

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 479**

51 Int. Cl.:

A61K 31/74 (2006.01)

A61P 31/02 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07870011 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2114395**

54 Título: **Composiciones oftálmicas y óticas de polímeros y oligómeros facialmente anfífilos y sus usos**

30 Prioridad:

29.12.2006 US 882800 P

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

22.06.2015

73 Titular/es:

**CELLCEUTIX CORPORATION (100.0%)
100 Cumming Center, Suite 151-B
Beverly, Massachusetts 01915, US**

72 Inventor/es:

SCOTT, RICHARD W.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 538 479 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 oftálmicas y óticas de polímeros y oligómeros facialmente anfífilos y sus usos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones antimicrobianas de polímeros y oligómeros antimicrobianos facialmente anfífilos, útiles para el tratamiento o prevención de infecciones oftálmicas y óticas. La presente invención también se refiere a métodos de uso de las composiciones para tratar y/o prevenir infecciones oftálmicas y óticas.

Antecedentes de la invención

10 La resistencia bacteriana a fármacos es un problema de salud actual importante en todo el mundo. La multiresistencia se está viendo normalmente en una serie de patógenos humanos (véase, p. ej., Hiramatsu et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, 40, 311-313 y Montecalvo et al., *Antimicro. Agents Chemother.*, 1994, 38, 1363-1367), y la incidencia de infecciones hospitalarias resistentes a fármacos está creciendo a una velocidad rápida. Por ejemplo, en algunos hospitales de EE.UU., patógenos intrahospitalarios, como las especies *E. faecium* y *Acinetobacter*, han adquirido determinantes de multiresistencia y son prácticamente intratables con los agentes antimicrobianos actuales. La resistencia bacteriana ahora ha alcanzado proporciones de epidemia y se ha atribuido a una variedad de abusos de tratamientos con antibióticos, incluyendo el uso excesivo (Monroe et al., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2000, 3, 496-501), administración inadecuada a niveles inferiores a los terapéuticos (Guillemot et al., *JAMA*, 1998, 279, 365-370), y al uso indebido de antimicrobianos como promotores del crecimiento en alimentos para animales (Lathers, *J. Clin. Pharmacol.*, 2002, 42, 587-600). Además, la amenaza del bioterrorismo ha proporciona un impulso adicional al desarrollo de nuevas clases de antibióticos, en particular de aquellos contra los que sea difícil desarrollar cepas bacterianas resistentes.

15 La comunidad científica farmacéutica está respondiendo a este reto centrándose en el desarrollo de nuevos fármacos antibióticos. Sin embargo, la mayor parte de este trabajo se dirige a la síntesis de análogos de fármacos conocidos, tales como cefalosporinas y quinolonas, que aunque son potencialmente útiles para un tiempo corto, encontrarán también inevitablemente resistencia bacteriana y se convertirán en ineficaces. Por lo tanto, fármacos antimicrobianos terapéuticamente eficaces que actuaran por nuevos mecanismos proporcionarían un beneficio económico así como para la salud humana.

20 Se ha desarrollado una serie de miméticos no peptídicos de los péptidos antimicrobianos naturales que son polímeros, oligómeros y moléculas pequeñas compuestos de unidades estructurales no naturales. Véase, Tew et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, 99, 5110-5116; Arnt et al., *J. Polym. Sci., Part A*, 2004, 42, 3860-3864; y Liu et al., *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2004, 43, 1158-1162. Muchos de estos compuestos son significativamente más pequeños y más fáciles de preparar que los péptidos y miméticos de péptidos antimicrobianos naturales, teniendo el más corto de estos oligómeros pesos moleculares típicos de fármacos de tipo molécula pequeña. Tienen el mismo mecanismo de acción que la magainina, son muy potentes y tienen un amplio espectro de actividad, matando patógenos Gram positivos, Gram negativos y resistentes a antibióticos. Con respecto a los péptidos antimicrobianos, los miméticos no peptídicos son significativamente menos tóxicos hacia los eritrocitos humanos, mucho más baratos de preparar y más estables.

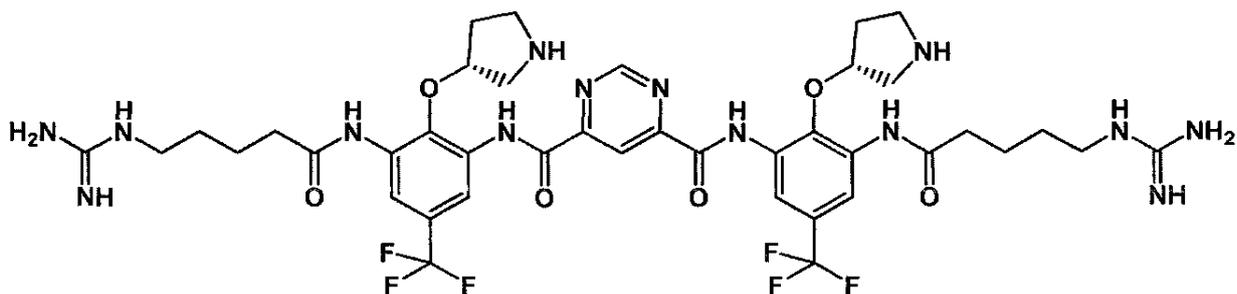
Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas de EE.UU. n° US 2006-0041023 A1, US 2004-0202639 A1, US 2005-0287108 A1, y US 2006-0024264 A1, y patente de EE.UU. n° 7.173.102.

30 Hay una gran necesidad de composiciones mejoradas y métodos de tratamiento basados en el uso de antimicrobianos que sean más eficaces que los agentes existentes contra patógenos oftálmicos y óticos clave, y tengan menos tendencia al desarrollo de resistencia por estos patógenos. En particular, hay una gran necesidad de composiciones eficaces y métodos para el tratamiento de infecciones óticas, en especial infecciones bacterianas. El uso de antibacterianos orales para tratar infecciones óticas en niños ha limitado la eficacia y crea un grave riesgo de resistencia de los patógenos al agente antibacteriano administrado por vía oral.

35 Por lo tanto, siguen siendo necesarias composiciones antimicrobianas oftálmicas y óticas mejores, en particular, agentes antimicrobianos de amplio espectro, útiles para el tratamiento de infecciones oftálmicas y óticas que tienen tendencia al desarrollo de resistencia por los patógenos oftálmicos y óticos, y que sean eficaces en el tratamiento de patógenos oftálmicos y óticos que ya han desarrollado resistencia a agentes antimicrobianos existentes.

Resumen de la invención

50 La presente invención proporciona composiciones oftálmicas u óticas que comprenden un compuesto que tiene la fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se dirige también a una composición oftálmica u ótica que está en forma de un líquido o sólido, o que está en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un gel o una pomada.

- 5 La presente invención se dirige también a una composición oftálmica u ótica, que además comprende un conservante, un estabilizante, un antioxidante, un agente quelante o un tensioactivo.

La presente invención se dirige también a una composición oftálmica u ótica, que además comprende un medicamento adicional. El medicamento adicional se elige de un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente anestésico, un agente antialérgico, un agente bloqueante de acetilcolina, un agonista adrenérgico, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente antiglaucoma y un agente antihipertensivo.

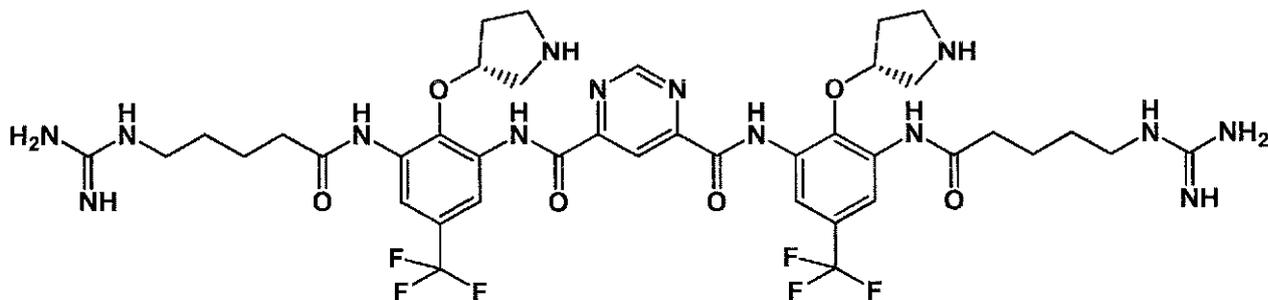
El antibiótico se puede seleccionar de un aminoglucósido, una cefalosporina, una diaminopiridina, una fluoroquinolona, una sulfonamida y una tetraciclina. El antibiótico se selecciona en particular de amikacina, azitromicina, cefixima, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, colistina, domeclociclina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, mafenida, metaciclina, minociclina, neomicina, norfloxacin, ofloxacin, oxitetraciclina, polimixina B, pirimetamina, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfisoxazol, tetraciclina, tobramicina y trimetoprim.

El agente antiinflamatorio puede ser un agente esteroideo, en particular seleccionado de dexametasona, rimexolona, prednisolona, fluorometolona, e hidrocortisona.

El agente antiinflamatorio puede ser un agente no esteroideo, en particular seleccionado de un inhibidor de la ciclooxigenasa de tipo I o tipo II, un antagonista de PAF, un inhibidor de PDE IV, y un inhibidor de la producción de citoquinas. El inhibidor de la ciclooxigenasa de tipo I o tipo II se puede seleccionar de diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco, suprofen, nepafenaco, amfenaco, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, bromfenaco, ketoprofeno, meclofenamato, piroxicam, sulindaco, ácido mefanámico, diflusal, oxaprozina, tolmetina, fenoprofeno, benoxaprofeno, nabumetona, etodolaco, fenilbutazona, aspirina, oxifenbutazona, tenoxicam, carprofeno, Vioxx, celecoxib y etodolaco. El antagonista de PAF se selecciona preferiblemente de apafant, bepafant, minopafant, nupafant y modipafant. El inhibidor de PDE IV se selecciona preferiblemente de ariflo, torbaflina, rolipram, filaminast, piclamilast, cipamfilina y roflumilast.

El agente antialérgico es preferiblemente pemirolast u olopatadina o un corticosteroide. El corticosteroide se selecciona preferiblemente de prednisolona, fluorometolona, loteprenol y dexametasona.

- 30 La invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



La invención también se ocupa de una composición oftálmica u ótica, o un compuesto como se ha definido antes, para usar en el tratamiento de una infección bacteriana en un mamífero.

Descripción de realizaciones

En otros aspectos de la presente invención, se proporciona el oligómero en las composiciones oftálmicas u óticas en forma de una sal aceptable (por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable) para tratar infecciones microbianas. Se pueden proporcionar sales de oligómeros para uso farmacéutico, o como un producto intermedio en la preparación de la forma farmacéutica deseada del oligómero. Una sal del oligómero que se considera que es aceptable es la sal de adición de ácido clorhídrico. Puesto que uno o más de los oligómeros descritos pueden ser poliiónicos, tales como una poliamina, la sal de oligómero aceptable se puede proporcionar en forma de un poli(hidrocloruro de amina). Los ejemplos de otras sales aceptables incluyen, pero no se limitan a las que tienen cationes sodio, potasio o amonio, y/o las que tienen aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato, bisulfato, mesilato, esilato, napsidilato, tosilato, besilato, ortofosfato, acetato, gluconato, glutamato, lactato, malonato, fumarato, tartrato, maleato o trifluoroacetato. En algunas realizaciones, las sales aceptables son las que tienen aniones mesilato, cloruro, sulfato, esilato, napsidilato, tosilato, besilato, fosfato, ortofosfato, acetato, gluconato, glutamato, lactato, malonato, citrato, fumarato, tartrato, maleato o trifluoroacetato. En otras realizaciones, las sales aceptables incluyen cloruro sódico, cloruro potásico, tiosulfato sódico, bisulfato sódico y sulfato amónico.

En algunos aspectos de la invención, el oligómero descrito (tal como los polímeros y/u oligómeros de fórmulas I, II, IIa, IV, IVa, IVb, IVc, V, Va, y VI) son derivados denominados profármacos. El término "profármaco" indica un derivado de un fármaco de acción directa conocido, cuyo derivado tiene características potenciadas de suministro y valor terapéutico, comparados con el fármaco, y se transforma en el fármaco activo por un procedimiento enzimático o químico.

El oligómero usado en las composiciones oftálmicas de la presente invención, se puede preparar como se describe en las siguientes patentes y publicaciones de patentes: solicitudes de patente publicadas de EE.UU. 2006-0041023 A1, US 2004-0202639 A1, US 2005-0287108 A1, y US 2006-0024264 A1, así como la patente de EE.UU. nº 7.173.102. Oligómero.

También se presentan ejemplos del diseño, síntesis y ensayos de oligómeros de arilamida en Tew et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 5110-5114 y en la publicación WIPO nº WO 2004/082634.

Los oligómeros se pueden sintetizar por procedimientos sintéticos en fase sólida bien conocidos para el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Tew et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 5110-5114; Barany et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1987, 30, 705-739; *Solid-phase Synthesis: A Practical Guide*, Kates, S.A., y Albericio, F., eds., Marcel Dekker, New York (2000); y Dörwald, F.Z., *Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions*, 2ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (2002).

Se puede ensayar la actividad antimicrobiana de las composiciones oftálmicas u óticas por métodos conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, se describen ensayos antimicrobianos adecuados para ensayar la actividad antimicrobiana de composiciones oftálmicas u óticas de la invención, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº US 2006-0041023 A1; Tew et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 5110-5114; y Liu et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 2001, 123, 7553-7559.

Composiciones

Las composiciones oftálmicas y óticas de la presente invención pueden tener forma de un líquido o sólido, incluyendo p. ej., pero no limitado a una solución, una suspensión, una emulsión, un gel, una pomada o un artículo sólido que se puede insertar en un sitio adecuado en el ojo.

En algunas realizaciones, una composición de la presente invención está en forma de un líquido en el que el agente activo (es decir, uno de los polímeros u oligómeros facialmente anfífilos descritos en la presente memoria) está presente en solución, en suspensión, como una emulsión o como una "solución/suspensión". La expresión "solución/suspensión" como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición líquida en la que una primera parte del agente activo está presente en solución y una segunda parte del agente activo está presente en forma de partículas, en suspensión en una matriz líquida. En algunas realizaciones, la composición líquida está en forma de un gel. En otras realizaciones, la composición líquida es acuosa. En otras realizaciones, la composición está en forma de una pomada.

En otras realizaciones más, la composición está en forma de un artículo sólido. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición oftálmica es un artículo sólido que se puede insertar en un sitio adecuado en el ojo, tal como entre el ojo y el párpado o en el saco conjuntival, donde libera el agente activo, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 3.863.633; patente de EE.UU. nº 3.867.519; patente de EE.UU. nº 3.868.445; patente de EE.UU. nº 3.960.150; patente de EE.UU. nº 3.963.025; patente de EE.UU. nº 4.186.184; patente de EE.UU. nº 4.303.637; patente de EE.UU. nº 5.443.505; y patente de EE.UU. nº 5.869.079. La liberación desde dicho artículo normalmente es a la córnea, por el líquido lagrimal que baña la superficie de la córnea, o directamente a la propia córnea, con la que el artículo sólido en general está en íntimo contacto. Los artículos sólidos para implantar en el ojo de esta forma, en general están compuestos principalmente de polímeros y pueden ser bioerosionables o no bioerosionables. Los polímeros bioerosionables que se pueden usar en la preparación de implantes oculares que

llevan uno o más de los agentes activos oligómeros facialmente anfífilos, antimicrobianos, de acuerdo con la presente invención, incluyen, pero no se limitan a poliésteres alifáticos tales como polímeros y copolímeros de poliglicólido, polilactida, poli(epsilon-caprolactona), polihidroxibutirato y polihidroxicaprolactona, poliaminoácidos, poliortoésteres, polianhídridos, policarbonatos alifáticos y poliésteres de lactonas. Los polímeros no bioerosionables adecuados incluyen elastómeros de silicona.

El oligómero típicamente está presente en la composición oftálmica u ótica en una "cantidad eficaz" o "concentración eficaz". Las expresiones una "cantidad eficaz", "concentración eficaz", o "cantidad que es eficaz" como se usan en la presente memoria en referencia a un oligómero en una composición de la presente invención, se refieren a la cantidad del oligómero suficiente para tratar o prevenir una infección oftálmica en un ojo de un animal, o para tratar o prevenir una infección ótica en un oído de un animal.

La "cantidad eficaz" o concentración del oligómero en la composición variará y depende, entre otros factores, del oligómero facialmente anfífilo (agente activo) particular que se administra (p. ej., de la actividad antimicrobiana relativa del oligómero específico); el modo de administración; el tiempo de permanencia determinado para la formulación particular del oligómero; la especie, edad y peso corporal del sujeto; el uso previsto de la composición (p. ej., tratamiento de infecciones existentes o prevención de infecciones postquirúrgicas); la afección particular para la que se busca el tratamiento o profilaxis; y la gravedad de la afección.

