunos casos, el sujeto puede ser un adulto. En algunos casos, el sujeto puede ser un ser niño. En algunos casos, el sujeto puede tener una edad de 2 años o más, 4 años o más, 6 años o más, 12 años o más, o 18 años o más. En algunos casos, un sujeto adecuado para el tratamiento puede ser menor de 18 años, 12 años o 6 años de edad.

45

En algunos casos, las composiciones descritas en el presente documento se administran a un sujeto de aproximadamente cada 4 a aproximadamente 6 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 48 horas o más a menudo. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede administrarse una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces o más veces al día. En algunos casos, una forma farmacéutica descrita en el presente documento proporciona una concentración plasmática efectiva de un agente activo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos después de la administración, tal como aproximadamente: 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min, 15 min, 16 min, 17 min, 18 min, 19 min, 20 min, 21 min, 22 min, 23 min, 24 min, 25 min. En algunos casos, una forma farmacéutica de la descripción del presente documento proporciona una concentración plasmática efectiva de un agente activo de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 24 horas después de la administración, tal como aproximadamente 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 1 h, 1.2 h, 1.4 h, 1.6 h, 1.8 h, 2 h, 2.2 h, 2.4 h, 2.6 h, 2.8 h, 3 h, 3.2 h, 3.4 h, 3.6 h, 3.8 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h, 15 h, 16 h, 17 h, 18 h, 19 h, 20 h, 21 h, 22 h, 23 h o 24 h horas después de la administración.

50

55

60

En algunos casos, el agente activo puede estar presente en una concentración plasmática efectiva en un sujeto durante de aproximadamente 4 a aproximadamente de 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o de 1 día a 30 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 días.

65

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata una o más bacterias multiresistentes. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento

- inhibe o mata una o más bacterias Gram positivas o bacterias Gram negativas. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata una o más bacterias Gram positivas multirresistentes. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata una o más bacterias Gram negativas multirresistentes, que no son sensibles a al menos un agente en tres o más categorías antimicrobianas. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata una o más bacterias, incluidas *Bacillus cereus* var *mycoides*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens*, *Penicillium funiculosum*, *Candida albicans*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae*, cocos, bacilos, enterococos resistentes a la vancomicina o *Saccharomyces cerevisiae*. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata una o más bacterias Gram negativas, incluidas *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento inhibe o mata uno o más de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Shigella* y otras *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, bacterias del ácido acético, *Legionella*, cianobacterias, espiroquetas, bacterias verdes del azufre y verdes no sulfuradas. En algunos casos, la composición antibiótica descrita en el presente documento presenta una concentración inhibidora de 50% (IC50) de menos de aproximadamente: 50 µM, 25 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0.5 µM, 0.1 µM, 50 nM, 25 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM o 1 nM para una o más bacterias.
- En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento trata la infección causada por uno o más organismos que son especies de *Staphylococcus* (p. ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), *Streptococcus* (p. ej., *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*), *Enterococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Chlamydia*, *Moraxella*, *Haemophilus* y *Neisseria*. En algunos casos, las especies son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium* sp., *Propionibacterium* sp., *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*.

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento puede ser adecuada para la administración tópica en un ojo, tal como una forma de colirio o crema ocular, comprendiendo la composición: una combinación de agentes activos en una concentración eficaz para el tratamiento y/o profilaxis de una infección bacteriana Gram positiva o Gram negativa de al menos un tejido del ojo, y al menos un excipiente oftálmicamente aceptable que reduce la tasa de eliminación de la composición del ojo por lagrimeo.

En algunos casos, una composición antibiótica descrita en el presente documento penetra o disuelve una biopelícula microbiana. Una biopelícula microbiana, también denominada una biopelícula biológica, puede ser una comunidad de células microbianas insertadas en una matriz extracelular de sustancias poliméricas y adheridas a una superficie biológica o no biológica. Se puede encontrar una variedad de microorganismos (bacterias, hongos y/o protozoos, con bacteriófagos asociados y otros virus) en estas biopelículas. Las biopelículas son omnipresentes en la naturaleza, se encuentran comúnmente en una amplia gama de entornos. La comunidad científica y médica reconoce cada vez más que las biopelículas están implicadas en muchas infecciones, y especialmente su contribución a dificultar el tratamiento de infecciones. Las biopelículas pueden ser agentes etiológicos para una serie de enfermedades en los mamíferos y están implicadas en 80% de las infecciones en los seres humanos. Los ejemplos pueden incluir infecciones de la piel y de heridas, infecciones del oído medio, infecciones del tracto gastrointestinal, infecciones de la membrana peritoneal, infecciones del tracto urogenital, infecciones de los tejidos blandos orales, formación de placa dental, infecciones oculares (incluida la contaminación por lentes de contacto), endocarditis, infecciones en la fibrosis quística e infecciones de dispositivos médicos permanentes, tales como prótesis articulares, implantes dentales, catéteres e implantes cardíacos. Los microbios en biopelículas pueden ser significativamente más resistentes al tratamiento antimicrobiano que sus homólogos planctónicos. La formación de biopelículas no se limita únicamente a la capacidad de los microbios para adherirse a una superficie. Los microbios que crecen en una biopelícula pueden interactuar más entre sí que con el sustrato físico real sobre el que se desarrolló inicialmente la biopelícula.

Ejemplos

Ejemplo 1. Experimentos *in vitro*

1.1 Resultados

La combinación de plata con ebselen presentaba toxicidad sinérgica selectiva contra bacterias

Se investigó en las microplacas el efecto del nitrato de plata con ebselen en combinación en el crecimiento de bacterias modelo Gram negativas, *E. coli*. Los cultivos de una noche de DHB4 se diluyeron 1:1000 veces en medio Luria-Bertani (LB), y se trataron con plata iónica (Ag⁺) como sal de nitrato (AgNO₃) durante 16 h. La Ag⁺ sola inhibía el crecimiento de *E. coli* con una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 42 µM después de 16 h de tratamiento, mientras que la adición de ebselen 2 µM disminuía drásticamente la MIC de la Ag⁺ a 4.2 µM

($p=0.000028<0.001$) (Fig. 1A). Mientras que la Ag^+ 5 μM y ebselen 2.5 μM en combinación no mostraron toxicidad sinérgica en células HeLa humanas ($p=0.98>0.05$) (Fig. 1B). Además, la toxicidad del propio ebselen (2, 4, 8 μM) en células bacterianas y de mamíferos era similar (Figs. 1A y 1B) sin efectos en el crecimiento bacteriano (Fig. 1C). Estos resultados indican que el tratamiento de Ag^+ con ebselen en combinación presenta toxicidad sinérgica selectiva significativa en bacterias frente a células de mamíferos, y la disminución drástica de la MIC de la plata contra bacterias en presencia de ebselen hace factible el uso médico sistémico de plata.

La inhibición del crecimiento a gran escala de *E. coli* por la Ag^+ con ebselen en combinación también se observó en la prueba de agitación de tubos de 15 ml. Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una $OD_{600\text{ nm}}$ de 0.4, y se trataron con Ag^+ 5 μM y concentraciones seriadas de ebselen (0, 20, 40, 80 μM). Las curvas de crecimiento mostraron un efecto bacteriostático sinérgico de la Ag^+ con ebselen en combinación en medio LB (Fig. 2A), y el efecto bactericida sinérgico de la Ag^+ 5 μM y ebselen 80 μM en combinación se confirmó además por el ensayo de formación de colonias en placas de LB-agar (Fig. 2B). Por otro lado, el propio ebselen 80 μM solo podía inhibir el crecimiento de *E. coli* en las primeras 8 horas y volver a la normalidad 12 horas después del tratamiento. Aunque ebselen 40 μM o la Ag^+ 5 μM solos no inhibían el crecimiento bacteriano, la Ag^+ con ebselen en combinación dio como resultado una fuerte inhibición del crecimiento de *E. coli* (Fig. 2A y 2B). De acuerdo con esto, la Ag^+ 5 μM y ebselen 20 μM en combinación mejoraron la frecuencia de la tinción con yoduro de propidio (PI) ($p=0.00083<0.001$) (Fig. 2C y 2D). El PI es un colorante fluorescente impermeable a la membrana que se ha utilizado ampliamente para detectar la permeación de la membrana celular y las células muertas. Sobre todo, estos resultados indican que la Ag^+ y ebselen en combinación presentaban un efecto sinérgico selectivo sobre las bacterias.

Los cinco patógenos Gram negativos MDR más difíciles de tratar clínicamente aislados eran sensibles a la Ag^+ con ebselen en combinación

Hay cinco especies de patógenos Gram negativos MDR las más difíciles de tratar en clínica, que también son bacterias GSH positivas típicas: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*. Se aislaron dos cepas de cada especie, los cultivos de toda la noche se diluyeron 1:1000 veces en medio LB, y se trataron con Ag^+ con una concentración seriada de ebselen en combinación durante 16 h. Se observaron los efectos bactericidas sinérgicos de la Ag^+ con ebselen en combinación contra las 10 cepas ensayadas (Tabla 1). Entre estas cinco especies, *A. baumannii* y *E. cloacae* son cepas resistentes a fármacos que se forman muy fácilmente, que es necesario tratarlas con cefalosporinas o con la cuarta generación en clínica, que incluyen imipenem, cefepima y cefotaxima, etc. Se identificaron las cepas aisladas de *A. baumannii* (AB-1/2) y *E. cloacae* (ECL-1) resistentes a imipenem, cefepima y cefotaxima (Tabla 2 y 3), y eran sensibles a la Ag^+ con ebselen en combinación (Tabla 1). Estos resultados indican que la Ag^+ con ebselen en combinación podría ser "la última posibilidad para salvar vidas" que es activa contra una variedad de bacterias con resistencia existente, lo que aumentaría la posibilidad correcta de una terapia prescrita empíricamente, incluso para infecciones resistentes a los antibióticos convencionales.

La Ag^+ con ebselen en combinación alteraban directamente sistemas bacterianos de Trx y GSH

Puesto que se piensa que en general la Ag^+ y ebselen son agentes que se dirigen a tiol, la actividad de TrxR o Trx bacterianas en células se trató con Ag^+ con ebselen en combinación (Figs. 3A y 3B). Aunque en las actividades de TrxR y Trx en los extractos celulares no influían ni la Ag^+ ni el ebselen solos, la combinación de Ag^+ 5 μM y ebselen 20 μM dio como resultado una drástica pérdida de las actividades de TrxR ($p=0.00018<0.001$) y Trx ($p=0.0036<0.01$) (Fig. 3A y 3B). De acuerdo con esta observación, el estado redox de la Trx1 medido por transferencia Western redox también se vio afectado por el tratamiento de Ag^+ con ebselen en combinación. La Trx1 estaba principalmente en forma reducida en bacterias no tratadas, que se oxidaron tras el tratamiento de fármacos en combinación (Fig. 3C). Se usó un anticuerpo contra Trx2 para detectar la Trx2 oxidada en el experimento para investigar el efecto del tratamiento sobre el estado redox de las Trx. Este anticuerpo no pudo detectar la Trx2 reducida probablemente debido al bloqueo del sitio de reconocimiento. No se observó ninguna de las Trx2 oxidadas tras el tratamiento, mientras que se detectó el control positivo de Trx2 oxidada con diamida (Fig. 3D). Estos resultados mostraron que la Trx2 era menos sensible al tratamiento en comparación con Trx1. Además, los niveles de proteína de Trx 1 y 2 no se vieron afectados por el tratamiento de 10 min con Ag^+ y ebselen en combinación (Fig. 3C y 3D).

La adición de Ag^+ 5 μM y ebselen 20, 40 u 80 μM también disminuyó los niveles de GSH. El tratamiento con Ag^+ 5 μM y ebselen 20 μM en combinación agotó el GSH funcional en 10 min en comparación con el control ($p=0.000021<0.001$) (Fig. 3E). Ebselen solo 80 y 40 μM también redujo los niveles de GSH, aunque de manera menos eficiente que los fármacos correspondientes en combinación en la misma concentración ($p=0.000076$, y 0.000029, < 0.01). En cambio, ni la Ag^+ 5 μM ni ebselen 20 μM modularon los niveles de GSH en las condiciones ensayadas en comparación con el control ($p=0.081$ y 0.712, >0.05) (Fig. 3E).

Se exploró además si el que la Ag^+ con ebselen en combinación disminuyera o agotara el GSH podría afectar a la S-glutacionilación de proteínas (Fig. 3F). La S-glutacionilación de proteínas disminuyó en bacterias tratadas con Ag^+ con ebselen, pero no en aquellas incubadas solo con Ag^+ 5 μM + o ebselen 20 μM solo. Así, la

presencia de Ag^+ 5 μM disminuía la S-glutacionilación de proteínas cuando se combinaba con ebselen 20 μM lo que refleja la pérdida de GSH (Fig. 3F).

Dado que la Trx y GSH/Grx son los principales sistemas dependientes de tior, se investigaron los efectos de la Ag^+ con ebselen en combinación en mutantes redox de *E. coli* deficientes en el sistema de Trx o GSH. Los mutantes de *E. coli* que carecen de los componentes del sistema GSH (*gshA*-) y que viven en Trx y TrxR eran más sensibles al tratamiento de Ag^+ y ebselen comparado con el tipo natural (WT) (Tabla 4-6). Todos los resultados mostraron que la Ag^+ con ebselen en combinación tiene fuertes efectos sinérgicos en los sistemas bacterianos de Trx y GSH, y apunta a los sistemas dependientes de tior como una nueva estrategia antibiótica.

La plata inhibe irreversiblemente las actividades bacterianas de Trx y TrxR

Las actividades de las enzimas TrxR y Trx1 celulares disminuyeron, mientras que los niveles de proteínas correspondientes no se alteraron por el tratamiento de Ag^+ con ebselen en combinación, lo que sugiere que la TrxR y Trx eran inhibidas. Dado que ebselen es un conocido inhibidor competitivo reversible de la TrxR bacteriana, se investigó el efecto de la Ag^+ en la actividad de TrxR y Trx de *E. coli*. Cuando la TrxR de *E. coli* preincubada con NADPH 100 nM se incubó con Ag^+ , la IC_{50} era de aproximadamente 50 nM (Fig. 4A), similar al compuesto de oro auranofina. Para detectar si la TrxR de *E. coli* puede ser inhibida específicamente por la Ag^+ , la enzima se incubó con Ag^+ en presencia de Trx1 reducida de *E. coli*, el efecto inhibitorio hacia la TrxR disminuyó (Fig. 4A). Esto indicó que la Trx también reaccionaba con la Ag^+ y jugó un papel protector para la TrxR. La espectroscopia de fluorescencia verificó además que la Ag^+ interactuó con la Trx1 reducida y cambió sus espectros de fluorescencia (Fig. 4B). La incubación con Ag^+ 1-10 μM aumentó la intensidad de fluorescencia del triptófano de la Trx1 10 μM . Por otro lado, la intensidad fluorescente de la Trx1 10 μM disminuyó cuando se trató con Ag^+ 20-100 μM (Fig. 4B). En consonancia con esto, la actividad de la Trx disminuyó junto con el aumento de la concentración de Ag^+ (Fig. 4C). La inhibición de Trx1 por la Ag^+ era irreversible ya que la actividad de Trx1 no se recuperó después de la desalinización ($p=0.00021<0.001$) (Fig. 4D). Esto indicó que la Ag^+ formó un complejo apretado con los grupos sulfhidrilo en la Trx1 reducida de *E. coli*. Todos estos resultados muestran que la plata inhibe irreversiblemente las actividades de Trx y TrxR bacterianas.

Las ROS son un factor determinante para el efecto bactericida sinérgico de la Ag^+ y ebselen

Una función importante de los sistemas de GSH y Trx es eliminar las ROS para mantener el equilibrio redox celular y proteger contra el estrés oxidativo. La inhibición del sistema de Trx y el agotamiento del GSH pueden ser responsables de la elevación de ROS. Para determinar si el aumento de los niveles de ROS explicaba el efecto bactericida, se determinaron los niveles de ROS en células tratadas con Ag^+ y ebselen. El tratamiento con Ag^+ 5 μM o ebselen 20 μM solos no cambió las concentraciones de ROS, mientras que la combinación de Ag^+ 5 μM y ebselen 20 μM dio como resultado un aumento de los niveles de ROS ($p=0.00012<0.001$) (Figs. 5A y 5B). Además, la mejora de los niveles de H_2O_2 causada por el tratamiento con Ag^+ 5 μM y ebselen 20 μM en combinación también se verificó mediante el método Amplex Red ($p=0.00057<0.0001$) (Figura 5C). Además, los mutantes de *E. coli* que carecen de los componentes OxyR (*OxyR*-) que perjudican los grupos de deshidratasa de *E. coli* de la lesión por H_2O_2 fueron más sensibles al tratamiento de Ag^+ y ebselen comparado con el tipo natural (WT) (Tabla 4-6). Todos los resultados mostraron que la letalidad de la Ag^+ con ebselen contra bacterias se acompaña de generación de ROS.

1.2 Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron con *Escherichia coli* (*E. coli*) DHB4 y sus fenotipos redox derivados (Tabla 6), y cepas Gram negativas multirresistentes (MDR) clínicamente aisladas (Tabla 2, 3, 7). Todos los experimentos *in vivo* se realizaron con *E. coli* ZY-1 (Tabla 7), que se aisló de la orina de un paciente clínico en el Primer Hospital Afiliado de la Universidad de las Tres Gargantas en la provincia de Hubei, República Popular China, con la aprobación para investigación del Comité de Ética del Primer Hospital Afiliado de la Universidad de las Tres Gargantas y consentimiento informado del paciente. La cepa se identificó detalladamente y se almacenó. Se obtuvieron otras cepas Gram negativas MDR clínicas aisladas (Tabla 2, 3) de pacientes clínicos en el Hospital Renmin de la Universidad de las Tres Gargantas en la provincia de Hubei, República Popular China, con todas las aprobaciones y consentimientos informados.

Antibióticos y productos químicos

Todos los experimentos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) (EMD millipore). A menos que se especifique lo contrario, se usaron las siguientes concentraciones para los experimentos antibacterianos con cepas de *E. coli* y patógenos clínicos: 2-fenil-1, 2-bencisoselenazol-3(2H)-ona (ebselen) (Daiichi) 0, 1, 2, 4, 5, 20, 40, 80 μM y nitrato de plata 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μM (Sigma-Aldrich). El ácido 4-acetamido-4'-maleimidilestilbena-2,2'-disulfónico (AMS) (Invitrogen), los cócteles inhibidores de proteasas (Roche), ensayo

de proteínas DC™ (Bio-RAD), yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences), TrxR de *E. coli* DHB4, anticuerpo anti-Trx1 de *E. coli* y anti-Trx2 de *E. coli* de conejo eran de IMCO Corp. (Estocolmo, Suecia), anti-IgG de conejo-HRP de cabra (Santa Cruz, n.º de lote H1015), anti-IgG de cabra-HRP de conejo (Southern Biotech, n.º de lote 12011-PG56), anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a para complejos de glutatión-proteína (VIROGEN, n.º de lote 101-A, número de clon D8), gel Bolt Bis-Tris al 4-12% (VWR), todos los demás reactivos eran de Sigma-Aldrich.

Efecto sinérgico de la plata con ebselen en combinación en el crecimiento de *E. coli*

10 Los cultivos de una noche de células de *E. coli* DHB4 se diluyeron 1:1000 veces en medio Luria-Bertani (LB) y se trataron con concentraciones seriadas de AgNO₃ y/o ebselen durante 16 h. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm. El cultivo tratado con DMSO al 0.8% (v/v) se usó como control.

Análisis de toxicidad de la plata con ebselen en combinación contra células de mamíferos

15 Las células HeLa se adquirieron de la ATCC y mediante detección de micoplasma y autenticación de líneas celulares humanas mediante análisis STR (ATCC, EE. UU.). Se cultivaron células HeLa en medio DMEM complementado con FCS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina a 37°C en una incubadora con 5% de CO₂. Las células se sembraron en microplacas de 96 pocillos y se cultivaron hasta una confluencia de 70-80%. Las células se trataron con combinaciones seriadas de ebselen y AgNO₃ durante 24 h. La toxicidad celular se detectó por ensayo de MTT.

Efecto antibacteriano de la plata con ebselen en combinación sinérgica en el crecimiento de cepas Gram negativas MDR clínicas aisladas

25 Diez cepas Gram negativas MDR (GSH positivas) clínicas aisladas se cultivaron hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se diluyeron 1:100 en 100 µl de medio LB en microplacas de 96 pocillos. Se añadieron diluciones seriadas de 100 µl de ebselen y AgNO₃ a los pocillos individuales. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó después de 16 h de cultivo a 37°C. El cultivo tratado con DMSO al 0.8% (v/v) se usó como control.

30 Detección del efecto bactericida de la plata con ebselen en combinación en cepas de *E. coli*

35 Se cultivaron células de *E. coli* DHB4 en tubos de 15 ml hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se trataron con AgNO₃ 5 µM y una concentración en serie de ebselen (0, 20, 40, 80 µM) en combinación. La supervivencia de *E. coli* sin tratar se comparó con las células tratadas con antibióticos midiendo la OD_{600 nm} y contando las colonias. Para el ensayo de formación de colonias, las células se recogieron a los 10 min, 1 h, 2 h y 4 h por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS. Las células se diluyeron en serie en PBS y se sembraron 100 µl de cultivo en placas LB. Las colonias se contaron después de una noche de incubación y las CFU/ml se calcularon mediante la siguiente fórmula: [(colonias)*(factor de dilución)] / (cantidad sembrada).

45 Además, las células cultivadas y lavadas como antes se recogieron a los 10 min por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (PI) 5 µg/ml durante 20 min en ausencia de permeado celular y se analizaron por citometría de flujo (CyAn adp, Beckman coulter).

Medición de la actividad de Trx/TrxR y cantidad de GSH en lisados de células de *E. coli* tratadas con plata y ebselen

50 Se cultivaron células de *E. coli* DHB4 hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con diferentes diluciones de ebselen y AgNO₃ durante 10 min. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS, luego las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris·HCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato de sodio 20 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 al 0.5%) que contenía cóctel inhibitor de proteasas y lisado por sonicación. Los lisados celulares se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min y la concentración de proteínas se midió mediante el ensayo de proteínas de Lowry (Bio-Rad DC™).

60 La actividad de TrxR de *E. coli* DHB4 en extractos celulares se midió mediante un ensayo de actividad de reducción de DTNB. Los experimentos se realizaron con microplacas de 96 pocillos en la solución que contenía Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 µM, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, en presencia de Trx de *E. coli* 5 µM. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min con un lector de microplacas de pocillos VERSA y se utilizó la pendiente de los 2 min iniciales para representar la actividad de TrxR. La actividad de Trx se detectó mediante este método combinado con TrxR de *E. coli* 100 nM en lugar de Trx de *E. coli* 5 µM en la mezcla de reacción.

65 Para medir los niveles de GSH, se añadieron 25 µg de los lisados celulares en la solución que contenía GR 50

nM, Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min.

Estado redox de Trx en *E. coli* tratada con plata y ebselen en combinación

5 Se cultivaron células de *E. coli* DHB4 hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con diferentes diluciones de ebselen y AgNO₃ durante 10 min. Se realizó transferencia Western para detectar el estado redox de Trx1 y Trx2 de las células de *E. coli* tratadas con ebselen y AgNO₃.
10 Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se hizo precipitar la proteína con TCA al 5% en 1.0 ml. Los precipitados se lavaron 3 veces con 1 ml de acetona previamente enfriada con hielo y se disolvieron en Tris·HCl 50 mM (pH 8.5) con SDS al 0.5% que contenía AMS 15 mM a 37°C durante 2 h. Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min para eliminar los sedimentos, y la concentración de proteínas se midió mediante el ensayo de proteínas de Lowry (Bio-Rad DC™). El estado redox de Trx1 y Trx2 se detectó con anticuerpo de oveja anti-Trx1 de *E. coli* y (anticuerpo de conejo anti-Trx2 de *E. coli*) en dilución 1:1000, seguida de la detección del reactivo Chemiluminescence Reagent Plus.

S-Glutationilación de proteínas en *E. coli* tratada con plata y ebselen en combinación

20 La S-glutationilación total de proteínas de las células de *E. coli* tratadas con ebselen con AgNO₃ en combinación se detectó mediante transferencia Western. Las células se cultivaron y lavaron como se describe anteriormente, y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris·HCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, β -glicerofosfato de sodio 20 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 al 0.5 %, cóctel inhibidor de proteasas) que contenía IAM 30 mM. Después de lisado por sonicación, los
25 lisados celulares se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min. La concentración de proteínas se midió por el ensayo de proteínas de Lowry (Bio-Rad DC™). Las muestras se incubaron con tampón de carga de SDS a 90°C durante 10 min y, a continuación, se separaron en gel Bolt Bis-Tris al 4-12% con tampón de análisis MES (150 V, 40 min). Se llevó a cabo un ensayo de transferencia Western con anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a (VIROGEN, 101-A/D8) para complejos glutatión-proteína.

30 Efecto sinérgico de plata y ebselen en el crecimiento de fenotipos redox de *E. coli* DHB4

Se cultivaron once fenotipos redox de *E. coli* DHB4 hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se diluyeron 1:100 en 100 μ l de medio LB en microplacas de 96 pocillos. Se añadieron diluciones seriadas de ebselen y AgNO₃ a los pocillos
35 individuales. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó después de 24 h de cultivo a 37°C. El cultivo tratado con DMSO al 0.8% (v/v) se usó como control.

Inhibición de Trx/TrxR bacterianas recombinantes por la plata

40 La inhibición de la TrxR bacteriana recombinante por la plata se llevó a cabo usando enzima de *E. coli*. Los experimentos se realizaron con microplacas de 96 pocillos en la solución que contenía Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, en presencia de Trx de *E. coli* 5 μ M. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min con un lector de microplacas de pocillos VERSA y se utilizó la pendiente de los 2 min
45 iniciales para representar la actividad de TrxR. La actividad de Trx se detectó por este método combinado con el uso de TrxR de *E. coli* 100 nM en lugar de Trx de *E. coli* 5 μ M en la mezcla de reacción.

Análisis de espectros de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia de Trx de *E. coli* reducida con plata se registraron a 10 μ M en un registrador
50 multimarca PerkinElmer Enspire usando una excitación a 280 nm.

Medición de la producción de ROS

Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células
55 bacterianas se trataron con diferentes combinaciones de ebselen y AgNO₃ durante 10 min. Para analizar la cantidad de producción de ROS en las bacterias, las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se tiñeron con H₂DCF-DA 5 μ M durante 20 min. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en PBS, y la producción de ROS se cuantificó por citometría de flujo (CyAn adp, Beckman coulter).

60 Producción de H₂O₂

Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células
65 bacterianas se trataron con ebselen 20 μ M y AgNO₃ 5 μ M durante 10 min. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se sonicaron durante 10 s. En presencia del reactivo Amplex® Red 50 μ M, HRP 0.1 U/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH

7.4, muestras de 50 μ l se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y se detectaron con absorbancia a 560 nm (Molecular Probes, Eugene, OR).