La actividad de los antimicrobianos en general se expresa como la concentración mínima de un compuesto (agente activo) necesaria para inhibir el crecimiento de un patógeno específico. Esta concentración se denomina también la "concentración mínima inhibidora" o "CMI". El término "CMI₉₀" se refiere a la concentración mínima de un agente activo antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento del noventa por ciento (90%) de los aislados ensayados para un organismo particular. La concentración de un compuesto necesaria para matar totalmente una especie bacteriana específica se denomina la "concentración mínima bactericida" o "CMB".

La "cantidad eficaz" o concentración del oligómero en las composiciones de la invención, en general será una cantidad suficiente para proporcionar una concentración sobre o en el ojo afectado o tejido del oído igual o mayor que el nivel de CMI₉₀ para el oligómero seleccionado, con respecto a los microbios normalmente asociados con la infección. Por lo tanto, la "cantidad eficaz" o concentración del oligómero en la composición oftálmica u ótica, en general será una cantidad del oligómero suficiente para proporcionar una concentración sobre o en el o los tejidos del ojo o del oído igual o mayor que el nivel de CMI₉₀ para el oligómero, con respecto a los microbios normalmente asociados con la infección oftálmica u ótica.

Así, por ejemplo, en las composiciones oftálmicas y óticas de la presente invención, una concentración eficaz del oligómero antimicrobiano en la composición en general será de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 20% en peso (es decir, % en peso) de la composición. Más típicamente, será de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 10% en peso, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 8,0% en peso, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5,0% en peso, de aproximadamente 1,0% a aproximadamente 5,0% en peso, o de aproximadamente 2,0% a aproximadamente 4,0% de la composición. Por ejemplo, en composiciones oftálmicas en forma de suspensiones sólidas, tales como pomadas, una concentración eficaz del oligómero antimicrobiano será en general de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso (% en peso).

Las composiciones oftálmicas y óticas de la invención preferiblemente son estériles y tienen propiedades físicas (p. ej., osmolalidad y pH) que son especialmente adecuadas para la aplicación a tejidos oftálmicos u óticos, incluyendo tejidos que han sido afectados como resultado de una enfermedad preexistente, traumatismo, cirugía u otras afecciones físicas. Por ejemplo, las composiciones acuosas de la invención típicamente tendrán un pH en el intervalo de 4,5 a 8,0, más preferiblemente, de 6,0 a 8,0, o de 6,5 a 8,0, o de 7,0 a 8,0.

Además de uno o más de los polímeros u oligómeros descritos en la presente memoria, las composiciones oftálmicas u óticas de la invención también pueden comprender uno o más excipientes oftálmica y óticamente aceptables.

La expresión "oftálmicamente aceptable" como se usa en la presente memoria significa que no tiene efecto perjudicial persistente en el ojo tratado o en su funcionamiento, o en la salud general del sujeto que se va a tratar. Sin embargo, se reconocerá que los efectos transitorios tales como irritación menor o una sensación de "pícor" son comunes con la administración oftálmica tópica de fármacos y la existencia de dichos efectos transitorios no es discordante con la composición, formulación o ingrediente en cuestión (p. ej., excipiente) que es "oftálmicamente aceptable" como se define en la presente memoria. Sin embargo, las composiciones, formulaciones y excipientes oftálmicamente aceptables preferidos son los que no producen un efecto perjudicial sustancial, ni siquiera de naturaleza transitoria.

Igualmente, la expresión "óticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, significa que no tiene efecto perjudicial persistente en el oído tratado o en su funcionamiento, o en la salud general del sujeto que se trata. Las composiciones, formulaciones y excipientes óticamente aceptables preferidos son los que no producen un efecto perjudicial sustancial, ni siquiera de naturaleza transitoria.

Los excipientes oftálmica y óticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a agentes potenciadores de la

viscosidad, conservantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes de tamponamiento, agentes lubricantes, sales oftálmica u óticamente aceptables, y combinaciones de los mismos.

5 Por ejemplo, las composiciones oftálmicas acuosas de la presente invención, cuando están en forma de suspensión o solución, preferiblemente son viscosas o mucoadhesivas, o tanto viscosas como mucoadhesivas, y por lo tanto comprenden un agente potenciador de la viscosidad. Los ejemplos de agentes potenciadores de la viscosidad adecuados incluyen, pero no se limitan a glicerina, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, y/o diferentes agentes gelificantes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente potenciador de la viscosidad se selecciona de metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, poli(alcohol vinílico) y glicerol. Dichos agentes en general se usan en las 10 composiciones de la invención en una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 3% en peso.

Por lo tanto, para composiciones oftálmicas de la presente invención, en algunas realizaciones, el excipiente oftálmicamente aceptable es un agente potenciador de la viscosidad o un promotor de mucoadhesión, tal como carboximetilcelulosa. En algunas realizaciones, la concentración de carboximetilcelulosa en la suspensión o solución acuosa es de 0,1 a 5% en peso o de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2,5% en peso. La 15 carboximetilcelulosa está preferiblemente en forma de carboximetilcelulosa sódica sustituida en un grado en el que el contenido de carboximetilcelulosa sódica es de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%.

En otras realizaciones, la composición oftálmica es una composición acuosa gelificable en el sitio, más preferiblemente, una solución acuosa gelificable en el sitio. Dicha composición comprende un agente gelificante en una concentración eficaz para promover la gelificación por contacto con el ojo o con el líquido lagrimal en el exterior 20 del ojo, permitiendo que la composición permanezca en el ojo durante un periodo prolongado sin pérdida por el drenaje lagrimal. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, de forma no restrictiva, polímeros termoendurecibles tales como etilendiamina tetrasustituida con copolímeros de bloques de óxido de etileno y óxido de propileno (p. ej., poloxamina 1307); policarbófilo; y polisacáridos tales como goma gellan, carragenano (p. ej., kappa-carragenano y iota-carragenano), chitosán y gomas de alginato.

25 La frase "gelificable en el sitio" como se usa en la presente memoria debe entenderse que abarca no solo líquidos de baja viscosidad que forman geles tras el contacto con el ojo o con el líquido lagrimal en el exterior del ojo, sino también líquidos más viscosos tales como geles semifluidos y tixotrópicos que presentan viscosidad o rigidez del gel sustancialmente aumentada tras la administración en el ojo.

Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, la composición oftálmica es una solución, 30 suspensión o solución/suspensión acuosa gelificable en el sitio, que comprende de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 6,5%, preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 4,5%, en peso, basado en el peso total de la composición, de uno o más polímeros que contienen carboxilo reticulados de forma más ligera como agentes gelificantes. Un agente gelificante preferido en esta realización es el policarbófilo. En otras realizaciones, la composición es una solución, suspensión o solución/suspensión acuosa gelificable en el sitio, 35 preferiblemente una solución que comprende de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2% en peso de un polisacárido que gelifica cuando se pone en contacto con un medio acuoso que tiene la fuerza iónica del líquido lagrimal. Un polisacárido preferido es la goma gellan, más preferiblemente una goma gellan clarificada de bajo contenido de acetilo como la vendida con la marca registrada Gelrite[®]. Se describen gomas gellan parcialmente desaciladas adecuadas en la patente de EE.UU. n° 5.190.927.

40 En otras realizaciones más, la composición es una solución, suspensión o solución/suspensión acuosa gelificable en el sitio, que comprende de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 3%, preferiblemente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1%, en peso de un polisacárido gelificante, preferiblemente seleccionado de goma gellan, goma de alginato y chitosán, y de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de un polímero formador de película soluble en agua, preferiblemente seleccionado de alquilcelulosas (p. ej., metilcelulosa, etilcelulosa), 45 hidroxialquilcelulosas (p. ej., hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa), ácido hialurónico y sus sales, sulfato de condroitina y sus sales, polímeros de acrilamida, ácido acrílico y policianoacrilatos, polímeros de metacrilato de metilo y metacrilato de 2-hidroxietilo, povidex, ciclodextrinas, povidex, maltodextrina, dextrano, povidex, gelatina, colágeno, gomas naturales (p. ej., gomas de xantano, de algarrobilla, arábica, de tragacanto y carragenano y agar), derivados de poli(ácido galacturónico) (p. ej., pectina), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y polietilenglicol. La composición puede contener opcionalmente un contraíon promotor de gel tal como calcio en forma 50 latente, por ejemplo encapsulado en gelatina.

En otras realizaciones más, la composición es una solución, suspensión o solución/suspensión acuosa gelificable en el sitio que comprende de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% de una goma de carragenano, p. ej., una 55 goma de carragenano que no tiene más de 2 grupos sulfato por unidad de disacárido que se repite, tal como por ejemplo, el kappa-carragenano, que tiene 18-25% en peso de éster sulfato, el iota-carragenano, que tiene 25-34% en peso de éster sulfato y sus mezclas.

En otras realizaciones más, la composición comprende un polímero bioerosionable sustancialmente como se describe en la patente de EE.UU. n° 3.914.402.

En algunas realizaciones, la composición comprende un polímero mucoadhesivo oftálmicamente aceptable, seleccionado, por ejemplo, de hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carbomer (polímero de ácido acrílico), poli(metacrilato de metilo), poliacrilamida, policarbófilo, poli(óxido de etileno), copolímero de ácido acrílico/acrilato de butilo, alginato sódico y dextrano.

- 5 Las composiciones oftálmicas de la invención incorporan preferiblemente medios para inhibir el crecimiento microbiano, por ejemplo mediante la preparación y envasado en condiciones estériles y/o mediante la inclusión de una cantidad antimicrobiana eficaz de un conservante oftálmicamente aceptable.

Los conservantes adecuados incluyen, pero no se limitan a 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 y etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno, y sales de los mismos; fenoxietanol; clorofenoxietanol; fenoxipropanol; clorobutanol; clorocresol; alcohol feniletílico; EDTA disódico; y ácido sórbico y sus sales.

10

Varios conservantes pueden precipitar en presencia de otros excipientes en la composición y/o en presencia del oligómero en las composiciones oftálmicas de la presente invención. Por ejemplo, el cloruro de benzalconio puede precipitar en una composición usando iota-carragenano como un agente gelificante. Por lo tanto, en aquellas realizaciones de la invención en las que está presente un conservante, el conservante es uno que no precipita sino que permanece en solución en la composición.

15

Opcionalmente, se pueden incluir uno o más estabilizantes en las composiciones de la invención para potenciar la estabilidad química cuando sea necesario. Los estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes quelantes o agentes complejantes, tales como, por ejemplo, el agente de complejación de calcio ácido etilendiaminetetraacético (EDTA). Por ejemplo, se puede incluir una cantidad adecuada de EDTA o una sal del mismo, p. ej., la sal de disodio, en la composición para formar complejo con los iones calcio en exceso y evitar la formación de gel durante el almacenamiento. El EDTA o una sal del mismo se puede incluir adecuadamente en una cantidad de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%. En aquellas realizaciones que contienen un conservante distinto del EDTA, el EDTA o una de sus sales, más en particular el EDTA disódico, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,1% en peso.

20

25

También se pueden incluir uno o más antioxidantes en las composiciones oftálmicas de la invención. Los antioxidantes adecuados incluyen ácido ascórbico, metabisulfito sódico, policuaternio-1, cloruro de benzalconio, timerosal, clorobutanol, metilparabeno, propilparabeno, alcohol feniletílico, edetato disódico, ácido sórbico u otros agentes conocidos para el experto en la materia. Dichos conservantes se usan típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1,0% en peso. En algunas realizaciones de la presente invención, el o los polímeros u oligómeros facialmente anfífilos de las composiciones se solubilizan al menos en parte mediante un agente solubilizante oftálmicamente aceptable. La expresión "agente solubilizante" en la presente memoria incluye agentes que dan como resultado la formación de una solución micelar o una solución verdadera del fármaco. Algunos tensioactivos no iónicos oftálmicamente aceptables, por ejemplo polisorbato 80, pueden ser útiles como agentes solubilizantes, como pueden ser los glicoles, poliglicoles, por ejemplo, polietilenglicol 400 (PEG-400) y éteres glicólicos oftálmicamente aceptables.

30

35

Los agentes solubilizantes particularmente preferidos para las composiciones en solución y solución/suspensión de la invención son ciclodextrinas. Las ciclodextrinas adecuadas se pueden seleccionar de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, alquilciclodextrinas (p. ej., metil- β -ciclodextrina, dimetil- β -ciclodextrina, dietil- β -ciclodextrina), hidroxialquilciclodextrinas (p. ej., hidroxietil- β -ciclodextrina, hidroxipropil- β -ciclodextrina), carboxialquilciclodextrinas (p. ej., carboximetil- β -ciclodextrina), sulfoalquileter-ciclodextrinas (p. ej., sulfobutyleter- β -ciclodextrina), y similares. Las aplicaciones oftálmicas de las ciclodextrinas se han revisado en Rajewski et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1996, 85, 1155-1159.

40

45

Una ciclodextrina oftálmicamente aceptable puede estar opcionalmente presente en una composición oftálmica de la invención en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg/ml y más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/ml.

En algunas realizaciones, la composición oftálmica contiene opcionalmente un agente de suspensión. Por ejemplo, en aquellas realizaciones en las que la composición oftálmica es una suspensión o solución/suspensión acuosa, la composición puede contener uno o más polímeros como agentes de suspensión. Los polímeros útiles incluyen polímeros solubles en agua tales como polímeros celulósicos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa y polímeros insolubles en agua tales como polímeros que contienen carboxilo reticulados. Sin embargo, las composiciones oftálmicas preferidas de la invención no contienen cantidades sustanciales de materia sólida en partículas, sea del agente activo oligómero antimicrobiano, un excipiente o ambos, ya que si hay presente materia sólida en partículas puede producir incomodidad y/o irritación de un ojo tratado.

50

55

Se pueden incluir uno o más agentes de ajuste del pH y/o agentes de tamponamiento oftálmicamente aceptables en

las composiciones oftálmicas de la invención, incluyendo ácidos tales como ácidos acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico y clorhídrico; bases tales como hidróxido sódico, fosfato sódico, borato sódico, citrato sódico, acetato sódico, lactato sódico y trishidroximetilaminometano; y tampones tales como citrato/dextrosa, bicarbonato sódico y cloruro amónico. Dichos ácidos, bases y tampones se incluyen en una cantidad necesaria para mantener el pH de la composición en un intervalo oftálmicamente aceptable.

Se pueden incluir una o más sales oftálmicamente aceptables en la composición de la invención en una cantidad necesaria para llevar la osmolalidad de la composición a un intervalo oftálmicamente aceptable. Dichas sales incluyen, pero no se limitan a las que tienen cationes de sodio, potasio o amonio y aniones cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato o bisulfito; las sales preferidas incluyen cloruro sódico, cloruro potásico, tiosulfato sódico, bisulfito sódico y sulfato amónico, siendo especialmente preferido el cloruro sódico.

Opcionalmente se puede incluir en las composiciones de la invención un derivado de xantina oftálmicamente aceptable, tal como cafeína, teobromina o teofilina, p. ej., como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.559.343. La inclusión del derivado de xantina puede reducir la incomodidad ocular asociada con la administración de la composición.

Opcionalmente, se pueden incluir uno o más tensioactivos oftálmicamente aceptables, preferiblemente tensioactivos no iónicos, o codisolventes en las composiciones de la invención para potenciar la solubilidad de los componentes de las composiciones o para impartir estabilidad física, o para otros propósitos. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a glicéridos de ácido graso polioxietilénicos y aceites vegetales, p. ej., aceite de ricino hidrogenado polioxietilénico (60); y éteres de alquilo polioxietilénicos y éteres de alquilfenilo; p. ej., octoxinol 10, octoxinol 40; polisorbato 20, 60 y 80; tensioactivos de polioxietileno/polioxipropilenos (p. ej., Pluronic® F-68, F84 y P-103); ciclodextrina; u otros agentes conocidos para el experto en la técnica. Típicamente, dichos codisolventes o tensioactivos se usan en las composiciones en un nivel de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2% en peso.

También se pueden incluir opcionalmente en las composiciones de la invención uno o más agentes lubricantes oftálmicos para promover la lacrimación o como un medicamento para "ojo seco". Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a poli(alcohol vinílico), metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares. Se entenderá que promover la lacrimación es beneficioso en la presente invención solo cuando la lacrimación es naturalmente deficiente, para restablecer un grado normal de secreción de líquido lagrimal. Cuando se produce una lacrimación excesiva, se puede reducir el tiempo de permanencia de la composición en el ojo.

Las composiciones oftálmicas de la presente invención típicamente incluyen una combinación de uno o más de los excipientes opcionales listados antes. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, la composición oftálmica puede comprender además opcionalmente glicerina en una cantidad de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 2,5%, por ejemplo de aproximadamente 1,5% a aproximadamente 2%, en peso. La glicerina puede ser útil para aumentar la viscosidad de la composición y para el ajuste de la osmolalidad. Independientemente de la presencia de glicerina, la composición también puede comprender además una ciclodextrina, preferiblemente hidroxipropil-β-ciclodextrina, en una cantidad de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 25% en peso, como un agente solubilizantes, y una cantidad eficaz antimicrobiana de un conservante, p. ej., imidazolidinil-urea en una cantidad de aproximadamente 0,03% a aproximadamente 0,5%; metilparabeno en una cantidad de aproximadamente 0,015% a aproximadamente 0,25%; propilparabeno en una cantidad de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,01%; fenoxietanol en una cantidad de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 1%; EDTA disódico en una cantidad de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,2%; timerosal en una cantidad de 0,001% a aproximadamente 0,15%; clorobutanol en una cantidad de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,5%; y/o ácido ascórbico en una cantidad de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,2%; todos en peso.

Las composiciones óticas de la presente invención también comprenden opcionalmente uno o más excipientes óticamente aceptables. Los excipientes óticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a uno o más de los conservantes, estabilizantes, antioxidantes, agentes potenciadores de la viscosidad, agentes de tamponamiento, agentes solubilizantes, tensioactivos, agentes lubricantes o sales aceptables descritas antes, o combinaciones de los mismos, como se ha descrito antes para las composiciones oftálmicas de la invención.

Así, por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición ótica de la presente invención comprende opcionalmente uno o más agentes de taponamiento, agentes solubilizantes y antioxidantes, típicamente en una solución acuosa. En algunas realizaciones, la composición ótica comprende además glicerina (p. ej., glicerina anhidra) o propilenglicol como un agente potenciador de la viscosidad. La composición ótica también puede comprender un tensioactivo en combinación con la glicerina o propilenglicol para ayudar a la eliminación de cerumen (cera de los oídos). También se puede usar bicarbonato sódico si debe eliminarse cera del oído.

Así, por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición ótica de la presente invención es una solución acuosa estéril que comprende uno o más de los polímeros u oligómeros descritos, glicerina, bicarbonato sódico y opcionalmente un conservante, en agua purificada.

Las composiciones oftálmicas y óticas de la presente invención se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica y descritos en patentes y publicaciones citadas en la presente memoria e incorporadas en la presente memoria por referencia.

Métodos de tratamiento y administración

- 5 Las composiciones oftálmicas u óticas de la presente invención tienen actividad antimicrobiana y pueden ser útiles en métodos de tratamiento o prevención de infecciones oftálmicas en un ojo de un animal o infecciones óticas en el oído de un animal.

10 El término “animal” como se usa en la presente memoria incluye, pero no se limita a seres humanos y vertebrados no humanos tales como animales salvajes, domésticos y de granja. Preferiblemente, el animal es un sujeto mamífero de sangre caliente, incluyendo, pero no limitado a mamíferos domésticos, de granja y exóticos, y seres humanos. Los métodos de la presente invención pueden ser útiles, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones de ojos en perros, gatos, caballos, ganado, ovejas y/o cerdos, pero es útil, más en particular, cuando el sujeto es un ser humano.

15 Las frases “tratar una infección oftálmica” y “tratamiento de una infección oftálmica” se refieren tanto a la prevención como al tratamiento terapéutico, p. ej., el alivio o mejora de una infección oftálmica, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) el avance de una infección oftálmica, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Por ejemplo, los “resultados clínicos beneficiosos o deseados” incluyen, pero no se limitan al alivio de los síntomas de una infección oftálmica; disminución de la extensión de una infección oftálmica; estabilización (por ejemplo, no hay empeoramiento) del estado de una infección oftálmica; retraso en el inicio o desaceleración de una infección oftálmica o su avance; mejora de una infección oftálmica o remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable, o potenciación o mejora de una infección oftálmica. El tratamiento incluye producir una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios.

25 Igualmente, las frases “tratar una infección ótica” y “tratamiento de una infección ótica” se refieren tanto a la prevención como al tratamiento terapéutico, p. ej., el alivio o mejora de una infección ótica, en donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) el avance de una infección ótica, u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Por ejemplo, los “resultados clínicos beneficiosos o deseados” incluyen, pero no se limitan al alivio de los síntomas de una infección ótica; disminución de la extensión de una infección ótica; estabilización (por ejemplo, no hay empeoramiento) del estado de una infección ótica; retraso en el inicio o desaceleración de una infección ótica o su avance; mejora de una infección ótica o remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable, o potenciación o mejora de una infección ótica. El tratamiento incluye producir una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios.

35 Las infecciones oftálmicas para las que las composiciones y métodos de la presente invención son útiles incluyen, pero no se limitan a infecciones de uno o más tejidos del ojo, incluyendo, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis (incluyendo queratitis ulcerativa con infección bacteriana), queratoconjuntivitis (incluyendo, p. ej., la queratoconjuntivitis seca (KCS) encontrada habitualmente en perros), blefaritis, blefaroconjuntivitis, dacriocistitis, orzuelo, úlceras de la córnea, celulitis orbitaria y preseptal y endoftalmitis.

En métodos preferidos de la invención, el tejido infectado es uno que está bañado directamente por el líquido lagrimal, como en la conjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis, blefaritis y blefaroconjuntivitis.

40 Las composiciones oftálmicas de la presente invención también se pueden usar de forma profiláctica en relación con diferentes procedimientos quirúrgicos oftálmicos que crean un riesgo de infección.

45 Las infecciones óticas para las que las composiciones y métodos de la presente invención son útiles incluyen, pero no se limitan a otitis externa y otitis media. Con respecto al tratamiento de la otitis media, las composiciones de la presente invención son principalmente útiles en casos donde se ha roto la membrana timpánica o se han implantado tubos de timpanostomía. Las composiciones óticas también se pueden usar para tratar infecciones asociadas con procedimientos quirúrgicos óticos, tales como timpanostomía, o para prevenir dichas infecciones.

Las composiciones oftálmicas y óticas de la invención son eficaces para matar o inhibir el crecimiento de un amplio espectro de patógenos o microbios a menudo asociados con infecciones oftálmicas y/u óticas, incluyendo una variedad de bacterias (tanto Gram positivas como Gram negativas), hongos y virus.

50 Por ejemplo, las composiciones oftálmicas y óticas son útiles para matar o inhibir el crecimiento de cualquiera de los siguientes patógenos oculares u óticos clínicamente importantes, y se pueden administrar por vía tópica para tratar y/o prevenir infecciones oftálmicas u óticas causadas por los siguientes patógenos o mezclas de los siguientes patógenos: género *Staphylococcus* (p. ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), género *Streptococcus* (p. ej., *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*), género *Enterococcus*, género *Bacillus*, género *Corynebacterium*, género *Propionibacterium*, género *Chlamydia*, género *Moraxella* (p. ej., *Moraxella lacunata* y *Moraxella catarrhalis*), género *Haemophilus* (p. ej., *Haemophilus influenzae* y *Haemophilus aegyptius*), género *Pseudomonas* (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa*, y para infecciones óticas, *Pseudomonas otitidis*), género *Serratia* (p. ej., *Serratia marcescens*), género *Neisseria*, y género *Mycoplasma*, así como género *Enterobacter* (p. ej.,

Enterobacter aerogenes), género *Escherichia* (p. ej., *Escherichia coli*), género *Klebsiella* (p. ej., *Klebsiella pneumoniae*), género *Proteus* (p. ej., *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*), género *Acinetobacter* (p. ej., *Acinetobacter calcoaceticus*), género *Prevotella*, género *Fusobacterium*, género *Porphyromonas*, y género *Bacteroides* (p. ej., *Bacteroides fragilis*). La lista de microbios es solamente ilustrativa y no debe interpretarse de ninguna forma como restrictiva.

Así, por ejemplo, las composiciones oftálmicas de la presente invención se pueden administrar para tratar o prevenir una infección bacteriana del ojo causada por una o más de las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, género *Corynebacterium*, género *Propionibacterium*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*.

Por ejemplo, el tratamiento de la conjuntivitis bacteriana por administración de una composición oftálmica de la presente invención es adecuado cuando está presente una infección con una o más de las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*, género *Corynebacterium*, género *Propionibacterium*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae*.

De la misma forma, el tratamiento de la blefaritis bacteriana por administración de una composición oftálmica de la presente invención es adecuado cuando está presente una infección con una o más de las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus pneumoniae*. El tratamiento de la queratitis bacteriana por administración de una composición oftálmica de la presente invención también es adecuado cuando está presente una infección con una o más de las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus viridans*.

Las composiciones óticas de la presente invención, por ejemplo, también se pueden administrar para tratar o prevenir una infección bacteriana del oído causada por una o más de las siguientes especies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas otitidis*, y género *Proteus* (p. ej., *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*), así como uno o más de los siguientes anaerobios: género *Prevotella*, género *Fusobacterium*, género *Porphyromonas*, y género *Bacteroides* (p. ej., *Bacteroides fragilis*). Así, por ejemplo, el tratamiento de la otitis media crónica supurada por administración de una composición ótica de la presente invención es adecuado cuando está presente infección por una o más de las siguientes especies: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, género *Klebsiella* (p. ej., *Klebsiella pneumoniae*), género *Proteus* (p. ej., *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris*), género *Prevotella*, género *Fusobacterium*, género *Porphyromonas*, y género *Bacteroides* (p. ej., *Bacteroides fragilis*).

Las composiciones oftálmicas u óticas también son útiles para matar o inhibir el crecimiento de hongos oculares u óticos clínicamente relevantes, y se pueden administrar por vía tópica para tratar y/o prevenir infecciones oftálmicas u óticas causadas por una o más especies de hongos, o una mezcla de especies de hongos, incluyendo, pero no limitado al género *Aspergillus* (p. ej., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus favus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus terreus*), género *Fusarium* (p. ej., *Fusarium solani*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum*), género *Malessezia* (p. ej., *Malessezia pachydermatis*), y/o género *Candida* (p. ej., *Candida albicans*), así como *Chrysosporium parvum*, *Metarhizium anisopliae*, *Phaeoisaria clematidis*, y *Sarcopodium oculorum*. La lista de microbios es solamente ilustrativa y no debe interpretarse de ninguna forma como restrictiva.

Por lo tanto, las composiciones oftálmicas de la presente invención se pueden administrar para tratar o prevenir una infección fúngica en el ojo, causada por una o más de las siguientes especies: género *Aspergillus*, género *Fusarium*, *Chrysosporium parvum*, *Metarhizium anisopliae*, *Phaeoisaria clematidis*, y *Sarcopodium oculorum*. Por ejemplo, la composición oftálmica se puede administrar para tratar la queratitis fúngica causada por uno o más del género *Aspergillus* y/o género *Fusarium*.

Las composiciones óticas de la presente invención, por ejemplo, también se pueden administrar para tratar o prevenir una infección fúngica en el oído causada por una o más de las siguientes especies: género *Candida*, género *Aspergillus*, y/o género *Malessezia* (p. ej., *Malessezia pachydermatis*).

Las composiciones oftálmicas y óticas también son útiles para matar o inhibir el crecimiento de virus oculares u óticos clínicamente relevantes, y se pueden administrar por vía tópica para tratar y/o prevenir infecciones oftálmicas u óticas causadas por uno o más virus, incluyendo, pero no limitado a adenovirus y virus del herpes (incluyendo, p. ej., virus del herpes simple 1 y/o virus varicela zóster), enterovirus y citomegalovirus.

Así, por ejemplo, las composiciones oftálmicas de la presente invención se pueden administrar para tratar o prevenir una infección vírica del ojo, p. ej., queratitis herpética, causada por el virus del herpes simple 1.

En algunas realizaciones, las composiciones oftálmicas u óticas de la invención son útiles y eficaces para matar y/o prevenir el crecimiento de microbios que han desarrollado niveles significativos de resistencia a agentes antimicrobianos distintos del oligómero descrito. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones oftálmicas y las composiciones óticas son especialmente eficaces en métodos de tratamiento de infecciones oftálmicas o infecciones óticas causadas por cepas bacterianas que han desarrollado resistencia a la ciprofloxacina,

p. ej., *S. aureus* resistente a ciprofloxacina (CR) y *S. epidermidis* CR o a fluoroquinolona, o cepas bacterianas que han desarrollado resistencia a la penicilina.

5 En algunas realizaciones, las composiciones de la invención se administran por vía tópica a uno o más tejidos del ojo o el oído para tratar una infección microbiana existente, o como una medida profiláctica para prevenir una infección microbiana.

Así, por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición oftálmica de la presente invención se administra por vía tópica a uno o más tejidos del ojo para tratar una infección microbiana existente, p. ej., conjuntivitis, queratitis, blefaritis o blefaroconjuntivitis.

10 En otras realizaciones, una composición oftálmica de la presente invención se administra por vía tópica a uno o más tejidos del ojo como una medida profiláctica. Es decir, las composiciones se administran para usos profilácticos, p. ej., en relación con diferentes procedimientos quirúrgicos oftálmicos que crean un riesgo de infección. Así, por ejemplo, una composición de la invención se puede administrar en un método de profilaxis postraumática, en especial de profilaxis posquirúrgica, para prevenir la infección después de cirugía ocular, o en un método de profilaxis antes de cirugía ocular, por ejemplo, administrada antes de la cirugía para prevenir la infección como consecuencia de la cirugía.

15 Las composiciones oftálmicas y óticas de la presente invención, tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro debido a las propiedades facialmente anfifílicas y catiónicas del oligómero facialmente anfifílico en la composición. Como consecuencia, una infección oftálmica o una infección ótica se puede tratar o prevenir administrando solo una de las composiciones de la presente invención, en lugar de administrar dos o más composiciones antimicrobianas separadas, o una composición que contiene una combinación de agentes antimicrobianos.

20 Por ejemplo, debido a que las composiciones oftálmicas de la invención se pueden usar para tratar o prevenir tanto infecciones oftálmicas víricas como bacterianas en un ojo, solo es necesario administrar una de las presentes composiciones en el ojo para tratar una infección oftálmica vírica donde haya riesgo de una infección bacteriana secundaria. De forma similar, para una infección en el ojo causada por múltiples cepas bacterianas (p. ej., tanto bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas), solo es necesario administrar una composición que contiene uno de los oligómeros anfifílico descrito, en lugar de una composición que contenga múltiples agentes antimicrobianos, o una combinación de tratamientos separados administrados simultáneamente.

25 En algunas realizaciones, las composiciones oftálmicas u óticas de la presente invención se administran con un agente antimicrobiano adicional, tal como, p. ej., un agente antibacteriano, antifúngico o antivírico. Por ejemplo, un agente antimicrobiano adicional puede ser un segundo oligómero facialmente anfifílico descrito en la presente memoria, o el agente antimicrobiano adicional puede ser otro agente antimicrobiano tal como, por ejemplo, un antibiótico seleccionado del grupo que consiste en aminoglucósidos, cefalosporinas, diaminopiridinas, fluoroquinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. Los ejemplos de antibióticos útiles que pueden servir como antimicrobianos adicionales incluyen, pero no se limitan a amikacina, azitromicina, cefixima, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, colistina, domeclociclina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, mafenida, metaciclina, minociclina, neomicina, norfloxacin, ofloxacina, oxitetraciclina, polimixina B, pirimetamina, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfisoxazol, tetraciclina, tobramicina y trimetoprim.

30 En aquellas realizaciones en las que la composición oftálmica u ótica se administra con otro agente antimicrobiano, la presente invención proporciona un método de tratamiento o prevención de múltiples infecciones bacterianas en un ojo o en un oído, comprendiendo el método la aplicación en el ojo o el oído en cotratamiento (incluyendo coformulación) de uno o más polímeros u oligómeros facialmente anfifílicos descritos en la presente memoria y uno o más agentes antimicrobianos adicionales. El "cotratamiento" en la presente memoria significa la administración en el ojo o el oído, al mismo tiempo o de forma secuencial, de una composición oftálmica u óticamente aceptable que comprende uno o más de los polímeros u oligómeros facialmente anfifílicos descritos en la presente memoria y una composición oftálmica u óticamente aceptable separada del agente antimicrobiano adicional, en un régimen de tratamiento previsto para proporcionar un efecto beneficiosos por la acción simultánea de los dos tipos de agentes antimicrobianos. "Coformulación" en la presente memoria significa que el agente activo oligómero facialmente anfifílico y el agente antimicrobiano adicional se administran en el ojo o el oído como componentes de una sola composición oftálmica u óticamente aceptable.

35 Las composiciones oftálmicas u óticas de la presente invención también se pueden usar en cotratamiento con uno o más fármacos o medicamentos, distintos de los agentes antimicrobianos. Dichos medicamentos distintos de los agentes antimicrobianos se pueden coadministrar en el ojo o el oído junto con una composición de la invención. Por lo tanto, p. ej., una composición oftálmica de la presente invención puede comprender además, en coformulación con el agente activo oligómero facialmente anfifílico, una cantidad terapéutica y/o profilácticamente eficaz de uno o más medicamentos que son distintos de los agentes antimicrobianos.