Efecto de ebselen en el crecimiento de *E. coli*

5

Se cultivaron células de *E. coli* DHB4 hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se trataron con diluciones seriadas de ebselen (0, 2, 4, 8 μ M) durante 16 h. La viabilidad celular se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm. El cultivo tratado con DMSO al 0.8% (v/v) se usó como control.

10 Ensayo de la tasa de supervivencia directa

El ensayo de la tasa de supervivencia directa se realizó para evaluar la capacidad de supervivencia de la cepa de *E. coli* DHB4 tratada con ebselen y AgNO₃ en sangre de ratones sanos. Las células tratadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.6) se usaron como control positivo y el experimento se realizó por duplicado. Brevemente, se extrajo sangre de 3 ratones y se recogió en tubos heparinizados. Se recogieron aproximadamente 100 células de *E. coli* DHB4 durante la fase logarítmica, se lavaron con PBS estéril y se añadieron a 100 μ l de sangre. Después de incubación a 37°C durante 6 h, se extendieron por duplicado partes alícuotas de 100 μ l de cada muestra de sangre en agar-LB y las colonias supervivientes se contaron después de la incubación durante la noche. Los resultados mostraron que ebselen y AgNO₃ podrían ayudar a la inmunidad innata a eliminar *E. coli*.

20 Inhibición de TrxR de mamífero recombinante por la plata

Los experimentos se realizaron con microplacas de 96 pocillos en la solución que contenía Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 250 μ M, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, en presencia de TrxR de *E. coli* 10 nM. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min con un lector de microplacas de pocillos VERSA y se utilizó la pendiente de los 2 min iniciales para representar la actividad de TrxR.

30 Análisis estadístico

Se calcularon la media, desviación estándar (SD) y los niveles de significación de la prueba t (dos colas, no pareados) en el software GrapPad Prism. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Ejemplo 2. Experimentos *in vivo*

35

2.1 Resultados

El efecto bactericida de la Ag⁺ con ebselen en combinación también se observó en medio LB que contenía sangre de ratón heparinizada. Para investigar si la actividad bactericida de la Ag⁺ con ebselen en combinación también es eficaz *in vivo*, los ratones se infectaron por vía i.p. con 6.0×10^7 o 1.7×10^6 *E. coli* ZY-1 MDR (Tabla 7), por modelización de una peritonitis aguda y leve, respectivamente. La LD₅₀ de *E. coli* ZY-1 administrada por vía i.p. fue de 1.3×10^7 CFU/ml. Una hora (modelo agudo) o 24 h (modelo leve) después de la infección, los ratones se trataron por vía i.p. con ebselen, Ag⁺, o los fármacos en combinación, o permanecieron sin tratamiento. La combinación de Ag⁺ y ebselen condujo a una reducción significativa de la carga bacteriana en comparación con el control en el modelo de peritonitis leve. Los ratones tratados con ebselen solo o sin tratar mostraron niveles similares de carga bacteriana después de 36 h de infección con 6.0×10^7 *E. coli*, mientras que el tratamiento con Ag⁺ con ebselen en combinación lograron una reducción de 100 veces en comparación con el control ($p = 0.0055 < 0.01$) (Fig. 6A). Además, el 80% de los ratones tratados con Ag⁺ con ebselen en combinación sobrevivieron en el modelo de ratones de peritonitis aguda, en comparación con 30% en el grupo de control (Fig. 6B). Estos hallazgos demostraron el efecto antibacteriano efectivo de la Ag⁺ y ebselen contra patógenos Gram negativos MDR *in vivo*.

Se ha demostrado en estudios previos que la Ag⁺ o ebselen solos son seguros. Para ensayar la toxicidad de la combinación, los ratones se dividieron en 5 por grupo, los cuales se trataron con 6 mg de AgNO₃/kg de peso corporal en combinación con concentraciones seriadas de ebselen (10, 15, 20 y 25 mg de ebselen/kg de peso corporal). Los ratones se observaron durante 7 días y permanecieron viables sin mortalidad. El efecto de 25 mg de ebselen/kg y 6 mg de AgNO₃/kg de peso corporal en combinación se evaluó en ratones midiendo las concentraciones de enzimas y metabolitos clave utilizando un analizador químico de sangre después del tratamiento durante 6, 24 y 48 horas. La densidad de linfocitos y monocitos y algunas enzimas, tales como la alanina transaminasa en ratones tratados con Ag⁺ y ebselen en combinación era reducida en el punto inicial (6 h); sin embargo, sus valores vuelven a la normalidad a las 24 h después del tratamiento (Tabla 8), lo que indica que existe una respuesta de estrés tras el tratamiento inicial. Estos resultados demostraron que la Ag⁺ y ebselen no eran tóxicos para los ratones en las condiciones ensayadas.

65

2.2 Materiales y métodos

Ensayo modelo de peritonitis leve en ratones

Se obtuvo la aprobación del Comité de bienestar y cuidado médico animal de la Universidad China de las Tres Gargantas antes de utilizar los animales para la investigación. Se compraron ratones Kunming macho sanos de 6 semanas de edad (peso corporal, 18 ± 2 g) del Centro de Animales de Laboratorio de China, Universidad de las Tres Gargantas. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas ventiladas individualmente (cinco ratones por jaula) bajo un ciclo constante de oscuridad (12 h)-luz (12 h) en una casa de animales SPF convencional y tenían libre acceso a comida y agua. Se tomaron muestras de cinco ratones aleatoriamente para examinar la recuperación bacteriana del cerebro, hígado, bazo y riñón para descartar la infección por *E. coli* antes de la manipulación experimental, y no se detectaron bacterias.

El experimento se realizó en diseño de bloques aleatorios y ensayo con ocultación única. El tamaño de la muestra se calculó mediante análisis de potencia y se estimó como: tamaño de muestra corregido = tamaño de muestra / (1 - [% abandono/100]). Cuarenta y ocho ratones se dividieron en 4 grupos, 12 ratones/grupo. La inoculación se realizó mediante inyección intraperitoneal de 100 μ l de 1.7×10^6 células de *E. coli* ZY-1 usando una jeringa de calibre 26. El inóculo se administró en suspensión con mucina al 8% (p/v) en solución salina estéril. 24 h después de la introducción del inóculo, 12 ratones por grupo recibieron tratamientos antibacterianos. 0, 12, 24 y 36 h postinfección, se realizaron lavados peritoneales inyectando 1.0 ml de solución salina estéril en la cavidad intraperitoneal seguido de un masaje del abdomen (100 veces/ratón). Posteriormente se abrió el abdomen y se recuperaron 200 μ l de líquido peritoneal (PF) del peritoneo para el análisis de las CFU/ml de *E. coli*, y se contaron las CFU/ml. Para la medición de las CFU/ml, el líquido peritoneal se diluyó en serie en PBS (pH 7.6). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Ensayo de modelo de peritonitis aguda en ratones

La experimentación se diseñó en diseño de bloques aleatorios y ensayo con ocultación única, y 40 ratones se dividieron en 4 grupos, 10 ratones/grupo. La inoculación se realizó por inyección intraperitoneal de 100 μ l de 6.0×10^6 CFU/ml de inóculos de *E. coli* ZY-1 usando una jeringa de calibre 26. El inóculo se administró en suspensión con mucina al 8% (p/v) en solución salina estéril. 1 h después de la introducción del inóculo, 10 ratones por grupo recibieron tratamientos antibacterianos y los ratones se observaron durante 7 días para evaluar la supervivencia global. Los experimentos se realizan por duplicado.

Análisis de toxicidad *in vivo* de la plata con ebselen en combinación

Cinco ratones por grupo se trataron con 6 mg de AgNO_3 /kg de peso corporal y concentración seriada de ebselen (10, 15, 20, 25 mg de AgNO_3 /kg de peso corporal) por vía intraperitoneal. Los ratones se observaron durante 7 días y se calculó la supervivencia global.

Análisis de muestras de sangre

Tres ratones por grupo se trataron con PBS administrado por vía parenteral, 25 mg de ebselen/kg de peso corporal en combinación con 6 mg de AgNO_3 /kg de peso corporal y vehículo. Los animales se observaron durante dos días y la extracción de sangre retroorbital se realizó a las 6, 24 y 48 h después del tratamiento. La sangre se recogió en tubos de ensayo de sangre entera heparinizada y se analizó más a fondo mediante un analizador químico de sangre (SYSMEX XE5000).

Análisis estadístico

Se calcularon la media, desviación estándar (SD) y los niveles de significación de la prueba t (dos colas, no pareados) en el software GraphPad Prism. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Ejemplo 3. Comparación con antibióticos convencionales

3.1. Resultados contra *E. coli*

La combinación de plata con ciertos antibióticos presentaba toxicidad sinérgica contra *E. coli*

Se investigaron los efectos antibacterianos del nitrato de plata (AgNO_3) y nueve antibióticos que representan cinco categorías funcionales diferentes (beta-lactamas, aminoglicósidos, síntesis, tetraciclina y macrólidos) en el crecimiento de un modelo de bacteria Gram negativa, *E. coli*, en microplacas de 96 pocillos. Los cultivos de una noche de *E. coli* DHB4 se diluyeron 1:1000 veces en medio Luria Bertani (LB), y se trataron con diluciones seriadas de plata iónica (Ag^+) como sal de nitrato y 9 antibióticos en combinaciones, por separado, durante 24 h. Como control positivo se utilizó ebselen, que actuaba sinérgicamente con la plata frente a bacterias Gram negativas. Los resultados aquí mostraron que 4 (gentamicina, kanamicina, geneticina, tetraciclina) de 9 antibióticos tenían actividad sinérgica en el crecimiento de *E. coli* DHB4 (Tabla 9). Además, se utilizó el modelo de Bliss para determinar la naturaleza de los efectos terapéuticos mostrados por las combinaciones de plata y

antibióticos. Se cuantificó el grado de sinergia a 1 y 4 h entre Ag⁺ y 4 antibióticos (gentamicina, kanamicina, geneticina y tetraciclina) en combinación, y los resultados mostraron que la Ag⁺ y los 4 antibióticos de hecho tenían combinaciones sinérgicas contra *E. coli* (Fig. 7). Todos los resultados señalaron que la plata podría potenciar los efectos antibacterianos de ciertos antibióticos contra las bacterias Gram negativas.

5

ROS era un factor letal para los efectos bactericidas sinérgicos de la Ag⁺ y antibióticos

La Ag⁺ y ebselen en combinación podían inducir un nivel alto de ROS, y los efectos de la Ag⁺ y antibióticos en combinaciones necesitan estudios adicionales. Por lo tanto, se determinaron los niveles de ROS en células tratadas con combinaciones de Ag⁺ y 4 antibióticos y la combinación de Ag⁺ y ebselen se usó como control positivo. Los resultados mostraron que el tratamiento con combinaciones de Ag⁺ 5 μM y antibióticos 80 μM dieron como resultado un aumento de los niveles de ROS ($p < 0.0001$) (Fig. 8A). Además, la mejora de los niveles de H₂O₂ causada por el tratamiento con combinaciones de Ag⁺ 5 μM y antibióticos 80 μM también se verificaron por el método de Amplex Red ($p < 0.0001$) (Figura 8B). Los resultados demostraron que ROS era uno de los factores determinantes para los efectos bactericidas sinérgicos de las combinaciones de Ag⁺ y antibióticos contra *E. coli*.

10

15

La Ag⁺ y los antibióticos podrían alterar el sistema de Trx bacteriano

20

Una función principal de los sistemas antioxidantes dependientes de tiol es eliminar las ROS para mantener el equilibrio redox celular y proteger contra el estrés oxidativo. La inhibición del sistema de Trx y el agotamiento del GSH pueden ser responsables de la elevación de ROS. Se ha demostrado que la Ag⁺ y ebselen en combinación se dirigen a los sistemas de Trx y GSH bacterianos mientras que los efectos de combinaciones Ag⁺ y antibióticos necesitan más estudios. *E. coli* DHB4 cultivada hasta OD_{600 nm} de 0.4 se trató con combinaciones de Ag⁺ 5 μM y antibióticos 80 μM, y se usó Ag⁺ y ebselen en combinación como control positivo. Los resultados aquí mostraron que después de 10 min de tratamiento, las actividades de Trx en extractos celulares tratados con combinaciones de Ag⁺ y antibióticos se inhibieron drásticamente en comparación con los antibióticos o el grupo de control (Fig. 9A, $p < 0.001$); mientras que las actividades de TrxR en extractos celulares tratados con combinaciones de Ag⁺ y antibióticos también se redujeron estadísticamente en comparación con antibióticos o el grupo de control (Fig. 9B, $p < 0.05$). Los mismos resultados se obtuvieron cuando el tiempo de tratamiento se prolongó a 60 min. Estos resultados sugirieron que la plata y los antibióticos en combinación tienen influencias directas en Trx1.

25

30

35

De acuerdo con esta observación, el estado redox de Trx1 medido por transferencia Western redox también se vio afectado por las combinaciones de Ag⁺ y antibióticos después de 60 min de tratamiento. La Trx1 estaba en forma reducida en bacterias no tratadas y se oxidó tras el tratamiento con combinaciones de Ag⁺ y antibióticos (Fig. 9C). En cambio, solo 10 min de tratamiento con combinaciones de Ag⁺ y los antibióticos no podían causar la oxidación de Trx1. Al mismo tiempo, los niveles de proteína total de Trx1 no se vieron afectados después de un tratamiento de 10 min o 60 min con combinaciones de Ag⁺ y antibióticos. Estos resultados mostraron que cuando el sistema Trx es el objetivo, las combinaciones de plata y antibióticos no actuaban tan rápido como lo hacen la plata y el ebselen. Todos los resultados mostraron que las combinaciones de plata y antibióticos influían directamente en el sistema Trx.