Estos medicamentos adicionales distintos de los agentes antimicrobianos pueden cooperar con el o los agentes activos oligómeros facialmente anfifílicos antimicrobianos en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad

infecciosa del ojo u oído, o se pueden usar para tratar una afección relacionada o no relacionada que afecta al ojo o al oído.

5 Cualquier medicamento que tenga utilidad en una aplicación oftálmica u ótica se puede usar en el cotratamiento, coadministración o coformulación con una composición oftálmica u ótica de la presente invención como se ha descrito antes. Dichos medicamentos adicionales incluyen, pero no se limitan a agentes antiinflamatorios (p. ej., agentes antiinflamatorios esteroideos, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) e inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2); agentes anestésicos tópicos y/o regionales; agentes antialérgicos (p. ej., antihistaminas); emolientes; agentes bloqueantes de acetilcolina; agonistas adrenérgicos, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos y otros agentes antiglaucoma; antihipertensivos; y agentes anticataratas.

10 Por ejemplo, las infecciones oftálmicas y óticas van acompañadas con frecuencia de inflamación de los tejidos oftálmicos y/u óticos infectados y tejidos de alrededor. Además, los procedimientos quirúrgicos oftálmicos y óticos que crean riesgo de infecciones microbianas con frecuencia también causan inflamación de los tejidos afectados. Por lo tanto, las composiciones oftálmicas y óticas de la presente invención se pueden coformular con un agente antiinflamatorio para combinar la actividad antiinfecciosa de uno o más antibióticos con la actividad antiinflamatorio
15 de uno o más agentes esteroideos o no esteroideos en una sola composición.

Los agentes antiinflamatorios pueden ser esteroideos o no esteroideos. Los ejemplos de agentes antiinflamatorios esteroideos adecuados incluyen, pero no se limitan a dexametasona; derivados de dexametasona tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 5.223.492; rimexolona; prednisolona; fluorometolona; e hidrocortisona.

20 Los ejemplos de agentes antiinflamatorios no esteroideos adecuados incluyen, pero no se limitan a inhibidores de prostaglandina H sintetasa (Cox I o Cox II), también denominados inhibidores de ciclooxigenasa de tipo I y tipo II, tales como diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco, suprofen, nepafenaco, amfenaco, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, bromfenaco, ketoprofeno, meclofenamato, piroxicam, sulindaco, ácido mefanámico, diflusal, oxaprozina, tolmetina, fenoprofeno, benoxapropeno, nabumetona, etodolaco, fenilbutazona, aspirina, oxifenbutazona, tenoxicam y carprofeno; inhibidores selectivos de ciclooxigenasa de tipo II, tales como Vioxx, celecoxib, etodolaco;
25 antagonistas de PAF, tales como apafant, bepafant, minopafant, nupafant y modipafant; Inhibidores de PDE IV, tales como ariflo, torbafilina, rolipram, filaminast, piclamilast, cipamfilina, y roflumilast; inhibidores de la producción de citoquinas, tales como inhibidores del factor de transcripción NFκB; u otros agentes antiinflamatorios conocidos para los expertos en la técnica.

Los ejemplos de agentes anestésicos tópicos o regionales adecuados incluyen, pero no se limitan a benzocaína.

30 Los ejemplos de agentes antialérgicos adecuados incluyen, pero no se limitan a pemirolast, olopatadina, y los corticosteroides (prednisolona, fluorometolona, loteprenol y dexamtasona).

El medicamento adicional se puede administrar en cotratamiento (incluyendo coformulación) con uno o más polímeros facialmente anfífilos de la composición oftálmica u ótica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición oftálmica de la presente invención que comprende uno de los oligómeros antimicrobianos descritos en
35 la presente memoria se administra en cotratamiento con un agente antiinflamatorio, p. ej., un glucocorticoide. El glucocorticoide se puede coformular con el oligómero en una sola composición oftálmicamente aceptable, que se administra en uno o más tejidos de un ojo, no solo para tratar o prevenir una infección oftálmica sino también para tratar y/o prevenir la inflamación.

40 Las composiciones oftálmicas u óticas se pueden administrar por cualquier vía de administración adecuada. En algunos aspectos de la invención, las composiciones oftálmicas y óticas se administran por vía tópica, por ejemplo, la composición se administra por vía tópica en una cantidad antimicrobiana eficaz en uno o más tejidos del ojo del animal, o en uno o más tejidos del oído de un animal.

Una dosificación, frecuencia y duración de la administración adecuadas, por ejemplo, el régimen de tratamiento que se va a usar en cualquier situación particular la determinará fácilmente el experto en la técnica sin excesiva
45 experimentación, y dependerá, entre otros factores, del o de los polímeros u oligómeros particulares presentes en la composición, de la infección oftálmica particular que se va a tratar, de la edad, peso y estado físico general del sujeto y de otra medicación que se esté administrando al sujeto. Se prefiere que la respuesta de la infección oftálmica u ótica al tratamiento de acuerdo con los presentes métodos sea controlada y se ajuste el régimen de tratamiento si es necesario a la luz de dicho control.

50 La frecuencia de administración típicamente es tal que el intervalo de dosificación, por ejemplo, el periodo de tiempo entre una dosis y la siguiente, durante las horas activas es de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 horas, más típicamente de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 h, por ejemplo de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 h. Los expertos en la técnica entenderán que un intervalo de dosificación adecuado depende en cierta medida del periodo de tiempo durante el cual la composición seleccionada es capaz de mantener una
55 concentración del o de los polímeros u oligómeros antimicrobianos en el líquido lagrimal y/o en el tejido objetivo (p. ej., la conjuntiva) por encima de la CMI₉₀ (la concentración mínima del oligómero o polímero que inhibe el crecimiento microbiano en 90%). Idealmente, la concentración permanece por encima de la CMI₉₀ durante al menos 100% del intervalo de dosificación. Donde esto no se pueda conseguir, se desea que la concentración permanezca

por encima de la CMI₉₀ durante al menos aproximadamente 60% del intervalo de dosificación, en el peor de los casos al menos aproximadamente 40% del intervalo de dosificación.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones de las composiciones oftálmicas de la invención, la composición oftálmica se formula como un líquido acuoso gelificable en el sitio y se administra como gotas oculares. Típicamente cada gota, generada por un medio de dispensación convencional, tiene un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 μ l. De 1 a aproximadamente 6 de dichas gotas típicamente proporcionan una dosis adecuada del agente activo oligómero en aproximadamente 25-150 μ l de la composición. Por ejemplo, preferiblemente, como máxima 3 gotas, más preferiblemente como máximo 2 gotas y lo más preferiblemente como máximo 1 gota, deben contener la dosis deseada del agente activo para la administración en un ojo. Cuando la composición se administra de una forma distinta a gotas oculares, por ejemplo, como una pomada oftálmica o como un implante sólido, se proporciona una dosis equivalente. Dicha dosis se puede administrar según sea necesario, pero típicamente la administración en el ojo de 1 a aproximadamente 6 veces al día, en la mayoría de los casos de 2 a 4 veces al día, proporciona el alivio o prevención continuo adecuado de la enfermedad infecciosa adecuada.

15 Las composiciones oftálmicas de la invención, p. ej., las composiciones en suspensión acuosa se pueden envasar en recipientes de una sola dosis que no se pueden volver a cerrar. Dichos envases pueden mantener la composición en condiciones estériles y de esta forma eliminar la necesidad de conservantes tales como conservantes que contienen mercurio, que a veces pueden producir irritación y sensibilización del ojo. Alternativamente, se pueden usar envases de multidosis que se pueden volver a cerrar, en cuyo caso se prefiere incluir un conservante en la composición.

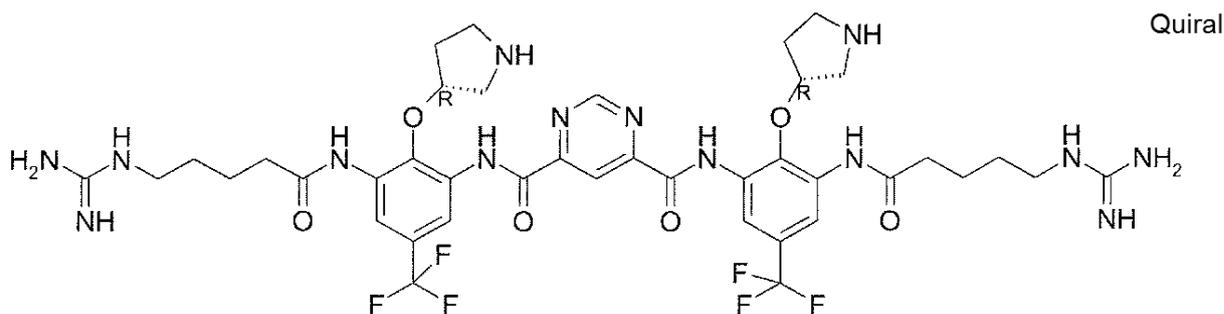
20 Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición oftálmica es una solución, suspensión o solución/suspensión acuosa que se administra en forma de gotas oculares. En estas realizaciones, una dosificación deseada del agente activo se puede administrar mediante un dispensador adecuado como un número conocido de gotas en el ojo. Los ejemplos de dispensadores adecuados se describen en la publicación de patente internacional n° WO 96/06581.

25 Los siguientes ejemplos servirán para caracterizar mejor la naturaleza de esta invención, pero no deben considerarse como una limitación en el alcance de la misma, cuyo alcance se define solamente por las reivindicaciones adjuntas. Con el fin de que la invención descrita en la presente memoria se pueda entender de forma más eficaz, se proporcionan a continuación ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos tienen solo fines ilustrativos y no deben considerarse como limitantes de la invención de ninguna forma.

Ejemplos

30 Ejemplo 1: Toxicidad

Se llevó a cabo el análisis de la toxicidad ocular de varias formulaciones del oligómero 4 con y sin farnesol usando el sistema de puntuación de toxicidad ocular Draize, en el modelo de toxicidad ocular de conejo NZW.



Oligómero 4

35 Se recibieron 15 conejos de Myrtles' Rabbitry, Thompson Station, TN, y se dividieron en 8 grupos:

Grupo	Formulación	N conejos	N ojos	Número de los conejos
I	Oligómero 4 al 0,25% en solución salina tamponada con Tris (TBS)	2	4	1-2
II	Oligómero 4 al 0,5% en solución salina tamponada con Tris (TBS)	2	4	3-4
III	Farnesol 100 μ M en propilenglicol al 1% (PG) y TBS	2	4	5-6
IV	Farnesol 200 μ M en propilenglicol al 1% (PG) y TBS	2	4	7-8

Grupo	Formulación	N conejos	N ojos	Número de los conejos
V	Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS	2	4	9-10
VI	Oligómero 4 al 0,5% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS	2	4	11-12
VII	Propilenglicol al 1% en TBS	2	4	13-14
VIII	Solución salina tamponada con Tris	1	2	15

Se trataron ambos ojos de los conejos con gotas tópicas (37 µl) cada 30 min durante 3 horas (7 dosis totales). Un conejo se trató con solución salina tamponada con Tris y sirvió como un control negativo. Los conejos fueron evaluados con enmascaramiento por un oftalmólogo con entrenamiento especial en enfermedades de la córnea y externas 30 min después de la dosis final. La toxicidad ocular se evaluó usando el sistema de puntuación Draize (véase antes) después de tratamiento el día 0 y el día 2 después de tratamiento para cualquier toxicidad retrasada.

Formulaciones: 1) Oligómero 4 al 0,25%: el vial 1 del oligómero 4 en forma de polvo se almacenó a 4°C hasta su uso. El vial se retiró del frigorífico y se añadieron 1,04 ml de agua estéril para inyección y se mezcló en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente. Después, se añadieron 1,04 ml de solución A (2X TBS) y se mezcló en vórtex durante 10 segundos; 2) Oligómero 4 al 0,5%: el vial 2 del oligómero 4 en forma de polvo se almacenó a 4°C hasta su uso. El vial se retiró del frigorífico y se añadieron 1,04 ml de agua estéril para inyección y se mezcló en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente. Después, se añadieron 1,04 ml de solución A (2X TBS) y se mezcló en vórtex durante 10 segundos; 3) Farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS: el vial 3 que contenía aproximadamente 2 ml de farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS se almacenó a 4°C hasta su uso; 4) Farnesol 200 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS: el vial 4 que contenía aproximadamente 2 ml de farnesol 200 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS se almacenó a 4°C hasta su uso; 5) Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS: el vial 5 del oligómero 4 en forma de polvo se almacenó a 4°C hasta su uso; en el momento de usar, el vial se retiró del frigorífico y se añadieron 1,016 ml de agua estéril para inyección y se mezcló en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente; después, se añadieron 1,016 ml de solución B (PG al 2%, 2X TBS, farnesol 200 µM) y se mezcló en vórtex durante 10 segundos; 6) Oligómero 4 al 0,5% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS: el vial 6 del oligómero 4 en forma de polvo se almacenó a 4°C hasta su uso; en el momento de usar, el vial se retiró del frigorífico y se añadieron 1,02 ml de agua estéril para inyección y se mezcló en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente; después, se añadieron 1,02 ml de solución B (PG al 2%, 2X TBS, farnesol 200 µM) y se mezcló en vórtex durante 10 segundos; 7) Propilenglicol al 1% en TBS: el vial 7 que contenía aproximadamente 2 ml de propilenglicol al 1% se almacenó a 4°C hasta su uso; y 8) solución salina tamponada con Tris: el vial 8 que contenía aproximadamente 2 ml de solución salina tamponada con Tris (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH=7,4) se almacenó a 4°C hasta su uso.

Protocolo de IACUC nº 0701145-1 "The In Vivo Evaluation of Biomimetics as Topical Ocular Antibiotics".

Evaluación de la toxicidad ocular. Esquema de administración de gotas

Gota	Tiempo transcurrido	Hora del día	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII
1	0	10:45	X	X	X	X	X	X	X	X
2	:30	11:15	X	X	X	X	X	X	X	X
3	1:00	11:45	X	X	X	X	X	X	X	X
4	1:30	12:15	X	X	X	X	X	X	X	X
5	2:00	12:45	X	X	X	X	X	X	X	X
6	2:30	1:15	X	X	X	X	X	X	X	X
7	3:00	1:45	X	X	X	X	X	X	X	X
Examen	3:30	2:15	X	X	X	X	X	X	X	X

Evaluación de la toxicidad ocular aguda

Observaciones del comportamiento de los conejos después de instilación de los fármacos de ensayo el día 0

ES 2 538 479 T3

Grupo	Formulación
I	Oligómero 4 al 0,25% en solución salina tamponada con Tris (TBS)
II	Oligómero 4 al 0,5% en solución salina tamponada con Tris (TBS)
III	Farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS
IV	Farnesol 200 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS
V	Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS
VI	Oligómero 4 al 0,5% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS
VII	Propilenglicol al 1% en TBS
VIII	Solución salina tamponada con Tris

Gota 1 (10:45 am)

No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Gota 2 (11:15 am)

5 No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Gota 3 (11:45 am)

No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Gota 4 (12:15 am)

No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

10 Gota 5 (12:45 pm)

No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Gota 6 (1:15 pm)

No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Gota 7 (1:45 pm)

15 No se observó comportamiento adverso después de instilación de todos los fármacos ensayados.

Grupo: I Oligómero 4 al 0,25%

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	1I	1D	2I	2D	1I	1D	2I	2D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. C.	0	1	1	1	0	1	0	0

ES 2 538 479 T3

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	1I	1D	2I	2D	1I	1D	2I	2D
III. Tot	0	2	2	2	0	2	0	0
Puntuación	0	2	2	2	0	2	0	0
MMTS	1,5 - PN Prácticamente no irritante				0,5-N No irritante			

Grupo: II Oligómero 4 al 0,5%

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	3I	3D	4I	4D	3I	3D	4I	4D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	1	1	1	0	0	0	0	0
III. B.	1	1	1	0	0	0	0	0
III. C.	2	2	2	1	0	0	1	1
III. Tot	8	8	8	2	0	0	2	2
Puntuación	8	8	8	2	0	0	2	2
MMTS	6,5 - M ₁ Mínimamente irritante				1,0 - N Prácticamente no irritante			

Grupo: III Farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	5I	5D	6I	6D	5I	5D	6I	6D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. C.	0	0	0	0	1	0	1	1
III. Tot	0	0	0	0	2	0	2	2

ES 2 538 479 T3

	Día 0				Día 2			
Ensayo/Ojo	5I	5D	6I	6D	5I	5D	6I	6D
Puntuación	0	0	0	0	2	0	2	2
MMTS	0,0-N No irritante				1,5 - PN Prácticamente no irritante			

Grupo: IV Farnesol 200 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS

	Día 0				Día 2			
Ensayo/Ojo	7I	7D	8I	8D	7I	7D	8I	8D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. C.	0	0	0	1	0	0	0	1
III. Tot	0	0	0	2	0	0	0	2
Puntuación	0	0	0	2	0	0	0	2
MMTS	0,5 - N No irritante				0,5 - N No irritante			

Grupo: V Oligómero 4 al 0,25% + Farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS

	Día 0				Día 2			
Ensayo/Ojo	9I	9D	10I	10D	9I	9D	10I	10D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	0	1	0	0	0	0	0	0
III. B.	0	1	0	0	0	0	0	0
III. C.	0	2	1	1	0	1	1	1
III. Tot	0	8	2	2	0	2	2	2
Puntuación	0	8	2	2	0	2	2	2

ES 2 538 479 T3

MMTS	3,0 - M ₁ Mínimamente irritante	1,5 - PN Prácticamente no irritante
------	---	--

Grupo: VI Oligómero 4 al 0,5% + Farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	11I	11D	12I	12D	11I	11D	12I	12D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	2	2	2	2	0	0	0	0
III. B.	1	2	1	1	0	0	0	0
III. C.	2	2	2	2	1	0	1	0
III. Tot	10	12	10	10	2	0	2	0
Puntuación	10	12	10	10	2	0	2	0
MMTS	10,5 - M ₁ Mínimamente irritante				1,0-PN Prácticamente no irritante			

Grupo: VII Propilenglicol al 1% en TBS

Ensayo/Ojo	Día 0				Día 2			
	13I	13D	14I	14D	13I	13D	14I	14D
I. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0	0	0	0	0
III. A.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. B.	0	0	0	0	0	0	0	0
III. C.	0	1	0	0	1	1	0	1
III. Tot	0	2	0	0	2	2	0	2
Puntuación	0	2	0	0	2	2	0	1
MMTS	0,5 - N No irritante				1,5 - PN Prácticamente no irritante			

5

Grupo: VIII Control tratado con TBS

Ensayo/Ojo	Día 0		Día 2	
	15l	15D	15l	15D
I. A.	0	0	0	0
I. B.	0	0	0	0
I. Tot	0	0	0	0
II. A.	0	0	0	0
II. Tot	0	0	0	0
III. A.	0	0	0	0
III. B.	0	0	0	0
III. C.	1	1	1	1
III. Tot	2	2	2	2
Puntuación	2	2	2	2
MMTS	2,0 - PN Prácticamente no irritante		2,0 - PN Prácticamente no irritante	

Resumen de los resultados de MMTS

Grupo	Día 0	Día 2
Oligómero 4 al 0,25% en solución salina tamponada con Tris (TBS)	1,5 - PN Prácticamente no irritante	0,5 - N No irritante
Oligómero 4 al 0,5% en solución salina tamponada con Tris (TBS)	6,5 - M ₁ Mínimamente irritante	1,0 - N Prácticamente no irritante
Farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS	0,0 - N No irritante	1,5 - PN Prácticamente no irritante
Farnesol 200 µM en propilenglicol al 1% (PG) y TBS	0,5 - N No irritante	0,5 - N No irritante
Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS	3,0 - M ₁ Mínimamente irritante	1,5 - PN Prácticamente no irritante
Oligómero 4 al 0,5% + farnesol 100 µM en PG al 1% y TBS	10,5 - M ₁ Mínimamente irritante	1,0 - PN Prácticamente no irritante
Propilenglicol al 1% en TBS	0,5 - N No irritante	1,5 - PN Prácticamente no irritante
Solución salina tamponada con Tris	2,0 - PN Prácticamente no irritante	2,0 - PN Prácticamente no irritante

5 El oligómero 4 demostró una toxicidad ocular dependiente de la dosis después de 7 instilaciones tópicas (cada 30 minutos durante 3 horas) en el modelo de toxicidad ocular de conejo NZW. Se determinó que el oligómero 4 al 0,5% era ligeramente irritante, mientras que al 0,25% se determinó que no era prácticamente irritante. La adición de

farnesol 100 µM en propilenglicol al 1% a las concentraciones del oligómero 4 aumentó la toxicidad del oligómero 4 tanto al 0,5% como al 0,25%. Se determinó que ambas formulaciones eran ligeramente irritantes. Esta era la misma categoría que el oligómero 4 al 0,5% solo, pero las puntuaciones eran mayores. Esta clasificación era un aumento para el oligómero 4 al 0,25%. Se determinó que el farnesol 100 µM, farnesol 200 µM y propilenglicol al 1% individualmente no eran irritantes. Se determinó que la solución salina tamponada con Tris no era prácticamente irritante. Los conejos no demostraron un comportamiento adverso tras la instilación de ninguno de los fármacos de ensayo. Esto indica que ninguno de los fármacos de ensayo picaba tras la instilación. Realmente no había toxicidad prolongada o retrasada (2 días después de las gotas) demostrada en ningún grupo de tratamiento. El único hallazgo el día 2 fue una ligera descarga en algunos de los ojos que explicaban todas las puntuaciones. Aunque las formulaciones completas del oligómero 4 al 0,5% y el oligómero 4 al 0,25% (que incluyen farnesol 100 µM y propilenglicol al 1%) se clasificaron ambas como ligeramente irritantes, la puntuación de MMTS para la formulación del oligómero 4 al 0,5% estaba en el extremo superior de la clasificación, mientras que la formulación del oligómero 4 al 0,25% estaba en el extremo inferior de la clasificación. Parece que la formulación del oligómero 4 al 0,5% completa (que incluye farnesol 100 µM y propilenglicol al 1%), aunque es ligeramente irritante en ojos no infectados, probablemente no es tan adecuada como otras formulaciones para usar en estudios de eficacia en el modelo de queratitis de *Staphylococcus aureus*. La formulación completa del oligómero 4 al 0,25% (que incluye farnesol 100 µM y propilenglicol al 1%) puede ser aceptable desde un punto de vista de la toxicidad. La experiencia con otras formulaciones ha mostrado que en general la toxicidad ocular puede aumentar cuando se instila con más frecuencia (21 gotas frente a 7 gotas) en ojos infectados en el modelo de eficacia de queratitis de *Staphylococcus aureus*.

Ejemplo 2: CMI

Un propósito de los siguientes experimentos era determinar las CMI de dos compuestos biomiméticos frente a 25 aislados oculares de *Staphylococcus aureus* sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*) sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*) resistente a fluoroquinolona, *Serratia marcescens*, *Streptococcus pneumoniae*, grupo de *Streptococcus viridans*, *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*) y *Pseudomonas aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*.

Procedimientos generales

En caldo Mueller-Hinton en tubos se sembraron 25 aislados oculares de *Staphylococcus aureus* sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*) sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*) resistente a fluoroquinolona, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*, más dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37°C durante la noche en un agitador ajustado a 250 rpm.

En caldo Mueller-Hinton complementado con sangre lisada de caballo al 2% en tubos, se sembraron 25 aislados oculares de *Streptococcus pneumoniae*, grupo de *Streptococcus viridans* y género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*) más dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37°C durante la noche. Además, se sembraron en caldo Mueller-Hinton en tubos dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37°C durante la noche en un agitador ajustado a 250 rpm.

En HTM (medio de ensayo para *Haemophilus*) en tubos se sembraron 25 aislados oculares de *Haemophilus influenzae* más dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37°C durante la noche. Además se sembraron en caldo Mueller-Hinton en tubos, dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) y se incubaron a 37°C durante la noche en un agitador ajustado a 250 rpm.

El día del ensayo, se preparó una concentración de 640 µg/ml (1280 µg/ml para *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*) a partir de una solución madre al 1% en ácido acético al 0,01%, BSA al 0,2% en tubos de polipropileno.

Se hicieron diluciones dobles seriadas en ácido acético al 0,01%, BSA al 0,2% en placas de polipropileno de 96 pocillos, que se usan como depósitos para la siembra de las placas de ensayo, para obtener diluciones seriadas de agentes de ensayo de 10 veces las concentraciones de ensayo requeridas: 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, y 0,625 µg/ml (1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, y 1,25 µg/ml para *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*).

Se añadieron 10 µl de 10x agentes de ensayo diluidos a cada pocillo de una fila de las placas de polipropileno de 96 pocillos desde la columna 2 a la columna 12 (la columna 1 es un control para bacterias solas, sin péptido). Las concentraciones del agente de ensayo en las columnas 2-12 eran las siguientes: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, y 0,0625 µg/ml (128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, y 0,125 µg/ml para *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa*). Había el mismo péptido en cada una de las 8 filas. Una placa contenía diluciones de un agente de ensayo y 8 aislados bacterianos.

El día del ensayo, los cultivos de caldo bacteriano de una noche de *Staphylococcus aureus* sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*) sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa negativo*)

resistente a fluoroquinolona, *Serratia marcescens*, y *Pseudomonas aeruginosa*, más dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) se diluyeron en 5 ml de caldo tripticasa de soya para dar una turbidez igual a un estándar 0,5 de McFarland. La siembra final para el ensayo de la CMI para *Staphylococcus aureus* sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa* negativo) sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus coagulasa* negativo) resistente a fluoroquinolona, *Serratia marcescens*, y *Pseudomonas aeruginosa*, se logró poniendo 0,05 ml de la muestra de turbidez ajustada hasta 5 ml de caldo Mueller-Hinton.

Bacterias control - Las dos bacterias control (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) se trataron como antes.

El día del ensayo, los cultivos de caldo bacteriano de una noche de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* y género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*) más dos controles (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) se diluyeron en 5 ml de caldo tripticasa de soya para dar una turbidez igual a un estándar 0,5 de McFarland. La siembra final para el ensayo de la CMI para *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* y género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*) se logró poniendo 0,1 ml de la muestra de turbidez ajustada hasta 5 ml de caldo Mueller-Hinton que contenía eritrocitos lisados de caballo al 2%.

Conjunto de bacterias control nº 1 - este conjunto de bacterias control se trató como los aislados de ensayo anteriores de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* y género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*); las bacterias control se sometieron a las mismas condiciones que los aislados de ensayo de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* y género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*). Este conjunto de bacterias control era para determinar si había diferencia en las CMI llevando a cabo las determinaciones de la CMI en eritrocitos lisados de caballo al 2% y con el método convencional realizado en caldo Mueller-Hinton.

Conjunto de bacterias control nº 2 - las bacterias control se añadieron a 5 ml de caldo Mueller-Hinton sin los eritrocitos lisados de caballo al 2% para lograr la concentración de siembra estándar. Este conjunto de bacterias control es el control normal para determinar si los compuestos PMX están en las CMI objetivo.

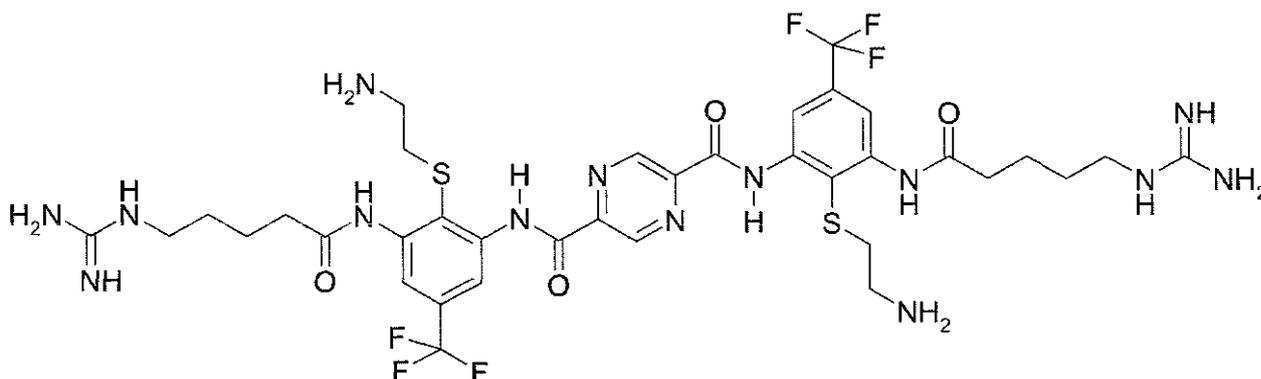
El día del ensayo, los cultivos de caldo bacteriano de una noche del género *Haemophilus* se diluyeron en 5 ml de caldo tripticasa de soya para dar una turbidez igual a un estándar 0,5 de McFarland. La siembra final para el ensayo de la CMI para el género *Haemophilus* se logró poniendo 0,1 ml de la muestra de turbidez ajustada hasta 5 ml de medio HTM.

Conjunto de bacterias control nº 1 - este conjunto de bacterias control se trató como los aislados de ensayo anteriores de *Haemophilus influenzae*; las bacterias control se sometieron a las mismas condiciones que los aislados de ensayo de *Haemophilus influenzae*. Este conjunto de bacterias control es para determinar si había diferencia en las CMI llevando a cabo las determinaciones de las CMI en el caldo de HTM y con el método convencional realizado en caldo Mueller-Hinton.

Conjunto de bacterias control nº 2 - las bacterias control se añadieron a 5 ml de caldo Mueller-Hinton para lograr la concentración de siembra estándar. Este conjunto de bacterias control es el control normal para determinar si los compuestos PMX están en las CMI objetivo.

Se dispensaron 90 µl de las suspensiones bacterianas en cada pocillo desde la columna 1 a la columna 12. Cada aislado bacteriano se puso en una fila de una placa de polipropileno de 96 pocillos que contenían los agentes de ensayo. Las placas se pusieron en un agitador 15 min a temperatura ambiente, y después se incubaron a 37°C durante la noche. Las CMI se determinaron visualmente como la concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano visible.

Las CMI de los 2 compuestos oligómero 4 y oligómero 5 se compararon estadísticamente con ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Duncan usando el software de estadística True Epistat statistical (True Epistat, Richardson, TX).



Oligómero 5 (comparativo)

Oligómero	CMI (ug/ml)	
	E. coli D31	S. aureus ATCC27660
Oligómero 4	0,78	0,098
Oligómero 5	1,56	0,78

Compuesto	<i>E. coli</i> Cepa de lab. D31	<i>S. aureus</i> ATCC 27660	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	<i>K. pneumoniae</i> Cepa de lab. KP10
Oligómero 4	0,78	0,098	0,78	12,5	0,78
Oligómero 5	1,56	0,78	1,56	>100	1,56

5 Los números de los aislados con una “K” antes del número indican que se han aislado de casos de queratitis. Los números de los aislados con una “E” antes del número indican que se han aislado de casos de endoftalmítis. Los números de los aislados con una “B” antes del número indican que se han aislado de casos de blefarítis y/o conjuntivitis. La mayoría de los aislados de *Streptococcus pneumoniae* son de casos de conjuntivitis. “Resistente a fluoroquinolona” indica que las bacterias son resistentes a la segunda generación de fluoroquinolonas ciprofloxacina y ofloxacina pero no necesariamente resistentes a la cuarta generación de fluoroquinolones gatifloxacina y moxifloxacina por referencias del suero de CLSI.