40

La Ag⁺ y los antibióticos convencionales no podían alterar directamente el sistema de GSH bacteriano

45

También se demostró que la Ag⁺ 5 μM y el ebselen 80 μM en combinación agotaban el GSH después de 10 min de tratamiento. En ese estudio, solo las combinaciones de Ag⁺ 5 μM y gentamicina o kanamicina 80 μM podían reducir ligeramente la cantidad total de GSH en los extractos celulares en comparación con los propios antibióticos ($p < 0.05$) (Fig. 10A), mientras que otras combinaciones no mostraron diferencias (Fig. 10B) ($p > 0.05$). Se obtuvieron los mismos resultados cuando el tiempo de tratamiento se prolongó a 60 min (Figs. 11A y 11B). Además, la S-glutathionilación de proteínas se redujo en bacterias tratadas con Ag⁺ y ebselen en combinación, pero no en aquellas incubadas con combinaciones de Ag⁺ 5 μM y antibióticos durante tratamientos de 10 min (Fig. 10B) o 60 min (Fig. 11B).

50

55

Todos los resultados anteriores sugerían que la plata y los antibióticos convencionales no tenían efecto directo en el sistema de GSH bacteriano cuando actuaban contra bacterias Gram negativas. 4 de 9 antibióticos convencionales actuaban de forma sinérgica con la plata contra *E. coli*, una bacteria Gram negativa modelo (Tabla 9), lo que podría ocurrir a través de un direccionamiento directo de Trx y TrxR e induciendo la producción de ROS (Figs. 8A-8B y 9A-9C), pero no el contenido de GSH (Figs. 10A-10B y 11A-11B). El efecto sinérgico se desarrolla con la producción de especies reactivas de oxígeno.

60

3.2 Resultados frente a cinco patógenos Gram negativos MDR

65

Los cuatro antibióticos convencionales identificados en 3.1 se estudiaron adicionalmente en comparación con ebselen en combinación con plata. Utilizando cepas clínicamente aisladas de *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae* y *E. coli*, solo el ebselen 4 μM, de cinco antibióticos, redujo drásticamente la MIC de

la plata.

Los cinco patógenos Gram negativos MDR clínicamente aislados más difíciles de tratar eran muy sensibles solo a la Ag⁺ con ebselen en combinación

5

Hay cinco especies de patógenos Gram negativos MDR clínicamente los más difíciles de tratar: *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*. Se aisló una cepa de cada especie y los cultivos de toda la noche se diluyeron 1:1000 veces en medio LB, y se trataron con concentraciones seriadas de combinaciones de Ag⁺ y antibióticos durante 24 h (Tabla 10). Los resultados mostraron que la Ag⁺ y los antibióticos en combinación presentaban efectos antibacterianos débiles en estas bacterias Gram negativas MDR, mientras que la Ag⁺ y ebselen en combinación podría ser el único antibiótico eficaz contra una variedad de bacterias resistentes. Los resultados podrían explicarse por el hecho de que la plata y los antibióticos en combinación solo podían alterar directamente el sistema de Trx, pero no tanto el sistema de Trx como el de GSH.

10

15

Aunque la plata y 4 antibióticos diferentes en combinación podían inhibir directamente la Trx y TrxR, el efecto directo dirigido al sistema GSH no es universal. La presencia del sistema GSH-Grx en *E. coli* puede considerarse como un respaldo para el sistema de Trx. GSH/Grxs en *E. coli* participa en el proceso antioxidante por desglutacionilación y transferencia de electrones a la ribonucleótido reductasa. La plata y cuatro antibióticos convencionales en combinación no mostraron efectos en la cantidad de GSH, y las proteínas S-glutacioniladas no son muy diferentes de las del grupo de control (Fig. 10). Por lo tanto, esto podría explicar que las actividades contra las bacterias Gram negativas MDR de la plata y los antibióticos en combinación eran mucho más débiles que la combinación de plata y ebselen.

20

25

3.3 Materiales y métodos

Cepas bacterianas

30

Todos los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo con *Escherichia coli* (*E. coli*) DHB4, y cepas Gram negativas multirresistentes (MDR) aisladas clínicamente mostradas a continuación. Se obtuvieron cepas Gram negativas MDR aisladas clínicamente de pacientes clínicos en el Hospital Renmin de la Universidad de las Tres Gargantas en la provincia de Hubei, PRC, con todas las aprobaciones y consentimientos informados.

Cepas Gram negativas multirresistentes clínicamente aisladas utilizadas en este trabajo

Cepa	Descripción
KP-2	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumonia</i> 0322 [#]
AB-1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>A. baumannii</i>) H [#]
PA-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>) 1298 [#]
ECL-2	<i>E. cloacae</i> 2301 [#]
ECO-1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) 1139 [#]

35

Sensibilidad a fármacos de bacterias Gram negativas multirresistentes clínicamente aisladas

Antibiótico	KP-2	AB-1	PA-1	ECL-2	ECO-1
Amikacina	S	R	S	S	S
Ampicilina	R	R	R/S	/	S
Aztreonam	R	R	R	R	R
Cefazolina	R	R	R	/	R
Cefepima	R	R	R	R	R
Cefotaxima	R	R	R	R	R
Ceftazidima	R	R	R	R	R/S
Cloranfenicol	R	R	/	R	S
Ciprofloxacino	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	R	S	R	S
Imipenem	S	R	S	R	S
Levofloxacino	R	R	R	R	R
Meropenem	S	R	R	R	S
Piperacilina	R	R	R/S	R	R
Polimixina	/	S	S	S	/
Sulbactam	R	R	/	/	R/S
Sulfanilamida	R	/	R	R	R
Tazobactam	R	R	R/S	R	S
Tetraciclina	R	R	R	R	R

*R: resistente; S: sensible.

Antibióticos y productos químicos

Todos los experimentos se realizaron en medio Luria Bertani (LB) (EMD millipore), 2-fenil-1, 2-bencisoselenazol-3(2H)-ona (ebselen) (Daiichi), 9 antibióticos: ampicilina, carbenicilina, gentamicina, estreptomycin, geneticina, kanamicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, nitrato de plata (Sigma-Aldrich), metoxipolietilenglicol maleimida (MeO-PEG-Mal) (Sigma-Aldrich), yodoacetamida (IAM) (Sigma-Aldrich), cócteles inhibidores de proteasas (Roche), N-acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich), ensayo de proteínas DC™ (Bio-RAD), TrxR de *E. coli* DHB4, el anticuerpo de oveja anti-Trx1 de *E. coli* eran de IMCO Corp. (Estocolmo, Suiza; <http://www.imcocorp.se>), anti-IgG de oveja-HRP de conejo (Santa cruz), anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a para complejos glutatión-proteína (VIROGEN), gel Bolt Bis-Tris al 4-12% (VWR), todos los demás reactivos eran de Sigma-Aldrich.

Antibióticos utilizados en el estudio con sus dosis y objetivos principales

Antibióticos	Abreviatura	Dosis (μM) usada	Objetivo principal
Ampicilina	Amp	0/1/2/4	Formación de la pared celular
Carbenicilina	Car	0/1/2/4	Formación de la pared celular
Cloranfenicol	Chl	0/1/2/4	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 50S
Eritromicina	Ery	0/1/2/4	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 50S
Gentamicina	Gent	0/1/2/4/80	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S
Geneticina	Gen	0/1/2/4/80	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S
Kanamicina	Kan	0/1/2/4/80	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S
Estreptomycin	Str	0/1/2/4	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S
Tetraciclina	Tet	0/1/2/4/80	Síntesis de proteínas, subunidad ribosomal 30S

Efecto antibacteriano sinérgico de combinaciones de plata y antibióticos en el crecimiento de *E. coli* DHB4

Se cultivaron *E. coli* DHB4 de cepas congeladas durante la noche a 37°C, 400 rpm. El cultivo de la noche se diluyó 1:100 con 5 ml de medio LB en tubos de 15 ml y se incubaron a 37°C a 400 rpm. Las células se cultivaron hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se usaron para el tratamiento con antibióticos. Brevemente, las células se diluyeron 1:1000 en 100 μl de medio LB en microplacas de 96 pocillos. Se añadieron diluciones seriadas de antibióticos 100 μl (0, 1, 2, 4 μM) y nitrato de plata (AgNO₃, 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μM) a los pocillos individuales. La concentración inhibitoria mínima (MIC) se determinó como la concentración más baja de fármacos que inhibía 90% del crecimiento en comparación con las células no tratadas después de 24 h de cultivo a 37°C. Los cultivos tratados con las mismas diluciones seriadas de 100 μl de ebselen y nitrato de plata se usaron como control positivo.

Cuantificación de la sinergia de ebselen y plata utilizando el modelo de Bliss

La sinergia de fármacos se determinó utilizando el modelo de independencia de Bliss, que calcula un grado de sinergia utilizando la siguiente fórmula: $S = (f_{X0}/f_{00})(f_{0Y}/f_{00}) - (f_{XY}/f_{00})$, donde f_{XY} se refiere a la tasa de crecimiento de tipo natural en presencia de los fármacos combinados en una concentración X, para uno de los fármacos, e Y para el otro; f_{X0} y f_{0Y} se refieren a las tasas de crecimiento de tipo natural en presencia de los fármacos individuales a una concentración de X e Y, respectivamente; f_{00} se refiere a la tasa de crecimiento de tipo natural en ausencia de fármacos; y S corresponde al grado de sinergia, un parámetro que determina una interacción sinérgica para valores positivos y una interacción antagónica para valores negativos. Las tasas de crecimiento en diferentes momentos se determinan calculando la pendiente de la curva de crecimiento o muerte que se analiza¹⁸.

Medición de la producción de ROS

Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con combinaciones de plata y antibióticos durante 10 min. Para analizar la cantidad de producción de ROS en las bacterias, las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se tiñeron con H₂DCF-DA 5 μM durante 20 min. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en PBS, y la producción de ROS se cuantificó por citometría de flujo (CyAn adp, Beckman coulter).

Medición de la producción de H₂O₂

Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con plata y antibióticos en combinación durante 10 min. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se sonicaron durante 10 s. En presencia del reactivo Amplex® Red 50 μM , HRP 0.1 U/ml en tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, muestras de 50 μl se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz y se detectaron con absorbancia a 560 nm (Molecular Probes, Eugene, OR).

ES 2 930 900 T3

Medición de actividades de Trx/TrxR y cantidad de GSH en lisados de células de *E. coli* tratadas con antibióticos y plata

5 Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con antibióticos 80 µM y AgNO₃ 5 µM durante 10 min y 60 min, respectivamente. Los cultivos tratados con ebselen 80 µM y AgNO₃ 5 µM se usaron como control positivo. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS, luego las células se resuspendieron en tampón de lisis (Tris·HCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato de sodio 20 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 al 0.5%) que contenía un cóctel inhibidor de proteasas y se lisaron por sonicación. Los lisados celulares se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min y las concentraciones de proteínas se midieron mediante el ensayo de proteínas de Lowry.

15 La actividad de TrxR de *E. coli* DHB4 en extractos celulares se midió mediante un ensayo de actividad de reducción de DTNB²³. Los experimentos se realizaron con microplacas de 96 pocillos en la solución que contenía Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 µM, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM, en presencia de Trx1 de *E. coli* 5 µM. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min con un lector de microplacas de pocillos VERSA y se utilizó la pendiente de los 2 min iniciales para representar la actividad de TrxR. La actividad Trx se detectó mediante este método combinado con TrxR de *E. coli* 100 nM en lugar de Trx de *E. coli* 5 µM en la mezcla de reacción. Para medir los niveles de GSH, se añadieron 25 µg de los lisados celulares en la solución que contenía GR 50 nM, Tris·HCl 50 mM (pH 7.5), NADPH 200 µM, EDTA 1 mM, DTNB 1 mM. Se midió la absorbancia a 412 nm durante 5 min.

Estado redox de Trx1 en *E. coli* tratada con plata y antibióticos en combinación

25 Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con antibióticos 80 µM y AgNO₃ 5 µM durante 10 min y 60 min, respectivamente. Los cultivos tratados con ebselen 80 µM y AgNO₃ 5 µM se usaron como control positivo. Se llevó a cabo la transferencia Western para detectar el estado redox de Trx1 de las células de *E. coli* tratadas. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y se lavaron minuciosamente 3 veces con PBS y se hizo precipitar la proteína con TCA al 5% en 1.0 ml. Los precipitados se lavaron 3 veces con 1 ml de acetona previamente enfriada con hielo y se disolvieron en Tris·HCl 50 mM (pH 8.5) con SDS al 0.5% que contenía MeO-PEG-Mal 15 mM a 37°C durante 2 h. Las proteínas se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min para eliminar los sedimentos y la concentración de proteínas se midió mediante el ensayo de proteínas de Lowry. Las muestras se incubaron con SDS-tampón de carga a 90°C durante 10 min y, a continuación, se separaron en el gel Bolt Bis-Tris al 4-12% con tampón de análisis MES (150 V, 40 min). El estado redox de Trx1 se detectó con anticuerpo anti-Trx1 de *E. coli* de oveja en dilución 1:1000, seguida de la detección con el reactivo Chemiluminescence Reagent Plus.

40 S-Glutationilación de proteínas en *E. coli* tratada con plata y antibióticos en combinaciones

45 La S-glutationilación total de proteínas de las células de *E. coli* tratadas con antibióticos y AgNO₃ en combinaciones también se detectó mediante transferencia Western. Las células de *E. coli* DHB4 se cultivaron hasta una absorbancia a OD_{600 nm} de 0.4 en medio LB, y las células bacterianas se trataron con antibióticos 80 µM y AgNO₃ 5 µM durante 10 min y 60 min, respectivamente. Los cultivos tratados con ebselen 80 µM y AgNO₃ 5 µM se usaron como control positivo. Las células se lavaron 3 veces, y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris·HCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, NaF 20 mM, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato de sodio 20 mM, pirofosfato de sodio 10 mM, Triton X-100 al 0.5 %, cóctel inhibidor de proteasas) que contenía IAM 50 mM. Después de lisado por sonicación, los lisados celulares se obtuvieron por centrifugación a 13 000 rpm durante 20 min. La concentración de proteínas se midió mediante el ensayo de proteína de Lowry y el ensayo de transferencia Western se realizó como se describe anteriormente con anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a (VIROGEN, 101-A/D8) para complejos S-glutación-proteína.

55 Efectos antibacterianos de los antibióticos y la plata en el crecimiento de bacterias Gram negativas multirresistentes clínicas aisladas

60 Cinco cepas Gram negativas MDR clínicas aisladas se cultivaron hasta una OD_{600 nm} de 0.4 y se diluyeron 1:1000 en 100 µl de medio LB en microplacas de 96 pocillos. Se añadieron a los pocillos individuales diluciones seriadas de 100 µl de antibióticos (0, 1, 2, 4 µM) y AgNO₃ (0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 µM) en combinaciones. La MIC se determinó después de 16 h de cultivo a 37°C. Los cultivos tratados con las mismas diluciones seriadas de 100 µl de ebselen y nitrato de plata se usaron como control positivo.

Análisis estadístico

65 Se calcularon la media, desviación estándar (SD) y los niveles de significación de la prueba t (dos colas, no pareados) en el software Grap Pad Prism. *: p<0.05, **: p< 0.01, ***: p<0.001.

Tabla 1. MIC de la plata (μM) en presencia de ebselen frente a diferentes especies Gram negativas multirresistentes

Ebselen (μM)	MIC de la plata (μM) en presencia de ebselen frente a diferentes especies Gram negativas multirresistentes										Otros	
	KP-1	KP-2	AB-1	AB-2	PA-1	PA-2	ECL-1	ECL-2	ECO-1	ECO-2	ECO-3	ECO-4
0	80	80	80	80	80	80	80	80	40	80	40	40
1	80	40	80	80	80	80	40	40	20	80	40	20
2	40	20	40	40	20	40	20	40	10	40	20	10
4	10	20	10	20	20	20	20	10	5	10	10	5

KP-1: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) subsp. *pneumoniae* 13#; KP-2: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 0322#; AB-1: *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) H#; AB-2: *A. baumannii* 0361#; PA-1: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 1298#; PA-2: *P. aeruginosa* 0009#; ECL-1: *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) 0431#; ECL-2: *E. cloacae* 2301#; ECO-1: *Escherichia coli* (*E. coli*) 1139#; ECO-2: *E. coli* 2219#; ECO-3: *E. coli* ZY-1; ECO-4: MG1655 (ATCC 700926).

Tabla 2. Cepas Gram negativas multirresistentes clínicas aisladas

Cepa	Descripción
KP-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (<i>K. pneumoniae</i>) subsp. <i>pneumoniae</i> 13#
KP-2	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> 0322#
AB-1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (<i>A. baumannii</i>) H#
AB-2	<i>A. baumannii</i> 0361#
PA-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>) 1298#
PA-2	<i>P. aeruginosa</i> 0009#
ECL-1	<i>Enterobacter cloacae</i> (<i>E. cloacae</i>) 0431#
ECL-2	<i>E. cloacae</i> 2301#
ECO-1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) 1139#
ECO-2	<i>E. coli</i> 2219#
WZ11	<i>E. coli</i> ZY-1
MG1655	ATCC 700926

Tabla 3. Sensibilidad a fármacos de cepas Gram negativas multirresistentes clínicas aisladas

Antibióticos	KP-1	KP-2	AB-1	AB-2	PA-1	PA-2	ECL-1	ECL-2	ECO-1	ECO-2	ECO-3
Amikacina	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R/S	R	/	/	S	R	S
Aztreonam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Cefazolina	R	R	R	R	R	R	/	/	R	R	S
Cefepima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Cefotaxima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Ceftazidima	R	R	R	R	R	R	R	R	R/S	R	S
Cloranfenicol	R	R	R	R	/	R	R	R	S	S	S
Ciprofloxacino	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S
Imipenem	R	S	R	R	S	/	S	R	S	S	S
Levofloxacino	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	/
Meropenem	R	S	R	R	R	R/S	S	R	S	S	S
Piperacilina	R	R	R	R	R/S	R	R	R	R	R	S
Polimixina	/	/	S	S	S	S	R	S	/	/	/
Sulbactam	R	R	R	/	/	/	/	/	R/S	R	S
Sulfanilamida	S	R	/	S	R	R	R	R	R	R	R
Tazobactam	R	R	R	R	R/S	R	S	R	S	R/S	S
Tetraciclina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

*R: resistente; S: sensible

Tabla 4. MIC de la plata (μM) en presencia de ebselen frente a mutantes de *E. coli* DHB4

Ebselen (μM)	MIC de la plata (μM) en presencia de ebselen frente a mutantes redox de <i>Escherichia coli</i> DHB4										
	WT	<i>trxA</i> ⁻	<i>trxB</i> ⁻	<i>trxC</i> ⁻	<i>trxA</i> ⁻ <i>B</i> ⁻	<i>oxyR</i> ⁻	<i>gshA</i> ⁻	<i>trxA</i> ⁻ <i>gshA</i> ⁻	<i>gor</i> ⁻	<i>gor</i> <i>grrA</i> ⁻ <i>B</i> ⁻ <i>C</i> ⁻	<i>grrA</i> ⁻ <i>trxA</i> ⁻
0											
1	40	40	40	40	40	20	20	20	40	20	20
2	10	10	10	10	10	5	5	5	10	10	10
4	5	2.5	2.5	5	2.5	1.25	2.5	2.5	5	2.5	2.5
	1.25	1.25	0.625	1.25	1.25	0.625	0.625	0.625	1.25	0.625	0.625

Tabla 5. MIC de ebselen (μM) en presencia de plata frente a mutantes de *E. coli* DHB4

Plata (μM)	MIC de ebselen (μM) en presencia de esbelen frente a mutantes redox de <i>Escherichia coli</i> DHB4										
	WT	<i>trxA</i> ⁻	<i>trxB</i> ⁻	<i>trxC</i> ⁻	<i>trxA</i> ⁻ <i>B</i> ⁻ <i>C</i> ⁻	<i>oxyR</i> ⁻	<i>gshA</i> ⁻	<i>trxA</i> ⁻ <i>gshA</i> ⁻	<i>gor</i> ⁻	<i>gor</i> ⁻ <i>grxA</i> ⁻ <i>C</i> ⁻	<i>grxA</i> ⁻ <i>B</i> ⁻ <i>trxA</i> ⁻
0	80	80	80	80	80	40	40	40	80	40	40
0.625	8	8	8	8	8	4	4	4	8	8	8
1.25	4	4	2	4	4	2	2	2	4	2	2
2.5	4	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2
5	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5
20	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0	0	0.5	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 6. Fenotipos redox de *Escherichia coli* DHB4

Cepa	Genotipo
<i>Tipo natural</i>	DHB4 (F' <i>lac-pro locI^Q</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araDI39</i> Δ <i>lacX74 galE galK rpsL phoR</i> Δ (<i>phoA</i>)PvuII Δ <i>malF3 thi</i>)
<i>trxA</i> ⁻	DHB4 Δ <i>trxA</i>
<i>trxB</i> ⁻	DHB4 <i>trxB::Kan</i>
<i>trxC</i> ⁻	DHB4 Δ <i>trxC</i>
<i>trxA</i> ⁻ <i>trxB</i> ⁻ <i>trxC</i> ⁻	DHB4 Δ <i>trxA</i> Δ <i>trxC</i> <i>trxB::Kan nadB::Tn</i>
<i>oxyR</i> ⁻	DHB4 <i>oxyR::Kan</i>
<i>gshA</i> ⁻	DHB4 <i>gshA20::Kan</i>
<i>trxA</i> ⁻ <i>gshA</i> ⁻	DHB4 Δ <i>trxA</i> <i>gshA20::Kan</i>
<i>gor</i> ⁻	DHB4 <i>gor522...mini-Tn10Tc</i>
<i>gor</i> ⁻ <i>grxA</i> ⁻ <i>B</i> ⁻ <i>C</i> ⁻	DHB4 <i>gor522grxA::Kan grxB::Kan mini-Tn10Tc grxC::Cm</i>
<i>grxA</i> ⁻ <i>trxA</i> ⁻	DHB4 Δ <i>trxA</i> <i>grxA::Kan</i>

Tabla 7. Sensibilidad al fármaco de *E. coli* ZY-1 aislada clínica

Antibiótico	ZY-1
Amikacina	S
Ampicilina	S
Aztreonam	S
Cefazolina	S
Cefepima	S
Cefotaxima	S
Ceftazidima	S
Cloranfenicol	S
Ciprofloxacino	S
Gentamicina	S
Imipenem	S
Levofloxacino	S
Meropenem	S
Piperacilina	S
Polimixina	/
Sulbactam	S
Sulfanilamida	R
Tazobactam	S
Tetraciclina	R

Tabla 8. Análisis de muestras de sangre de ratones tratados con o sin plata y ebselen

	Vehículo				Ebselen + Ag				PBS					
	6 h		24 h		6 h		24 h		6 h		24 h		48 h	
ALT (U/l)	32.7±9.3	24.0±3.6	25.33±4.0	79.0±41.0	31.7±6.4	25.8±5.62	28.7±6.4	25.3±7.2	28.7±6.4	25.3±7.2	28.7±6.4	25.3±7.2	28.7±6.4	28.3±17.0
AST (U/l)	130.7±46.6	108.0±5.0	106.67±38.1	300.7±15	145.3 ±28.6	102.5±53.4	113.3±6.0	110.3±23.5	113.3±6.0	110.3±23.5	113.3±6.0	110.3±23.5	113.3±6.0	88.7±7.0
BUN (mmol/l)	5.3±1.14	5.9±0.93	6.74±2.0	6.0±0.71	6.53±0.8	5.74±0.5	4.6±0.8	7.2±0.6	4.6±0.8	7.2±0.6	4.6±0.8	7.2±0.6	4.6±0.8	5.8±1.5
CRE (μmol/l)	29.3±2.52	37.7±1.53	29.7±2.08	23.0±1.7	39.0±2.6	30.0±5.5	23.0±3.5	26.7±2.3	23.0±3.5	26.7±2.3	23.0±3.5	26.7±2.3	23.0±3.5	28.3±5.9
TBIL (μmol/l)	0.10±0.17	0	0	0.43±0.40	0	0	0.40±0.5	0	0.40±0.5	0	0	0	0	0
GB (10 ⁹ /l)	3.29	2.52	3.50	4.36	3.27	2.21	3.12	3.13	3.12	3.13	2.21	3.13	3.12	2.38
Neu# (10 ⁹ /l)	1.46	0.69	0.84	2.69	1.20	0.52	0.82	0.90	0.82	0.90	0.52	0.90	0.82	0.55
Lym# (10 ⁹ /l)	1.72	1.72	2.57	0.07	2.39	1.57	2.2	1.98	2.2	1.98	1.57	1.98	2.2	1.78
Mon# (10 ⁹ /l)	0.07	0.05	0.03	1.57	0.05	0.01	0.02	0.06	0.05	0.06	0.01	0.06	0.02	0.04
Eos# (10 ⁹ /l)	0.02	0.06	0.06	0.03	0.07	0.01	0.08	0.18	0.07	0.18	0.01	0.18	0.08	0.01
Bas# (10 ⁹ /l)	0.02	0	0	0	0.01	0	0	0.01	0.01	0	0	0.01	0	0
IMG# (10 ⁹ /l)	0	0	0.01	0.02	0.01	0	0	0.04	0.01	0.04	0	0.04	0	0
Neu% (%)	44.3	27.3	24.1	61.7	32.2	23.5	26.3	28.7	26.3	28.7	23.5	28.7	26.3	23.3
Lym% (%)	52.3	68.4	73.3	1.6	64.5	75.3	70.4	63.4	70.4	63.4	75.3	63.4	70.4	74.5
Mon% (%)	2	2	0.9	35.9	1.3	0.5	0.6	1.9	0.6	1.9	0.5	1.9	0.6	1.7
Eos% (%)	0.7	2.2	1.7	0.7	1.8	0.5	2.6	5.7	1.8	5.7	0.5	5.7	2.6	0.4
Bas% (%)	0.7	0.1	0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1	0.1
IMG% (%)	0	0.1	0.2	0.3	0.3	0.1	0	1.4	0.3	1.4	0.1	1.4	0	0
PLT (10 ⁹ /l)	574	912	956	566	602	744	605	187	602	187	744	187	605	928
MPV (fl)	7.7	6.7	6.5	7.3	7.1	6.1	7.0	7.9	7.1	7.9	6.1	7.9	7.0	6.1
PDW	14.8	14.8	14.7	14.9	15	14.7	15	15.4	15	15.4	14.7	15.4	15	14.6
PCT (%)	0.442	0.613	0.62	0.413	0.428	0.456	0.422	0.147	0.422	0.147	0.456	0.147	0.422	0.566
P-LCC (10 ⁹ /l)	76	72	65	66	61	39	62	37	61	37	66	37	62	48
P-LCR (%)	13.2	7.9	6.8	11.7	10.1	5.3	10.3	19.7	10.1	19.7	5.3	19.7	10.3	5.1
RBC (10 ¹² /l)	9.26	8.56	8.35	7.95	7.25	8.21	8.31	8.91	7.25	8.91	8.21	8.91	8.31	7.79
HGB (g/l)	145	129	127	124	112	130	133	141	112	141	130	141	133	122
HCT (%)	48.7	43.3	42	41.8	38	44.8	44.6	46.6	38	46.6	44.8	46.6	44.6	41.2
MCV (fl)	52.7	50.6	50.3	52.5	52.4	54.5	53.7	52.3	52.4	54.5	54.5	52.3	53.7	52.8
MCH (pg)	15.77	15.1	15.2	15.6	15.5	15.9	16.0	15.8	15.5	16.0	15.9	15.8	16.0	15.6
MCHC (g/l)	297	299	301	298	296	291	297	302	296	297	291	302	297	296
RDW-CV (%)	18.1	18.2	18.1	20.2	16.3	21.6	17.8	21.2	16.3	21.6	21.6	21.2	17.8	18.1
RDW-SD (fl)	33.2	31.9	32.0	36.7	29.5	41.1	33.3	38.7	29.5	33.3	41.1	38.7	33.3	33.5