10

S. aureus sensible a fluoroquinolona CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - E402	0,25	0,5
2 - E1512	0,25	0,25
3 - E253	0,25	0,25
4 - K1518	0,25	0,125
5 - K1525	0,125	0,125
6 - K1663	0,5	0,125
7 - K1648	0,25	0,125
8 - K1646	0,25	0,25
9 - K1642	0,5	0,25
10 - K1638	0,5	0,25
11 - K1628	0,25	0,25
12 - K1618	0,5	0,125
13 - K1617	0,25	0,25
14 - K1611	0,25	0,25
15 - K1607	0,25	0,25
16 - K1600	0,25	0,125
17 - K1591	0,25	0,5
18 - K1585	0,25	0,25

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
19 - K1583	0,25	0,25
20 - K1574	0,25	0,25
21 - K1566	0,25	0,25
22 - K1551	0,25	0,125
23 - K1545	0,25	0,25
24 - K1540	0,25	0,25
25 - K1530	0,25	0,5
<i>E. coli</i> D31	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	2 (0,098)	16 (0,78)

Las CMI de las bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

S. aureus sensible a fluoroquinolona

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadísticas

Fila	Oligómero 4 QSSA-A	Oligómero 5 QSSA-A	
1	0,125	0,125	
2	0,250	0,125	
3	0,250	0,125	
4	0,250	0,125	
5	0,250	0,125	
6	0,250	0,125	
7	0,250	0,125	
8	0,250	0,250	
9	0,250	0,250	
10	0,250	0,250	
11	0,250	0,250	
12	0,250	0,250	
13	0,250	0,250	CMI ₅₀
14	0,250	0,250	
15	0,250	0,250	
16	0,250	0,250	
17	0,250	0,250	
18	0,250	0,250	
19	0,250	0,250	
20	0,250	0,250	

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 QSSA-A	Oligómero 5 QSSA-A	
21	0,250	0,250	
22	0,500	0,250	CMI ₉₀
23	0,500	0,500	
24	0,500	0,500	
25	0,500	0,500	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	ET de la media	Desv. típica	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 QSSA	25	0	0,2850	0,0198	0,0990	0,1250	0,2500	0,5000
Olig 5 QSSA	25	0	0,2450	0,0222	0,1111	0,1250	0,2500	0,5000

Resumen de los resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana de la CMI	Intervalo de CMI
Oligómero 4	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml
Oligómero 5	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 QSSA, Oligómero 5 QSSA

	N	Mediana
Olig 4 QSSA	25	0,2500
Olig 5 QSSA	25	0,2500

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 0,0000

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-0,0000, 0,1250)

W = 712,5

10 Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa en 0,1483

La prueba es significativa en 0,0731 NS (ajustado para empates)

S. aureus resistente a fluoroquinolona CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - E504	0,25	0,5
2 - E475	0,25	0,25
3 - E442	0,25	0,25
4 - E427	0,5	0,5
5 - E425	0,25	0,25
6 - E424	0,25	0,25
7 - E417	1	0,25

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
8 - E407	0,25	0,125
9 - E401	0,25	0,25
10 - K1659	0,25	0,25
11 - E96	0,125	0,25
12 - E379	0,5	0,5
13 - E369	0,125	0,5
14 - E361	0,25	0,25
15 - E339	0,25	0,25
16 - E333	0,25	0,125
17 - E332	0,25	0,25
18 - E327	0,5	0,25
19 - E325	0,5	0,25
20 - K950	0,5	0,25
21 - K839	0,25	0,25
22 - K1679	0,25	0,25
23 - K1677	0,25	0,5
24 - K1672	0,25	0,25
25 - K1670	0,25	0,25
<i>E. coli</i> D31	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	1 (0,098)	8 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

S. aureus resistente a fluoroquinolona

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Fila	Oligómero 4 QRSA-A	Oligómero 5 QRSA-A
1	0,125	0,125
2	0,125	0,125
3	0,250	0,250
4	0,250	0,250
5	0,250	0,250
6	0,250	0,250
7	0,250	0,250
8	0,250	0,250
9	0,250	0,250

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 QRSA-A	Oligómero 5 QRSA-A	
10	0,250	0,250	
11	0,250	0,250	
12	0,250	0,250	
13	0,250	0,250	CMI ₅₀
14	0,250	0,250	
15	0,250	0,250	
16	0,250	0,250	
17	0,250	0,250	
18	0,250	0,250	
19	0,250	0,250	
20	0,500	0,250	
21	0,500	0,500	
22	0,500	0,500	CMI ₉₀
23	0,500	0,500	
24	0,500	0,500	
25	1,000	0,500	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 QRSA	25	0	0,3200	0,0361	0,1807	0,1250	0,2500	1,0000
Olig 5 QRSA	25	0	0,2900	0,0225	0,1125	0,1250	0,2500	0,5000

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 1,0 µg/ml
Oligómero 5	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml

5 Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 QRSA, Oligómero 5 QRSA

	N	Mediana
Olig 4 QRSA	25	0,2500
Olig 5 QRSA	25	0,2500

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,0000

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-0,0000, 0,0000)

W = 651,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,7934

10 La prueba es significativa a 0,7450 NS (ajustado para empates)

Bacterias control

Durante los primeros conjuntos de CMI llevadas a cabo con *S. aureus* sensible a fluoroquinolona y *S. aureus* resistente a fluoroquinolona, las CMI para las bacterias control (*E. coli* D31, y *S. aureus* ATCC 27660) tanto para el

oligómero 4 como el oligómero 5 eran mucho mayores que las mostradas a continuación.

Aislado control	Control para el ensayo de la CMI	Oligómero 4	Oligómero 5
<i>E. coli</i> D31	SA-FQS	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SA-FQS	2 (0,098)	16 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SA-FQR	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SA-FQR	1 (0,098)	8 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

5 Se llevó a cabo un nuevo conjunto de CMI con nuevos lotes tanto para el oligómero 4 como el oligómero 5 y bacterias control, por cuadruplicado. Los resultados del experimento son los siguientes:

Control Aislado	Control para el ensayo de la CMI	Oligómero 4	Oligómero 5
<i>E. coli</i> D31	Solo control 1	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 1	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 2	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 2	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 3	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 3	0,25 (0,098)	0,5 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 4	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 4	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

10 Aunque las CMI para el oligómero 5 para *E. coli* D31 permanecían altas, las CMI para *S. aureus* ATCC 27660 tanto para el oligómero 4 como el oligómero 5 y el oligómero 4 para *E. coli* D31 estaban dentro del intervalo aceptable (1-2 diluciones dobles) de las CMI previamente obtenidas. Se decidió continuar con las determinaciones de CMI usando los nuevos lotes del oligómero 4 y el oligómero 5 para todas las determinaciones posteriores de CMI.

15 Puesto que las CMI tanto para el oligómero 4 como el oligómero 5 con *S. aureus* sensible a fluoroquinolona y *S. aureus* resistente a fluoroquinolona eran similares a la del control *S. aureus* ATCC 27660 llevada a cabo previamente, estas CMI llevadas a cabo con el primer lote de fármacos no se repetiría usando los nuevos lotes de compuestos.

Staphylococcus epidermidis (*Staphylococcus coagulasa* negativo) sensible a fluoroquinolona CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - E511	0,25	0,25
2 - E489	0,125	0,125
3 - E491	0,125	0,125
4 - E476	0,25	0,25
5 - E473	0,25	0,125
6 - E462	0,125	0,125
7 - E460	0,125	0,125
8 - E453	0,125	0,125

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
9 - E448	0,125	0,125
10 - 443	<0,0625	<0,0625
11 - E441	<0,0625	0,125
12 - E438	0,125	0,125
13 - E437	0,125	0,125
14 - E434	0,125	0,125
15 - E433	0,125	0,125
16 - E430	<0,0625	0,125
17 - E420	0,125	0,125
18 - E419	0,125	0,125
19 - E403	0,125	0,125
20 - E394	0,125	0,125
21 - E393	0,125	0,125
22 - E328	0,25	0,25
23 - E382	0,125	0,125
24 - E381	0,125	0,25
25 - E372	0,25	<0,0625
<i>E. coli</i> D31	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

Staphylococcus epidermidis (*Staphylococcus* coagulasa negativo) sensible a fluoroquinolona

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

- 5 Para fines de cálculos estadísticos, <0,0625 se sustituyó por 0,03125.

Fila	Oligómero 4 QSSE-A	Oligómero 5 QSSE-A
1	0,03125	0,03125
2	0,03125	0,03125
3	0,03125	0,12500
4	0,12500	0,12500
5	0,12500	0,12500
6	0,12500	0,12500
7	0,12500	0,12500
8	0,12500	0,12500
9	0,12500	0,12500
10	0,12500	0,12500

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 QSSE-A	Oligómero 5 QSSE-A	
11	0,12500	0,12500	
12	0,12500	0,12500	
13	0,12500	0,12500	CMI ₅₀
14	0,12500	0,12500	
15	0,12500	0,12500	
16	0,12500	0,12500	
17	0,12500	0,12500	
18	0,12500	0,12500	
19	0,12500	0,12500	
20	0,12500	0,12500	
21	0,25000	0,12500	
22	0,25000	0,25000	CMI ₉₀
23	0,25000	0,25000	
24	0,25000	0,25000	
25	0,25000	0,25000	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 QSSE	25	0	0,1388	0,0129	0,0645	0,0313	0,1250	0,2500
Olig 5 QSSE	25	0	0,1375	0,0113	0,0563	0,0313	0,1250	0,2500

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml
Oligómero 5	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 QSSE, Oligómero 5 QSSE

	N	Mediana
Olig 4 QSSE	25	0,12500
Olig 5 QSSE	25	0,12500

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 0,00000

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-0,00002,0,00000)

10 W = 638,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,9923

ES 2 538 479 T3

La prueba es significativa a 0,9902 NS (ajustado para empates)

Staphylococcus epidermidis (*Staphylococcus coagulasa* negativo) resistente a fluoroquinolona CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - E515	0,125	0,125
2 - E514	<0,0625	0,125
3 - E513	0,125	0,125
4 - E510	<0,0625	0,125
5 - E509	0,125	0,125
6 - E508	0,125	0,125
7 - E505	0,125	0,125
8 - E503	0,125	0,125
9 - E502	0,125	0,25
10 - E499	0,125	0,25
11 - E498	0,125	0,125
12 - E494	<0,0625	0,125
13 - E493	0,125	0,125
14 - E485	0,125	0,125
15 - E487	0,125	<0,0625
16 - E486	<0,0625	0,125
17 - E480	0,125	0,125
18 - E475	0,25	0,125
19 - E471	0,125	0,125
20 - E458	0,125	0,125
21 - E452	0,25	0,5
22 - E450	0,125	0,125
23 - E440	0,25	0,125
24 - E446	0,125	<0,0625
25 - E444	0,25	0,25
<i>E. coli</i> D31	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

5 *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativo *Staphylococcus*) resistente a fluoroquinolona

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Para fines de cálculos estadísticos, <0,0625 se sustituyó por 0,03125.

ES 2 538 479 T3

	Oligómero 4	Oligómero 5	
Fila	QRSE-A	QRSE-A	
1	0,03125	0,03125	
2	0,03125	0,03125	
3	0,03125	0,12500	
4	0,03125	0,12500	
5	0,12500	0,12500	
6	0,12500	0,12500	
7	0,12500	0,12500	
8	0,12500	0,12500	
9	0,12500	0,12500	
10	0,12500	0,12500	
11	0,12500	0,12500	
12	0,12500	0,12500	
13	0,12500	0,12500	CMI ₅₀
14	0,12500	0,12500	
15	0,12500	0,12500	
16	0,12500	0,12500	
17	0,12500	0,12500	
18	0,12500	0,12500	
19	0,12500	0,12500	
20	0,12500	0,12500	
21	0,12500	0,12500	
22	0,25000	0,25000	CMI ₉₀
23	0,25000	0,25000	
24	0,25000	0,25000	
25	0,25000	0,50000	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 QRSE	25	0	0,1300	0,0127	0,0636	0,0313	0,1250	0,2500
Olig 5 QRSE	25	0	0,1475	0,0179	0,0895	0,0313	0,1250	0,5000

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml

ES 2 538 479 T3

Oligómero 5 0,125 µg/ml 0,25 µg/ml 0,125 µg/ml 0,03125 - 0,5 µg/ml

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 QRSE, Oligómero 5 QRSE

	N	Mediana
Olig 4 QRSE	25	0,12500
Olig 5 QRSE	25	0,12500

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,00000

5 IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,00001,-0,00002)

W = 614,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,6624

La prueba es significativa a 0,5800 NS (ajustado para empates)

Serratia marcescens CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - K1681	32	>128
2 - K1674	32	>128
3 - K1558	4	>128
4 - K1538	16	>128
5 - K1503	32	>128
6 - K1216	4	>128
7 - K1496	8	>128
8 - K1481	2	>128
9 - K1470	32	>128
10 - K1468	2	>128
11 - K1467	32	>128
12 - K1462	16	>128
13 - K1461	8	128
14 - K1413	16	>128
15 - K1402	0,25	8
16 - K1357	1	>128
17 - K1351	0,5	64
18 - K1327	8	>128
19 - K1321	8	>128
20 - K1315	16	>128
21 - K1306	8	>128

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
22 - K1290	8	>128
23 - K1265	8	>128
24 - K1263	8	>128
25 - K1239	8	>128
<i>E. coli</i> D31	0,5 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	0,25 (0,098)	0,5 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

Serratia marcescens

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

- 5 Para fines de cálculos estadísticos, > 128 se sustituyó por 256.

Fila	Oligómero 4 SM-A	Oligómero 5 SM-A	
1	0,25	8	
2	0,50	64	
3	1,00	128	
4	2,00	256	
5	2,00	256	
6	4,00	256	
7	4,00	256	
8	8,00	256	
9	8,00	256	
10	8,00	256	
11	8,00	256	
12	8,00	256	
13	8,00	256	CMI ₅₀
14	8,00	256	
15	8,00	256	
16	8,00	256	
17	16,00	256	
18	16,00	256	
19	16,00	256	
20	16,00	256	
21	32,00	256	
22	32,00	256	CMI ₉₀
23	32,00	256	

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 SM-A	Oligómero 5 SM-A
24	32,00	256
25	32,00	256

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 SM	25	0	12,39	2,21	11,04	0,25	8,00	32,00
Olig 5 SM	25	0	233,3	13,0	65,1	8,0	256,0	256,0

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	8 µg/ml	32 µg/ml	8 µg/ml	0,25 - 32 µg/ml
Oligómero 5	256 µg/ml	256 µg/ml	256 µg/ml	8 - 256 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 SM, Oligómero 5 SM

	N	Mediana
Olig 4 SM	25	8,00
Olig 5 SM	25	256,00

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -248,00

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-247,98,-239,99)

10 W = 338,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0000

La prueba es significativa a 0,0000 (ajustado para empates)

Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

Pseudomonas aeruginosa CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - K1673	2	32
2 - K1668	2	64
3 - K1662	2	64
4 - K1657	2	64
5 - K1651	4	128
6 - K1649	4	64
7 - K1564	8	>128
8 - K1636	0,5	4,0
9 - K1634	2	128

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
10 - K1633	4	64
11 - K1632	4	64
12 - K1631	8	64
13 - K1629	4	64
14 - K1627	2	64
15 - K1626	8	128
16 - K1625	4	64
17 - K1562	4	128
18 - K1613	4	32
19 - K1553	2	128
20 - K1594	2	64
21 - K1588	4	128
22 - K1554	4	128
23 - K1580	2	32
24 - K1577	2	64
25 - K1576	4	128
<i>E. coli</i> D31	0,5 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	0,5 (0,098)	0,25 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

Pseudomonas aeruginosa

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

- 5 Para fines de cálculos estadísticos, > 128 se sustituyó por 256.

Fila	Oligómero 4 PA-A	Oligómero 5 PA-A
1	0,5	4
2	2,0	32
3	2,0	32
4	2,0	32
5	2,0	64
6	2,0	64
7	2,0	64
8	2,0	64
9	2,0	64
10	2,0	64
11	2,0	64

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 PA-A	Oligómero 5 PA-A	
12	4,0	64	
13	4,0	64	CMI ₅₀
14	4,0	64	
15	4,0	64	
16	4,0	64	
17	4,0	128	
18	4,0	128	
19	4,0	128	
20	4,0	128	
21	4,0	128	
22	4,0	128	CMI ₀
23	8,0	128	
24	8,0	128	
25	8,0	256	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 PA	25	0	3,540	0,398	1,989	0,500	4,000	8,000
Olig 5 PA	25	0	85,9	10,4	51,8	4,0	64,0	256,0

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml	0,5 - 8 µg/ml
Oligómero 5	64 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	4 - 256 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 PA, Oligómero 5 PA

	N	Mediana
Olig 4 PA	25	4,00
Olig 5 PA	25	64,00

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -62,00

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-120,00,-60,00)

10 W = 333,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0000

La prueba es significativa a 0,0000 (ajustado para empates)

ES 2 538 479 T3

Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

Streptococcus pneumoniae CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - B1386	>64	>64
2 - B1380	1	4
3 - B1378	1	0,5
4 - B1377	2	8
5 - B1373	1	8
6 - B1367	1	16
7 - B1355	2	8
8 - B1353	1	4
9 - B1351	1	1
10 - B1339	1	2
11 - B1337	0,5	1
12 - B1335	2	1
13 - B1334	1	1
14 - B1333	1	1
15 - B1255	0,5	1
16 - B1288	1	8
17 - B1287	1	16
18 - B1272	0,5	1
19 - B1264	0,5	1
20 - B1252	1	16
21 - B1245	0,5	2
22 - B1211	1	8
23 - B1213	1	16
24 - B1208	0,5	8
25 - B1214	1	4
<i>E. coli</i> D31*	2	2
<i>S. aureus</i> ATCC 27660*	1	1
<i>E. coli</i> D31**	0,5 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660**	0,25 (0,098)	2 (0,78)

*Conjunto de bacterias control nº 1; ** Conjunto de bacterias control nº2; (las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis).

5

Streptococcus pneumoniae

ES 2 538 479 T3

Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Para fines de cálculos estadísticos, > 64 se sustituyó por 128.