*ALT: alanina transaminasa; AST: aspartato aminotransferasa; BUN: nitrógeno ureico en sangre; CRE: Creatinina; TBIL: bilirrubina total; WBC: recuento de glóbulos blancos; Neu: neutrófilo; Lym: linfocito; Mon: monocitos; Eos: eosinófilo; Bas: basófilo; IMG: inmunoglobulina; PLT: plaquetas; MPV: volumen plaquetario medio; PDW: ancho de distribución de plaquetas; PCT: plaquetocrito; P-LCC: recuento de plaquetas grandes; P-LCR: proporción de plaquetas grandes; RBC: recuento de glóbulos rojos; HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; MCV: volumen corpuscular medio; MCH: hemoglobina corpuscular media; MCHC: concentración media de hemoglobina corpuscular; RDW-CV: coeficiente de variación del ancho de la distribución de glóbulos rojos; RDW-SD: desviación estándar del ancho de distribución de glóbulos rojos. Los datos son medias ± s.d. de tres experimentos independientes.

Tabla 9. Efecto antibacteriano como MIC de nueve antibióticos y plata en *E. coli* DHB4 de tipo natural

Plata (µM)	Beta-lactamas			Aminoglucósidos			Tetraciclina		Macrólidos		Síntesis		Control
	Amp	Car	Genta	Strep	Gene	Kana	Tetra	Ery	Chlor	Ebse			
0	40	40	40	/	40	40	40	40	40	40	40	40	Ebse
1	40	40	20	/	40	20	20	40	40	40	40	40	10
2	40	40	2.5	/	10	2.5	10	40	40	40	40	40	5
4	40	40	1.25	40	2.5	1.25	1.25	40	40	40	40	40	1.25

Ampicilina: Amp; Carbenicilina: Car; Gentamicina: Genta; Estreptomina: Strep; Geneticina: Gene; Kanamicina: Kana;
Tetraciclina: Tetra; Eritromicina: Ery; Cloranfenicol: Chlo; Ebse: Ebse. Estreptomina: 4+40, 8+40, 16+40, sin efecto
sinérgico.

Tabla 10. MIC de plata (μM) en presencia de diferentes antibióticos contra bacterias Gram negativas MDR

Antibióticos (4 μM)	Cepas Gram negativas multirresistentes				
	KP-2	AB-1	PA-1	ECL-2	ECO-1
Genta	160	80	40	160	40
Kana	160	80	80	160	40
Gene	160	80	80	160	40
Tetra	160	80	80	160	80
Ebse	40	10	20	10	5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antibiótica, en donde la composición antibiótica comprende un agente que contiene plata y un agente de organoselenio, en donde el agente que contiene plata comprende un ion de plata y en donde el agente de organoselenio comprende un ebselen.
2. La composición antibiótica de la reivindicación 1, en donde el agente que contiene plata comprende nitrato de plata o dihidrogenocitrato de plata.
- 10 3. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición antibiótica está en una forma farmacéutica líquida, preferiblemente en una forma farmacéutica de una solución o suspensión.
- 15 4. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde una concentración del agente que contiene plata en la composición antibiótica es de 0.5 a 50 μM , de 1 a 25 μM , o de 1 a 10 μM , preferiblemente 5 μM .
- 20 5. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde una concentración del agente de organoselenio en la composición antibiótica es de 4 a 25 μM , de 30 a 200 μM , de 30 a 150 μM o de 30 a 100 μM , preferiblemente de 40 μM o de 80 μM .
- 25 6. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde el agente que contiene plata y el agente de organoselenio están presentes en una relación molar de 1:2 a 1:20, preferiblemente 1:4, 1:8 o 1:16.
- 30 7. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición antibiótica presenta un valor de IC_{50} de 10-100 nM, preferiblemente 50 nM o inferior, para una o más bacterias Gram negativas, preferiblemente en donde la una o más bacterias Gram negativas comprenden *K. pneumonia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas.
- 35 8. La composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente, en donde la composición antibiótica comprende AgNO_3 y ebselen, preferiblemente AgNO_3 5 μM y ebselen 4 μM en una forma farmacéutica líquida, o AgNO_3 5 μM y ebselen 20 μM en una forma farmacéutica líquida, o AgNO_3 5 μM y ebselen 40 μM en una forma farmacéutica líquida, o AgNO_3 5 μM y ebselen 80 μM en una forma farmacéutica líquida.
- 40 9. Una formulación farmacéutica que comprende la composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente.
10. Un método no terapéutico para inhibir o matar una o más bacterias en una superficie, que comprende poner en contacto la composición antibiótica de cualquier reivindicación precedente con una o más bacterias.
- 45 11. La composición antibiótica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar en un método de tratamiento de una infección bacteriana, preferiblemente en un mamífero (p. ej., en un ser humano), comprendiendo dicho método poner en contacto la composición antibiótica con la infección bacteriana.
- 50 12. El método no terapéutico de la reivindicación 10 o la composición antibiótica para usar según la reivindicación 11, en donde la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas, preferiblemente en donde la una o más bacterias comprenden una o más bacterias Gram negativas multirresistentes, p. ej., en donde la una o más bacterias comprenden *K. pneumonia*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. coli* o cualquier combinación de las mismas.
- 55 13. La composición antibiótica para usar según la reivindicación 11 o reivindicación 12, en donde la composición antibiótica está en una sola dosis unitaria.
14. El método no terapéutico de la reivindicación 10 o reivindicación 12, o la composición antibiótica para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde la cantidad del agente de organoselenio en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias es de 10 a 100 mg, 10 a 50 mg o 20 a 30 mg por dosis, preferiblemente 25 mg por dosis.
- 60 15. El método no terapéutico de la reivindicación 10, 12 o 14, o la composición antibiótica para usar según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde una cantidad de plata en contacto con la infección bacteriana o una o más bacterias es de 1 a 20 mg, 1 a 10 mg, o 5 a 7 mg por dosis, preferiblemente 6 mg por dosis.

FIG. 1A

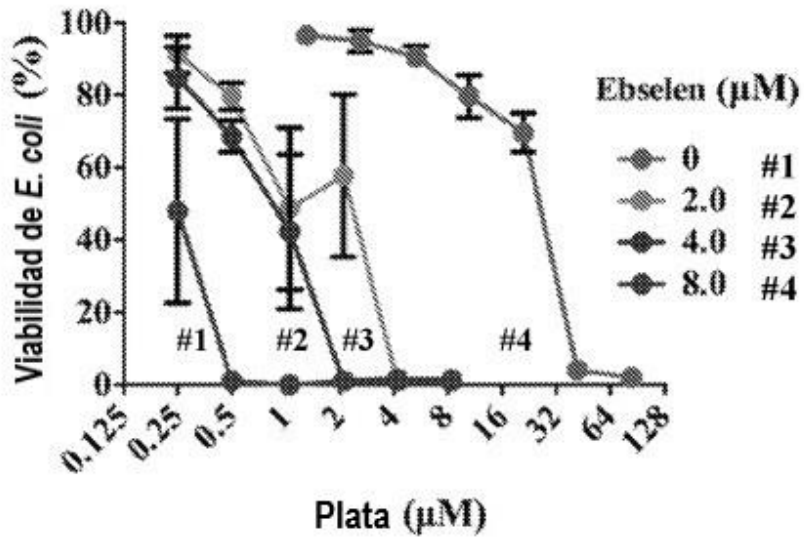


FIG. 1B

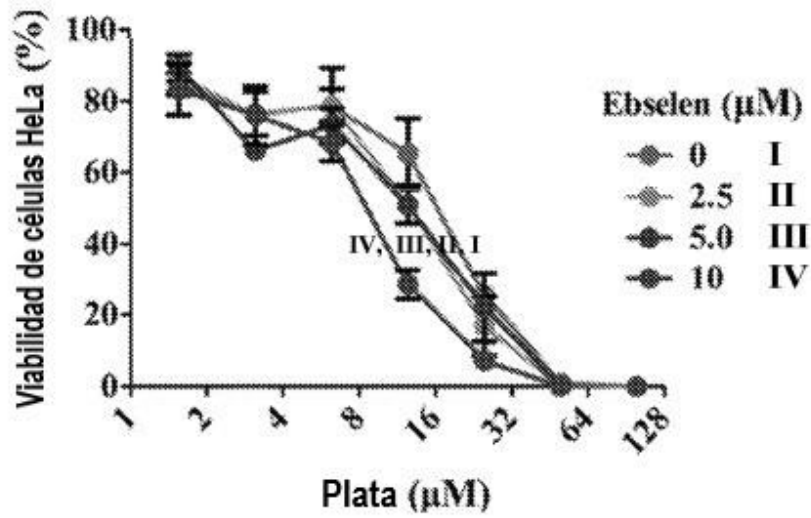


FIG. 1C

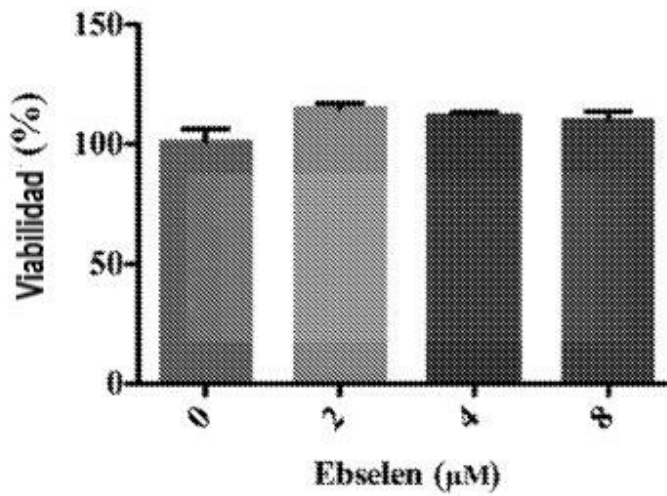


FIG. 2A

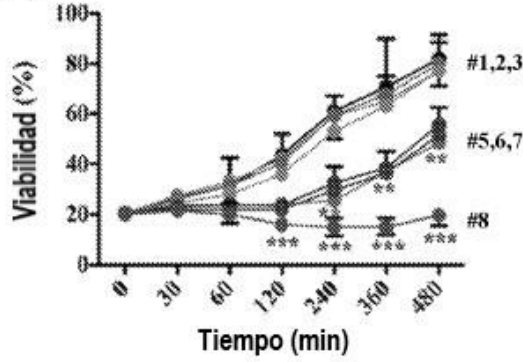


FIG. 2B

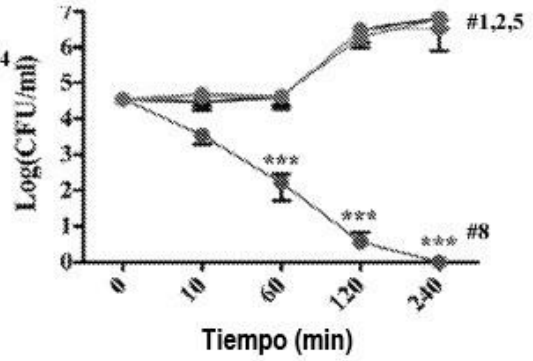


FIG. 2C

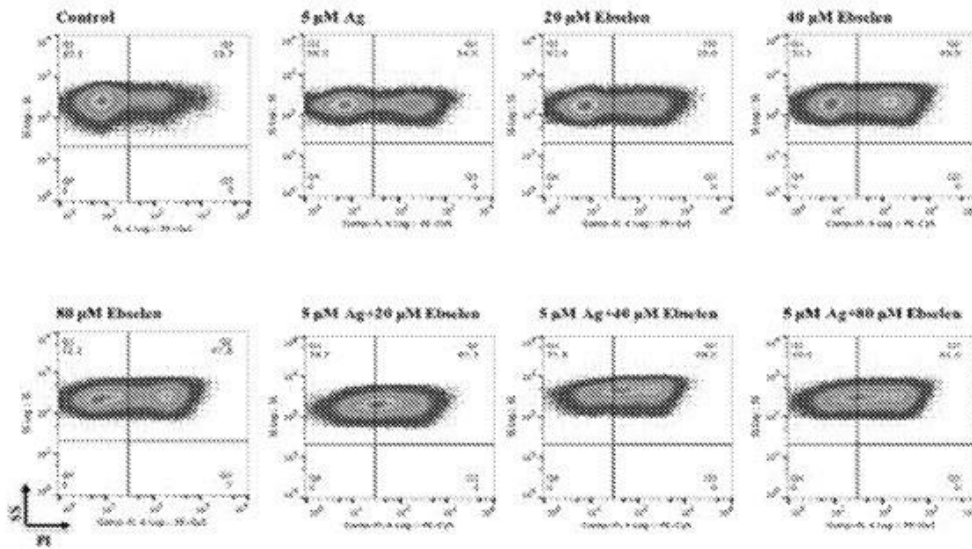


FIG. 2D

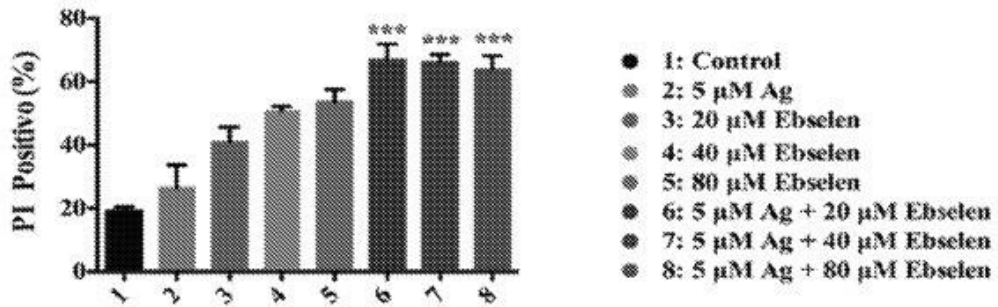


FIG. 3A

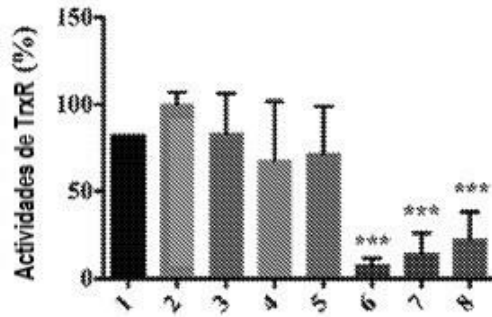


FIG. 3B

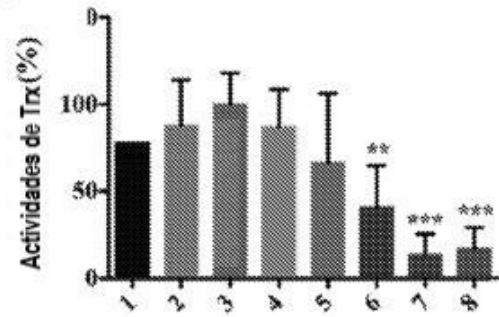


FIG. 3C

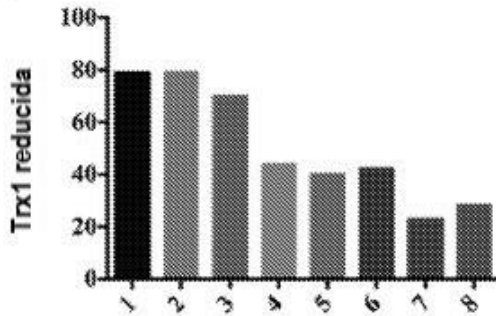


FIG. 3E

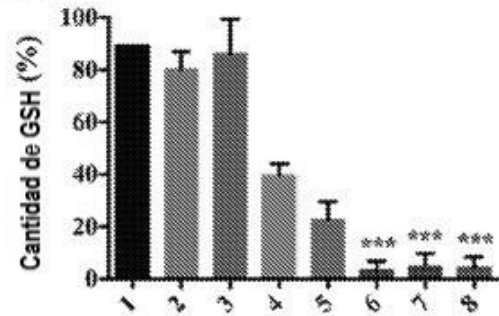


FIG. 3D

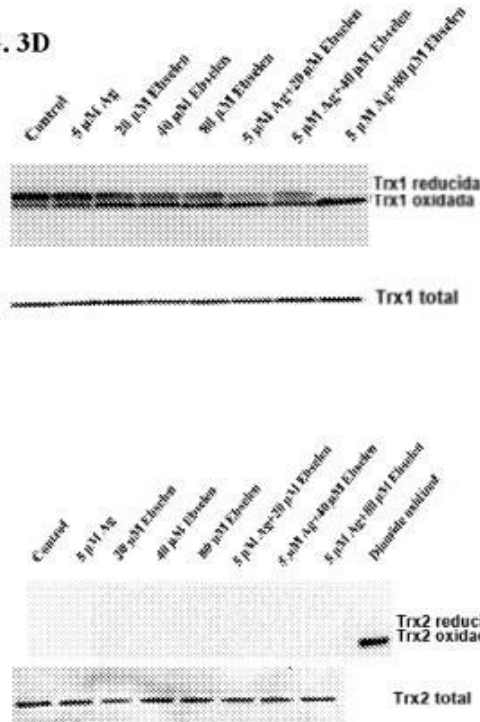


FIG. 3F

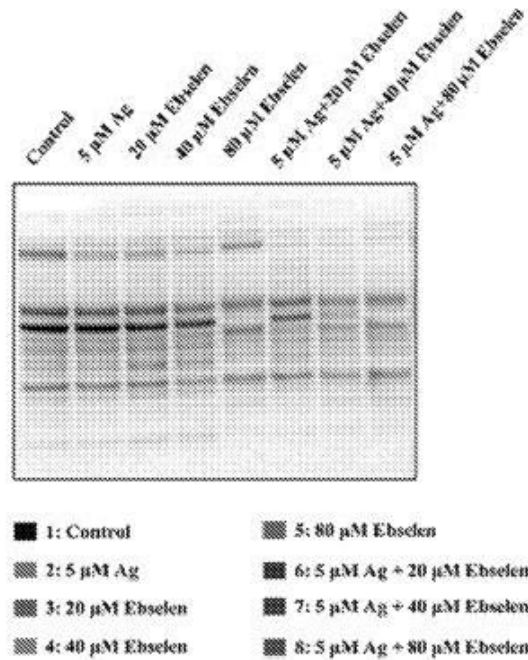


FIG. 4A

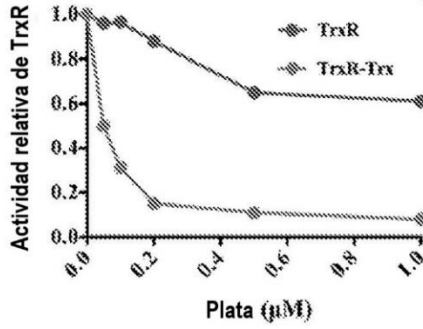


FIG. 4B

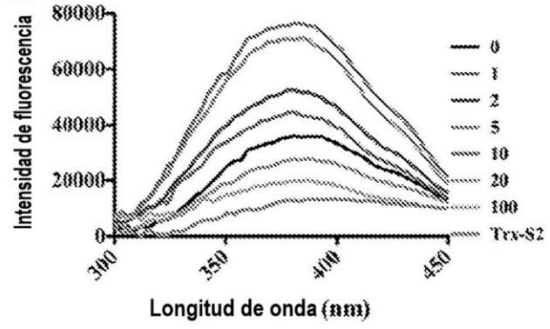


FIG. 4C

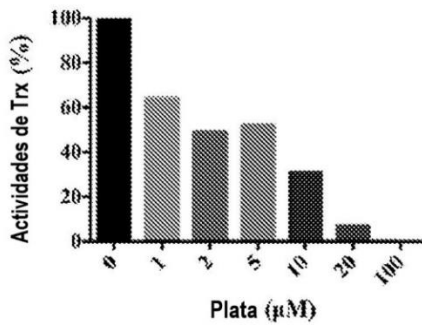


FIG. 4D

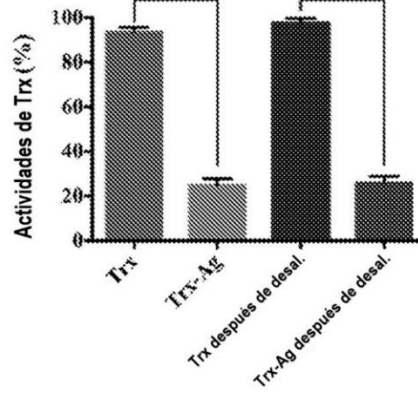


FIG. 5A

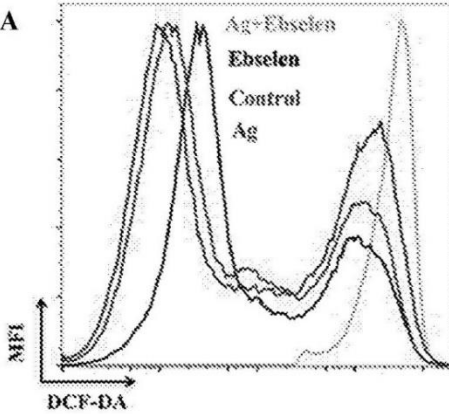


FIG. 5B

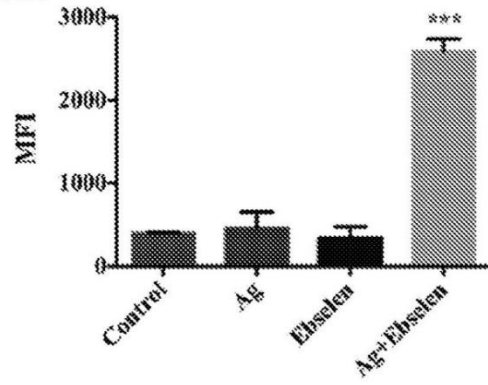


FIG. 5C

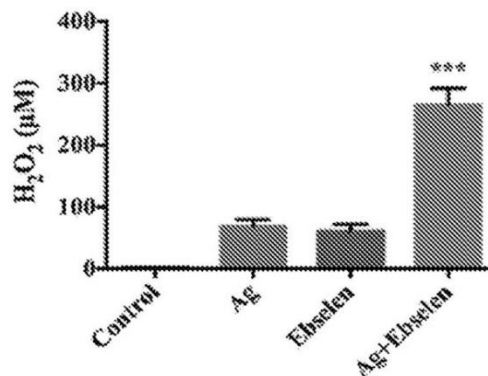


FIG. 6A

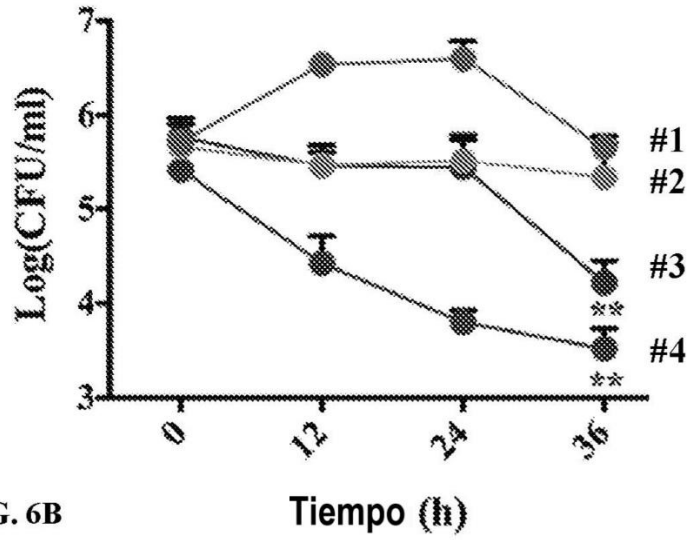
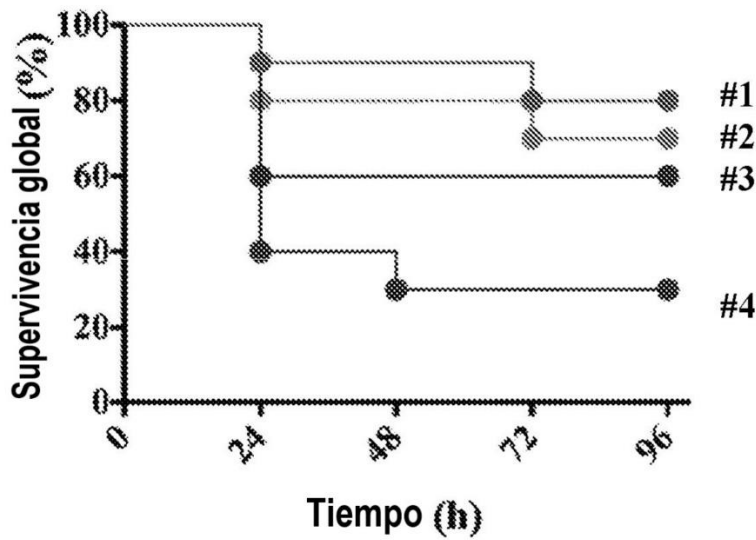


FIG. 6B



- #1 ● Control
- #2 ● Ebselen (25 mg/Kg de peso corporal)
- #3 ● AgNO₃ (6 mg/Kg de peso corporal)
- #4 ● AgNO₃ + Ebselen (6+25 mg/Kg de peso corporal)