Fila	Oligómero 4 SP-A	Oligómero 5 SP-A	
1	0,5	0,5	
2	0,5	1,0	
3	0,5	1,0	
4	0,5	1,0	
5	0,5	1,0	
6	0,5	1,0	
7	1,0	1,0	
8	1,0	1,0	
9	1,0	1,0	
10	1,0	2,0	
11	1,0	2,0	
12	1,0	4,0	
13	1,0	4,0	CMI ₅₀
<hr/>			
14	1,0	4,0	
15	1,0	8,0	
16	1,0	8,0	
17	1,0	8,0	
18	1,0	8,0	
19	1,0	8,0	
20	1,0	8,0	
21	1,0	16,0	
22	2,0	16,0	CMI ₉₀
<hr/>			
23	2,0	16,0	
24	2,0	16,0	
25	128,0	128,0	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 SP	25	0	6,08	5,08	25,40	0,50	1,00	128,00
Olig 5 SP	25	0	10,58	5,01	25,05	0,50	4,00	128,00

ES 2 538 479 T3

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	1 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml
Oligómero 5	4 µg/ml	16 µg/ml	4 µg/ml	4 - 128 µg/ml

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 SP, Oligómero 5 SP

	N	Mediana
Olig 4 SP	25	1,000
Olig 5 SP	25	4,000

5 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -3,000

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-6,999,-0,499)

W = 457,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0005

La prueba es significativa a 0,0002 (ajustado para empates)

10 Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

Grupo de *Streptococcus viridans* CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - K1684	2	8
2 - K1680	4	64
3 - E546	1	8
4 - E272	2	16
5 - E506	16	>64
6 - E496	1	0,5
7 - E456	4	16
8 - E432	4	8
9 - E423	4	>64
10 - E418	8	>64
11 - E412	2	8
12 - E409	8	32
13 - E405	4	>64
14 - E404	32	>64
15 - E396	16	32
16 - E262	1	4
17 - E362	4	16

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
18 - E359	4	32
19 - E348	8	16
20 - E344	4	4
21 - E308	4	4
22 - E294	4	2
23 - E292	4	0,5
24 - E285	4	0,5
25 - E265	1	8
<i>E. coli</i> D31 *	2	2
<i>S. aureus</i> ATCC 27660*	2	1
<i>E. coli</i> D31**	0,5 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660**	1 (0,098)	1 (0,78)

*Conjunto de bacterias control nº 1; ** Conjunto de bacterias control nº2 (las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis).

Grupo de *Streptococcus viridans*

5 Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Para fines de cálculos estadísticos, > 64 se sustituyó por 128.

Fila	Oligómero 4 SV-A	Oligómero 5 SV-A
1	1	0,5
2	1	0,5
3	1	0,5
4	1	2,0
5	2	4,0
6	2	4,0
7	2	4,0
8	4	8,0
9	4	8,0
10	4	8,0
11	4	8,0
12	4	8,0
13	4	16,0
14	4	16,0
15	4	16,0
16	4	16,0

CMI₅₀

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 SV-A	Oligómero 5 SV-A
17	4	32,0
18	4	32,0
19	4	32,0
20	8	64,0
21	8	128,0
22	8	128,0
23	16	128,0
24	16	128,0
25	32	128,0

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 SV	25	0	5,84	1,34	6,72	1,00	4,00	32,00
Olig 5 SV	25	0	36,78	9,72	48,59	0,50	16,00	128,00

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	1 - 32 µg/ml
Oligómero 5	16 µg/ml	128 µg/ml	16 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 SV, Oligómero 5 SV

	N	Mediana
Olig 4 SV	25	4,00
Olig 5 SV	25	16,00

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -7,00

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-23,99,-3,01)

10 W = 487,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0037

La prueba es significativa a 0,0031 (ajustado para empates)

Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

Género *Moraxella* y *Moraxella catarrhalis* combinados

15 MS = género *Moraxella*; MC = *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - K1614 - MS	16	64

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
2 - K1661 - MS	32	16
3 - K1643 - MS	64	0,125
4 - K1640 - MS	8,0	8,0
5 - B1431 - MS	32	0,5
6 - B1429 - MS	1	1
7 - B1418 - MS	32	0,25
8 - K1784 - MS	64	0,25
9 - K1773 - MS	64	0,25
10 - K1369 - MS	2,0	2,0
11 - B1275 - MS	2,0	0,125
12 - B1221 - MS	2,0	0,125
13 - B1172 - MS	>64	>64
14 - E542 - MS	2,0	2,0
15 - K678 - MS	2,0	0,5
16 - K660 - MS	2,0	0,25
17 - K599 - MC	0,5	0,25
18 - K1650 - MC	64	0,25
19 - K1373 - MC	1,0	0,125
20 - K1553 - MC	4,0	2,0
21 - K1453 - MC	4,0	64
22 - K1227 - MC	2,0	1,0
23 - B1102 - MC	1,0	0,5
24 - K1819 - MC	4,0	32
25 - K1855 - MC	2,0	8,0
<i>E. coli</i> D31 *	4	2
<i>S. aureus</i> ATCC 27660*	1	1
<i>E. coli</i> D31**	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660**	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)

*Conjunto de bacterias control nº 1; ** Conjunto de bacterias control nº2 (las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis).

Género *Moraxella* y *Moraxella catarrhalis* combinados

5 Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Para fines de cálculos estadísticos, > 64 se sustituyó por 128.

Fila Oligómero 4 MS-A Oligómero 5 MS-A

ES 2 538 479 T3

Fila	Oligómero 4 MS-A	Oligómero 5 MS-A	
1	0,5	0,125	
2	1,0	0,125	
3	1,0	0,125	
4	1,0	0,125	
5	2,0	0,250	
6	2,0	0,250	
7	2,0	0,250	
8	2,0	0,250	
9	2,0	0,250	
10	2,0	0,250	
11	2,0	0,500	
12	2,0	0,500	
13	4,0	0,500	CMI ₅₀
<hr/>			
14	4,0	1,000	
15	4,0	1,000	
16	8,0	2,000	
17	16,0	2,000	
18	32,0	2,000	
19	32,0	8,000	
20	32,0	8,000	
21	64,0	16,000	
22	64,0	32,000	CMI ₉₀
<hr/>			
23	64,0	64,000	
24	64,0	64,000	
25	128,0	128,000	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 MS	25	0	21,42	6,43	32,13	0,50	4,00	128,00
Olig 5 MS	25	0	13,26	6,00	30,00	0,13	0,50	128,00

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	64 µg/ml	4 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml
Oligómero 5	0,5 µg/ml	32 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 - 128 µg/ml

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 MS, Oligómero 5 MS

	N	Mediana
Olig 4 MS	25	4,00
Olig 5 MS	25	0,50

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 1,75

5 IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,75,6,00)

W = 785,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0043

La prueba es significativa a 0,0040 (ajustado para empates)

Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

10 *Haemophilus influenzae* CMI µg/ml

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
1 - B1359	8	>64
2 - B1346	8	>64
3 - B1345	8	>64
4 - B1343	8	>64
5 - B1338	4	16
6 - B1332	8	64
7 - B1331	8	>64
8 - B1330	8	>64
9 - B1379	16	8
10 - B1378	8	4
11 - B1313	4	2
12 - B1477	8	4
13 - B1286	8	2
14 - B1282	32	8
15 - B1291	8	16
16 - B1280	8	16
17 - B1279	16	64
18 - B1260	8	16
19 - B1238	2	8
20 - B1209	4	8
21 - B1249	4	16

ES 2 538 479 T3

Aislado	Oligómero 4	Oligómero 5
22 - B1248	8	4
23 - B1244	8	32
24 - B1419	4	32
25 - B1222	8	>64
<i>E. coli</i> D31	8	16
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	4	4
<i>E. coli</i> D31	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)

*Conjunto de bacterias control nº 1; ** Conjunto de bacterias control nº2 (las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis).

Haemophilus influenzae

5 Determinaciones de CMI₅₀ y CMI₉₀ y estadística

Para fines de cálculos estadísticos, > 64 se sustituyó por 128.

	Oligómero 4	Oligómero 5	
Fila	HI-A	HI-A	
1	2	2	
2	4	2	
3	4	4	
4	4	4	
5	4	4	
6	4	8	
7	8	8	
8	8	8	
9	8	8	
10	8	16	
11	8	16	
12	8	16	
13	8	16	CMI ₅₀
14	8	16	
15	8	32	
16	8	32	
17	8	64	
18	8	64	
19	8	128	

ES 2 538 479 T3

	Oligómero 4	Oligómero 5	
Fila	HI-A	HI-A	
20	8	128	
21	8	128	
22	8	128	CMI ₅₀
23	16	128	
24	16	128	
25	32	128	

Estadística descriptiva

Variable	N	N*	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Olig 4 HI	25	0	8,56	1,16	5,82	2,00	8,00	32,00
Olig 5 HI	25	0	48,6	10,6	53,0	2,0	16,0	128,0

Resumen de resultados

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	2 - 32 µg/ml
Oligómero 5	16 µg/ml	128 µg/ml	16 µg/ml	2 - 128 µg/ml

5

Prueba de Mann-Whitney e IC: Oligómero 4 HI, Oligómero 5 HI

	N	Mediana
Olig 4 HI	25	8,00
Olig 5 HI	25	16,00

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -8,00

IC al 95,2 por ciento para ETA1-ETA2 es (-56,00,0,00)

10 W = 493,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0054

La prueba es significativa a 0,0038 (ajustado para empates)

Oligómero 4 > Oligómero 5 (más potente > menos potente)

Resumen de resultados

15 Determinaciones de CMI de bacterias control de cada día del ensayo de CMI

CIM [µg/ml]

Control Aislado	Control para el ensayo de la CMI	Oligómero 4	Oligómero 5
<i>E. coli</i> D31	SA-FQS	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SA-FQS	2 (0,098)	16 (0,78)

ES 2 538 479 T3

Control Aislado	Control para el ensayo de la CMI	Oligómero 4	Oligómero 5
<i>E. coli</i> D31	SA-FQR	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SA-FQR	1 (0,098)	8 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 1	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 1	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 2	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 2	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 3	1 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 3	0,25 (0,098)	0,5 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	Solo control 4	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	Solo control 4	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SE-FQS	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SE-FQS	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SE-FQR	1 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SE-FQR	0,25 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SM	0,5 (0,78)	4 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SM	0,25 (0,098)	0,5 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	PA	0,5 (0,78)	8 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	PA	0,5 (0,098)	0,25 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SP	0,5 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SP	0,25 (0,098)	2 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	SV	0,5 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	SV	1 (0,098)	1 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	MS	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	MS	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)
<i>E. coli</i> D31	HI	1 (0,78)	16 (1,56)
<i>S. aureus</i> ATCC 27660	HI	0,5 (0,098)	0,5 (0,78)

Las CMI para bacterias control (*E. coli*, *S. aureus*) están entre paréntesis.

Resumen de los resultados de CMI (n = 25 por grupo)

S. aureus sensible a fluoroquinolona

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml
Oligómero 5	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml

ES 2 538 479 T3

S. aureus resistente a fluoroquinolona

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 1,0 µg/ml
Oligómero 5	0,25 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 - 0,5 µg/ml

Staphylococcus epidermidis (*Staphylococcus coagulasa* negativo) sensible a FQ

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml
Oligómero 5	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml

Staphylococcus epidermidis (*Staphylococcus coagulasa* negativo) resistente a FQ

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,25 µg/ml
Oligómero 5	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,03125 - 0,5 µg/ml

Serratia marcescens

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	8 µg/ml	32 µg/ml	8 µg/ml	0,25 - 32 µg/ml
Oligómero 5	256 µg/ml	256 µg/ml	256 µg/ml	8 - 256 µg/ml

Pseudomonas aeruginosa

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	4 µg/ml	4 µg/ml	0,5 - 8 µg/ml
Oligómero 5	64 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	4 - 256 µg/ml

5

Streptococcus pneumoniae

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	1 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml
Oligómero 5	4 µg/ml	16 µg/ml	4 µg/ml	4 - 128 µg/ml

Grupo *Streptococcus viridans*

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	1 - 32 µg/ml
Oligómero 5	16 µg/ml	128 µg/ml	16 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml

Género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*)

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	4 µg/ml	64 µg/ml	4 µg/ml	0,5 - 128 µg/ml
Oligómero 5	0,5 µg/ml	32 µg/ml	0,5 µg/ml	0,125 - 128 µg/ml

Haemophilus influenzae

	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Mediana CMI	Intervalo de las CMI
Oligómero 4	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml	2 - 32 µg/ml
Oligómero 5	16 µg/ml	128 µg/ml	16 µg/ml	2 - 128 µg/ml

5 El oligómero 4 y oligómero 5 demostraron las CMI más bajas para *Staphylococcus aureus* sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus* coagulasa negativo) sensible a fluoroquinolona, *Staphylococcus epidermidis* (*Staphylococcus* coagulasa negativo) resistente a fluoroquinolona. Las determinaciones de la mediana de la CMI eran menores o iguales a 0,25 µg/ml para los compuestos contra los aislados oculares de estas especies. Las medianas de las CMI para el oligómero 4 y el oligómero 5 contra *Streptococcus pneumoniae* y el género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*) eran menores o iguales a 4 µg/ml. La mediana de la CMI para el oligómero 4 contra el grupo de *Streptococcus viridans* era 4 µg/ml mientras que la mediana de la CMI para el oligómero 5 era 16 µg/ml. El oligómero 4 y el oligómero 5 demostraron la CMI más alta contra los patógenos Gram negativos *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Haemophilus influenzae*. La mediana de la CMI del oligómero 4 contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Haemophilus influenzae* era 4, 8, y 8 µg/ml respectivamente. Las medianas de las CMI del oligómero 5 contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Haemophilus influenzae* eran 64, 128 y 16 µg/ml respectivamente. En general, las CMI para las bacterias control (*E. coli* D31 y *S. aureus* ATCC 27660) para cada fecha en la que se llevó a cabo la CMI estaban dentro de la referencia aceptable de un intervalo de dilución de 1-2 de CMI a partir de las CMI previamente obtenidas para estos compuestos y entre diferentes días de preparación. La adición de eritrocitos lisados de caballo al 2% al caldo Mueller-Hinton para el ensayo de la CMI con *Streptococcus pneumoniae*, género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*), y grupo *Streptococcus viridans* parecía disminuir la actividad del oligómero 4 contra las bacteria control (*E. coli* D31 y *S. aureus* ATCC 27660) en aproximadamente 4 veces. No se sabe si los eritrocitos lisados de caballo al 2% tenían el mismo efecto en los aislados de ensayo. La adición de eritrocitos lisados de caballo al 2% al caldo Mueller-Hinton para el ensayo de la CMI con *Streptococcus pneumoniae*, género *Moraxella* (incluyendo *Moraxella catarrhalis*), y grupo *Streptococcus viridans* parecía aumentar o no tener efecto en la actividad del oligómero 5 contra las bacterias control (*E. coli* D31 y *S. aureus* ATCC 27660). No se sabe si los eritrocitos lisados de caballo al 2% tenían el mismo efecto en los aislados de ensayo. El uso de caldo HTM para el ensayo de la CMI de *Haemophilus influenzae* parecía que disminuía la actividad del oligómero 4 y el oligómero 5 contra las bacterias control *S. aureus* ATCC 27660 en aproximadamente 8 veces. El uso del caldo HTM para el ensayo de la CMI de *Haemophilus influenzae* parecía que disminuía la actividad del oligómero 4 contra las bacterias control *E. coli* D31 en aproximadamente 8 veces pero parecía que no tenía efecto en la actividad del oligómero 5 contra las bacterias control *E. coli* D31.

35 El oligómero 4 y oligómero 5 demostraron las CMI más bajas contra una variedad de aislados bacterianos oculares Gram positivos y al menos una especie bacteriana ocular Gram negativa (*Moraxella*). El oligómero 4 y oligómero 5 demostraron actividad antibacteriana variable in vitro contra las tres especies que son las causas principales de la conjuntivitis (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Haemophilus influenzae*). El orden de las CMI menores para el oligómero 4 y el oligómero 5 contra las especies era: *Staphylococcus aureus* < *Streptococcus pneumoniae* < *Haemophilus influenzae*. (< = CMI menores). El oligómero 4 demostró menor CMI que el oligómero 5 para todas las especies bacterianas ensayadas exceptos para el género *Staphylococcus* (equipotentes) y para el género *Moraxella* (menos potente).

Ejemplo 3: Ker-3

40 Un propósito de los siguientes experimentos era determinar la eficacia del oligómero 4 al 0,25%, con y sin farnesol 200 µM, y del farnesol 200 µM en el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona y resistente a metilina en el modelo de queratitis de conejo NZW con o sin epitelio corneal intacto. El farnesol 200 µM se ha añadido para intentar aumentar la eficacia y la penetración del oligómero 4 al 0,25% a través del epitelio corneal.