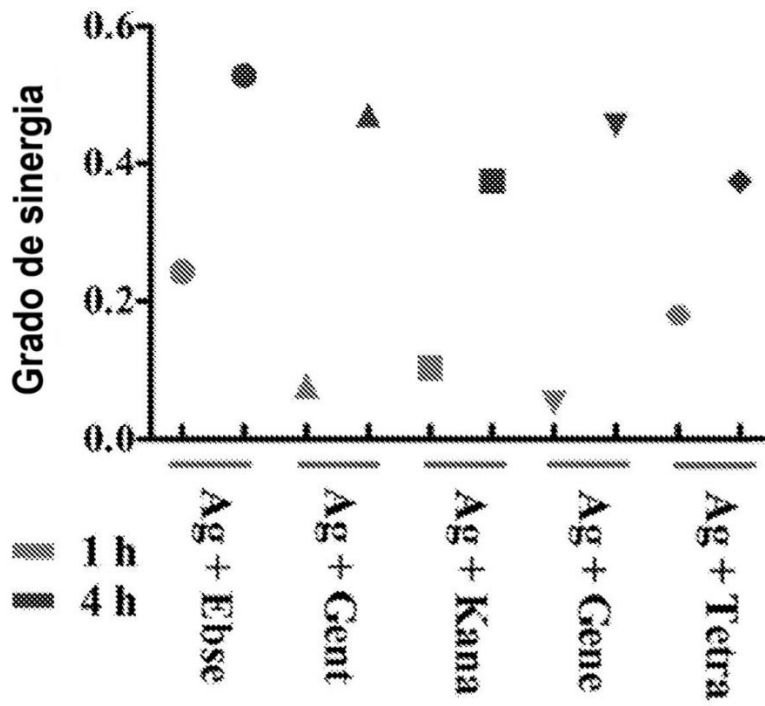


FIG. 7

FIG. 8A

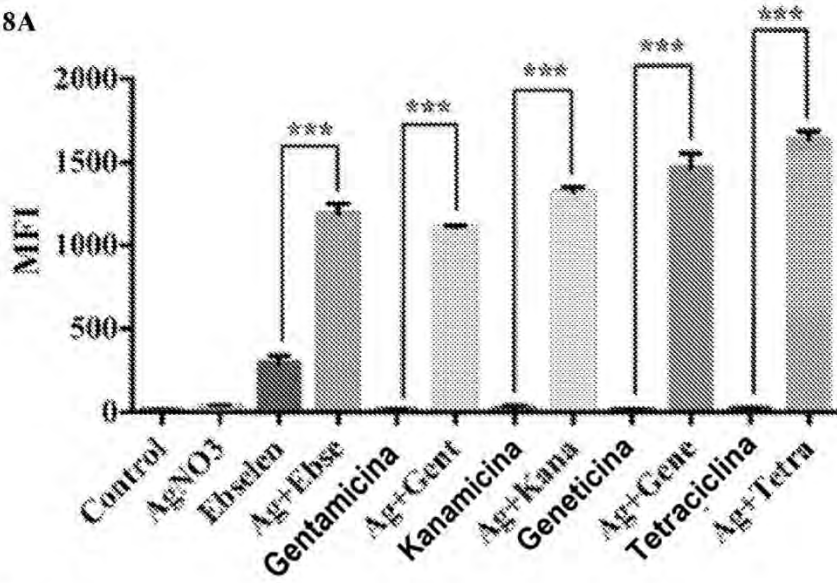


FIG. 8B

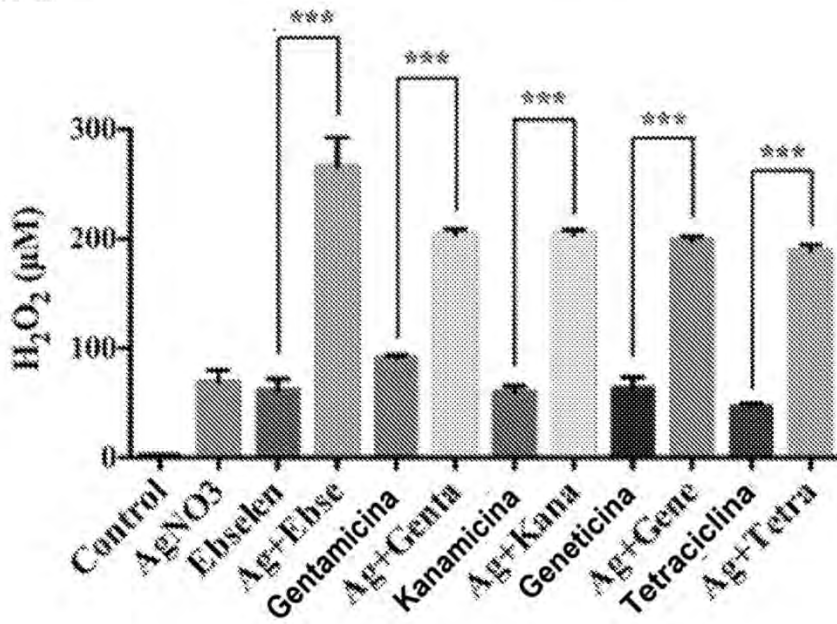


FIG. 9A

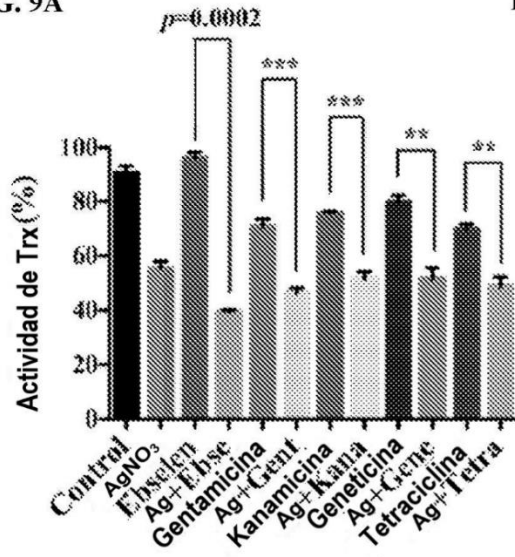


FIG. 9B

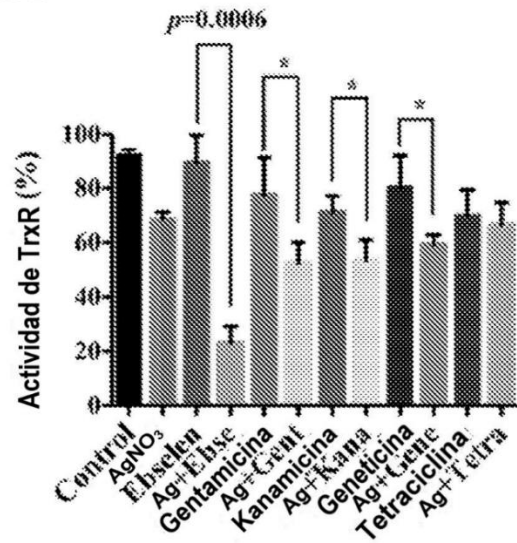


FIG. 9C

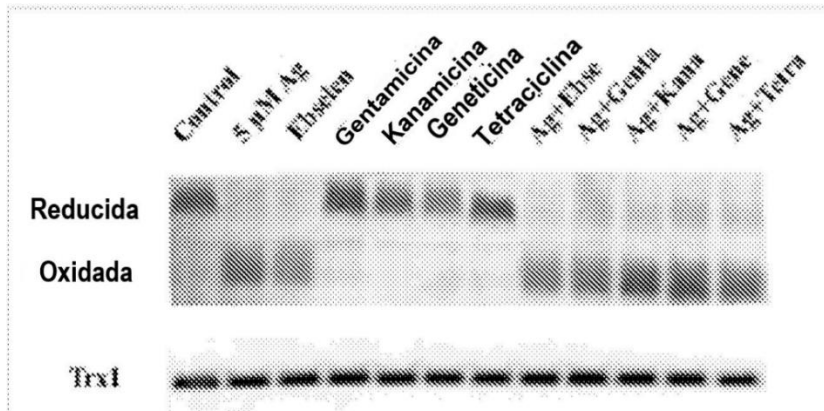


FIG. 10A

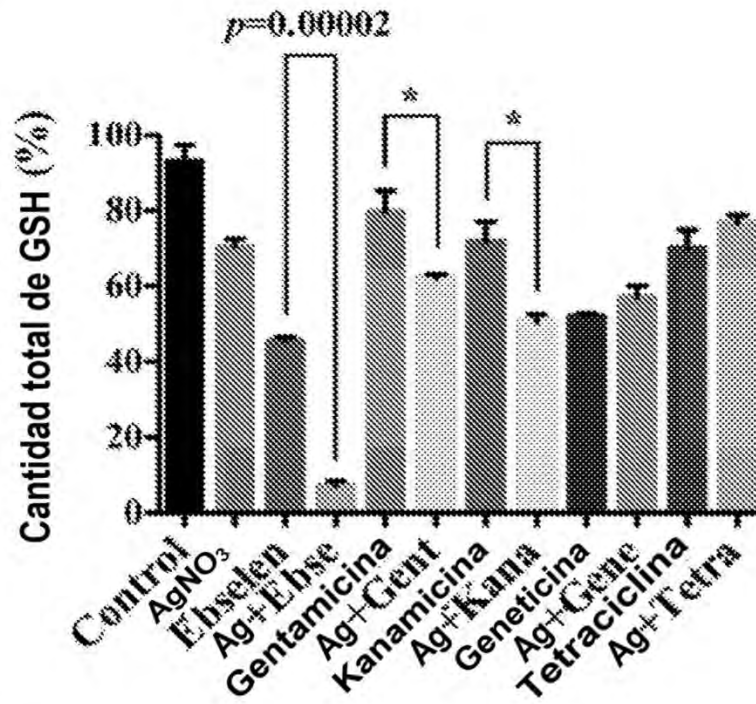


FIG. 10B

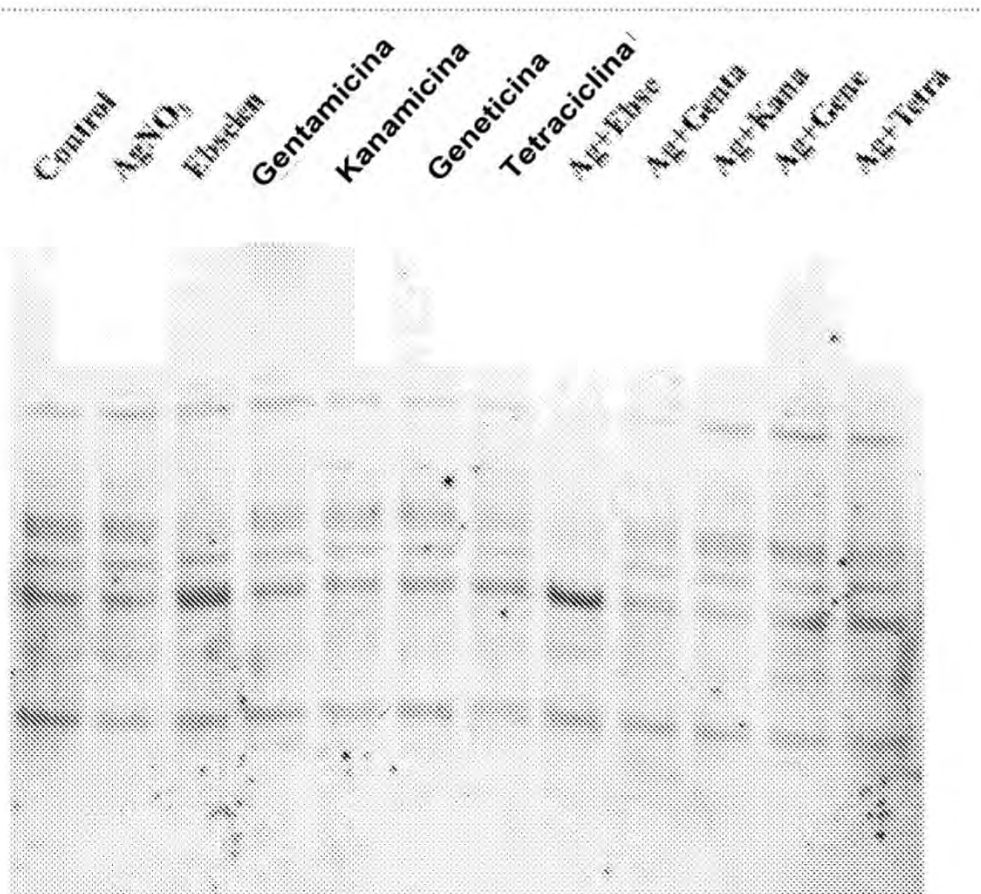


FIG. 11A

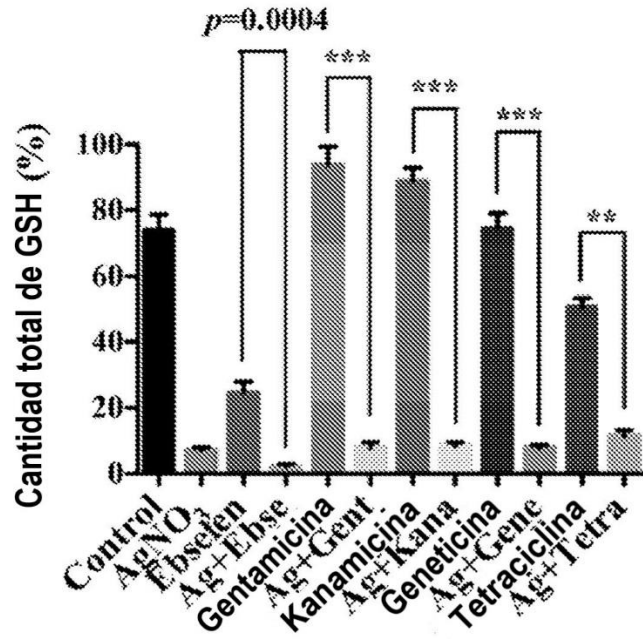


FIG. 11B