45 Se recibieron 15 conejos de Myrtles' Rabbitry, Thompson Station, TN. El aislado clínico de *Staphylococcus aureus* (K950) resistente a fluoroquinolona y resistente a metilina (MRSA) se subcultivó en agar sangre de oveja al 5% y se incubó a 37°C en 6% de CO₂ durante la noche. A la mañana siguiente, la cepa de MRSA se suspendió en caldo tripticasa de soya estéril hasta una estándar 0,5 de McFarland, que contenía aproximadamente 5 x 10⁸ UFC/ml de

bacterias. La absorbancia de la suspensión se midió a 650 nm usando un espectrofotómetro Beckman DU-70. Las lecturas de DO de 0,07 correspondían a 5×10^8 UFC/ml de bacterias. Esta concentración se diluyó adecuadamente en caldo tripticasa de soya estéril para proporcionar el inóculo de aproximadamente 1.000 ($1,0 \times 10^3$) UFC/ojo en 25 μ l. Se llevaron a cabo recuentos de colonias en el inóculo para determinar las UFC reales inoculadas. Después de anestesia general con ketamina y xilazina y anestesia tópica con proparacaína y antes de la inoculación bacteriana en los ojos izquierdos, se retiraron del centro de los ojos izquierdos áreas de 6 mm del epitelio corneal con un cepillo epitelial de Amoils. No se hizo nada en los ojos derechos. Después se inocularon a los 15 conejos por vía intraestromal en ambos ojos 25 μ l de dilución bacteriana de aproximadamente 10^3 ufc/ojo de las bacterias. La inoculación bacteriana de los ojos izquierdos era directamente bajo el defecto de epitelio creado por el cepillo epitelial de Amoils. Los epitelios de las córneas izquierdas se retiraron con el fin de determinar si la capa de la córnea es una barrera para la penetración del fármaco cuando se comparaba con la córnea derecha con un epitelio intacto. Se hizo un recuento de colonias en el inóculo para determinar las UFC reales inoculadas. Los conejos se trataron inmediatamente con analgesia en forma de una inyección intramuscular de ketoprofeno, 1,5 mg/kg. Después de 4 horas, los 15 conejos se dividieron en 4 grupos de tratamiento y un grupo de control no tratado sacrificado al inicio del tratamiento. Ambos ojos de cada conejo del grupo de tratamiento se trataron con una gota de 37 μ l de las soluciones de PMX o solución salina control.

Grupos:

Grupo	Ojo izquierdo	Ojo derecho	Rx - ambos ojos	Régimen de tratamiento	Conejo nº
I	Epitelio erosionado	Epitelio intacto	Oligómero 4 al 0,25% (PMX)	Cada 15 min durante 5 horas (21 dosis en total)	1-3
II	Epitelio erosionado	Epitelio intacto	Oligómero 4 al 0,25% + Farnesol 200 μ M (P+F)	Cada 15 min durante 5 horas (21 dosis en total)	4-6
III	Epitelio erosionado	Epitelio intacto	Farnesol 200 μ M (FARN)	Cada 15 min durante 5 horas (21 dosis en total)	7-9
IV	Epitelio erosionado	Epitelio intacto	Solución salina tamponada con Tris (CON)	Cada 15 min durante 5 horas (21 dosis en total)	10-12
V	Epitelio erosionado	Epitelio intacto	Sacrificio al inicio del tratamiento (4 horas PI) (INICIO)	Ninguno	13-15

El tratamiento se planificó para cada 15 min durante 5 h (21 dosis en total). Los 3 conejos del grupo V se sacrificaron 4 horas PI y se sacaron botones corneales grandes de 9,5 mm de las córneas. Se pusieron en 1 ml de PBS y se mantuvieron en hielo. Los botones corneales se homogeneizaron durante 25 segundos sobre hielo usando el homogeneizador motorizado. Después de homogeneización, se hicieron los recuentos de colonias en los homogeneizados usando placas de agar sangre de oveja al 5% para determinar la cantidad de bacterias contenidas en las córneas al inicio del tratamiento. Tras completarse el tratamiento, se examinaron los signos clínicos de infección en los ojos. Una hora después del tratamiento final, los conejos tratados (grupos I-IV) se sacrificaron y se sacaron botones grandes de 9,5 mm de las córneas. Se pusieron en 1 ml de PBS y se mantuvieron en hielo. Los botones corneales se homogeneizaron durante 25 segundos sobre hielo usando el homogeneizador motorizado. Después de homogeneización, se hicieron los recuentos de colonias en los homogeneizados usando placas de agar sangre de oveja al 5% para determinar la cantidad de bacterias contenidas en las córneas después del tratamiento. A la mañana siguiente se hizo el recuento de las placas y se determinó el número de UFC/ojo de *Staphylococcus aureus* para cada córnea.

Formulaciones: 1) Oligómero 2 al 0,25% (PMX): El tubo G1 del oligómero 2 en polvo se almacenó a 4°C hasta su uso. Cuando se usó, el tubo se sacó del frigorífico y se añadieron 3,28 ml de S1 (agua estéril para inyección) y se agitó en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente. Después se añadieron 3,28 ml de S2 (2X TBS) y se agitó en vórtex durante 10 segundos. Esta solución se denominó PMX. Se instilaron gotas de 37 μ l usando un equipo de pipeta electrónica Rainin ED en el modo de dispensaciones múltiples; 2) Oligómero 2 al 0,25% con farnesol 200 μ M (P+F): El tubo G2 del oligómero 2 en polvo se almacenó a 4°C hasta su uso. Cuando se usó, el tubo se sacó del frigorífico y se añadieron 3,33 ml de S1 (agua estéril para inyección) y se agitó en vórtex hasta que el sólido se había disuelto completamente. Después se añadieron 3,33 ml de S3 (farnesol 400 μ M + propilenglicol al 2% en 2X TBS) y se agitó en vórtex durante 10 segundos. Esta solución se denominó P+F. Se instilaron gotas de 37 μ l usando un equipo de pipeta electrónica Rainin ED en el modo de dispensaciones múltiples; 3) Farnesol 200 μ M (FARN): El tubo G3 que contenía aproximadamente 8 ml de farnesol 200 μ M en propilenglicol al 1% (PG) y TBS se almacenó a 4°C hasta su uso. Esta solución se denominó FARN. Se instilaron gotas de 37 μ l usando un equipo de pipeta electrónica Rainin ED en el modo de dispensaciones múltiples; 4) Control (solución salina tamponada con Tris, CON): El tubo G4 que contenía aproximadamente 8 ml de solución salina tamponada con Tris (TRIS 10 mM,

NaCl 150 mM, pH=7,4) se almacenó a 4°C hasta su uso. Esta solución se denominó CON. Se instilaron gotas de 37 µl usando un equipo de pipeta electrónica Rainin ED en el modo de dispensaciones múltiples.

Protocolo de IACUC n° 0701145-1. "The *In Vivo* Evaluation of Biomimetics as Topical Ocular Antibiotics".

5 Caracterización de CMI de la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina K950

Antibiótico CMI [µg/ml] (Concentración inhibidora mínima)

Oligómero 4 0,5 µg/ml

Régimen de gotas

Gota n°	Tiempo	Hora del día
1	0	9:30
2	:15	9:45
3	:30	10:00
4	:45	10:15
5	1:00	10:30
6	1:15	10:45
7	1:30	11:00
8	1:45	11:15
9	2:00	11:30
10	2:15	11:45
11	2:30	12:00
12	2:45	12:15
13	3:00	12:30
14	3:15	12:45
15	3:30	1:00
16	3:45	1:15
17	4:00	1:30
18	4:15	1:45
19	4:30	2:00
20	4:45	2:15
21	5:00	2:30

Sacrificio de los conejos 1 hora después de la gota final (3:30).

10 Definiciones de las abreviaturas

PMX-IE Oligómero 4 al 0,25% con epitelio intacto

PMX-AE Oligómero 4 al 0,25% con epitelio erosionado

P+F-IE Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 200 µM con epitelio intacto

P+F-AE Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 200 µM con epitelio erosionado

FARN-IE Farnesol 200 µM con epitelio intacto

FARN-AE Farnesol 200 µM con epitelio erosionado

CON-AE Solución salina tamponada con Tris con epitelio erosionado

CON-IE Solución salina tamponada con Tris con epitelio intacto

5 Evaluación clínica - Resultados

Ojo	Grupo	Conj.	Quemosis	Descruga	Iritis	Edema corneal	Infiltrado corneal	Puntuación total
1D	PMX-IE	2,5	2,5	2,0	2,0	1,0	2,0	12,0
2D	PMX-IE	2,0	2,0	2,0	2,0	0,5	0,5	9,0
3D	PMX-IE	2,0	2,0	2,0	2,0	0,5	1,0	9,5
1I	PMX-AE	2,0	2,5	3,0	2,0	1,5	0	11,0
2I	PMX-AE	2,0	2,0	3,0	2,0	0,5	0	9,5
3I	PMX-AE	2,0	2,0	2,5	1,5	1,0	0	9,0
4D	P+F-IE	1,5	1,5	1,5	1,0	0,5	0,5	6,5
5D	P+F-IE	2,0	1,5	1,5	2,0	1,0	2,5	10,5
6D	P+F-IE	2,0	2,0	2,5	2,0	1,0	1,5	11,0
4I	P+F-AE	2,0	2,0	2,0	1,5	1,0	0	8,5
5I	P+F-AE	2,5	2,5	2,5	2,0	1,0	0	10,5
6I	P+F-AE	2,0	2,5	3,0	2,0	1,0	0	10,5
7D	FARN-IE	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	2,0	9,0
8D	FARN-IE	1,5	1,0	1,0	1,5	0,5	1,5	7,0
9D	FARN-IE	1,5	1,5	1,5	2,0	1,0	2,0	9,5
7I	FARN-AE	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,0	11,0
8I	FARN-AE	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	0,5	7,5
9I	FARN-AE	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0	8,0
10D	CON-IE	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	6,5
11D	CON-IE	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	6,5
12D	CON-IE	1,5	1,5	1,0	2,0	1,0	2,0	9,0
10I	CON-AE	1,0	1,5	2,0	1,0	0,5	0	6,0
11I	CON-AE	1,5	1,5	2,0	1,5	1,5	1,0	9,0
12I	CON-AE	1,5	1,5	2,0	1,5	1,5	1,0	9,0

Escala 0 = Normal; 0,5 = indicio; 1,0 = leve; 1,5 = leve/moderado; 2,0 = moderado; 2,5 = moderado/grave; 3,0 = grave

Evaluación clínica - Estadística

Estadística descriptiva Puntuación ocular total

Total

ES 2 538 479 T3

Variable	Recuento	Media	EE de la media	Desv. estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Puntuación de PMX-IE	3	10,167	0,928	1,607	9,000	9,500	12,000
Puntuación de PMX-AE	3	9,833	0,601	1,041	9,000	9,500	11,000
Puntuación de P+F-IE	3	9,33	1,42	2,47	6,50	10,50	11,00
Puntuación de P+F-AE	3	9,833	0,667	1,155	8,500	10,500	10,500
Puntuación de FARN-IE	3	8,500	0,764	1,323	7,000	9,000	9,500
Puntuación de FARN-AE	3	8,83	1,09	1,89	7,50	8,00	11,00
Puntuación de CON-IE	3	7,333	0,833	1,443	6,500	6,500	9,000
Puntuación de CON-AE	3	8,00	1,00	1,73	6,00	9,00	9,00

Prueba de comparaciones múltiples de Duncan Puntuación total

Fila nº	Grupo/Nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C	
1	CON-IE Sco	5,8333	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,	
2	CON-AE Sco	8,0000	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8,	
3	FARN-IE Sc	10,8333	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8,	
4	FARN-AE Sc	11,6667	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8,	P=0,05
5	P+F-IE Sco	14,6667	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8,	
6	P+F-AE Sco	15,3333	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8,	
7	PMX-AE Sco	16,5000	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8,	
8	PMX-IE Sco	17,1667	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,	

No hay diferencias entre los grupos

Resultados microbiológicos

5 Inóculo = 1098 UFC/córnea

Presentación de datos UFC/ml

Fila	PMX-IE	PMX-AE	P+F-IE	P+F-AE	FARN-IE	FARN-AE	CON-IE	CON-AE
1	1650000	0	50	9500	45200000	7750000	115000000	30500
2	12500	12500	13600000	50	18600000	6650000	253000000	69000000
3	92000	350	5200000	8050	21400000	8250000	15000000	176000000

Fila Inicio-IE Inicio-AE

1	75000	118000
2	59000	61000
3	55500	2500

ES 2 538 479 T3

Presentación de datos		Log ₁₀ UFC/ml				
Fila	PMX-IE Log	PMX-AE Log	P+F-IE Log	P+F-AE Log	FARN-IE Log	FARN-AE Log
1	6,21748	0,00000	1,69897	3,97772	7,65514	6,88930
2	4,09691	4,09691	7,13354	1,69897	7,26951	6,82282
3	4,96379	2,54407	6,71600	3,90580	7,33041	6,91645

		Inicio-IE Inicio-AE	
Fila	CON-IE Log	CON-AE Log	Log Log
1	8,06070	4,48430	4,87506 5,07188
2	8,40312	7,83885	4,77085 4,78533
3	7,17609	8,24551	4,74429 3,39794

Estadística descriptiva		Log ₁₀ UFC/ml						
Total		Recuento	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Variable								
PMX-IE Log		3	5,093	0,616	1,066	4,097	4,964	6,217
PMX-AE Log		3	2,21	1,19	2,07	0,00	2,54	4,10
P+F-IE Log		3	5,18	1,75	3,02	1,70	6,72	7,13
P+F-AE Log		3	3,194	0,748	1,295	1,699	3,906	3,978
FARN-IE Log		3	7,418	0,120	0,207	7,270	7,330	7,655
FARN-AE Log		3	6,8762	0,0278	0,0482	6,8228	6,8893	6,9165
CON-IE Log		3	7,880	0,366	0,633	7,176	8,061	8,403
CON-AE Log		3	6,86	1,19	2,06	4,48	7,84	8,25
Inicio-IE Log		3	4,7967	0,0399	0,0691	4,7443	4,7709	4,8751
Inicio-AE Log		3	4,418	0,517	0,895	3,398	4,785	5,072

Resultados microbiológicos - Epitelio intacto

5 ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Duncan - Log₁₀ UFC/ml

Fila nº	Grupo/Nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C
1	Inicio-IE L	4,0000	2,3,
2	PMX-IE Log	5,0000	1,3,
3	P+F-IE Log	6,0000	1,2, P=0,05
4	FARN-IE Lo	12,0000	5,
5	CON-IE Log	13,0000	4,

INICIO = PMX = P+F < FARN = CON

Resultados microbiológicos - Epitelio erosionado

ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Duncan - Log₁₀ UFC/ml

Fila nº	Grupo/Nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C
1	PMX-AE Log	3,6667	2,3,
2	P+F-AE Log	4,3333	1,3,
3	Inicio-AE L	7,6667	1, 2, P=0,05
4	FARN-AE Lo	12,0000	5,
5	CON-AE Log	12,3333	4,

PMX = P+F = INICIO < FARN = CON

Resultados microbiológicos - Oligómero 4 al 0,25% sin FARN frente a con FARN - Epitelio intacto

Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-IE Log, P+F-IE Log

	N	Mediana
PMX-IE Log	3	4,964
P+F-IE Log	3	6,716

5

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,916

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (-3,034,4,518)

W = 9,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,6625 NS

10 Resultados microbiológicos - Oligómero 4 al 0,25% sin FARN frente a con FARN - Epitelio erosionado

Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-AE Log, P+F-AE Log

	N	Mediana
PMX-AE Log	3	2,544
P+F-AE Log	3	3,906

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -1,362

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (-3,977,2,399)

15 W = 10,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 1,0000 NS

Resultados microbiológicos - Epitelio intacto frente a erosionado

Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-IE Log, PMX-AE Log

	N	Mediana
PMX-IE Log	3	4,964
PMX-AE Log	3	2,544

20 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 2,420

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,001,6,218)

W = 14,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,1266

La prueba es significativa a 0,1212 NS (ajustado para empates)

Prueba de Mann-Whitney e IC: P+F-IE Log, P+F-AE Log

	N	Mediana
P+F-IE Log	3	6,716
P+F-AE Log	3	3,906

5 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 2,810

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (-2,277,5,436)

W = 12,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,5127

La prueba es significativa a 0,5066 NS (ajustado para empates)

10 Prueba de Mann-Whitney e IC: FARN-IE Log, FARN-AE Log

	N	Mediana
FARN-IE Log	3	7,3304
FARN-AE Log	3	6,8893

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 0,4467

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,3532,0,8323)

W = 15,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0809 NS

15 Prueba de Mann-Whitney e IC: CON-IE Log, CON-AE Log

	N	Mediana
CON-IE Log	3	8,061
CON-AE Log	3	7,839

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 0,222

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (-1,070,3,917)

W = 12,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,6625 NS

20 Prueba de Mann-Whitney e IC: Inicio-IE Log, Inicio-AE Log

	N	Mediana
Inicio-IE Log	3	4,771
Inicio-AE Log	3	4,785

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,015

IC al 91,9 por ciento para ETA1-ETA2 es (-0,328,1,477)

W = 10,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 1,0000 NS

25 Resumen de las comparaciones estadísticas para los datos microbiológicos

<= Recuentos de colonias significativamente menores

Efecto del epitelio erosionado en la eficacia de cada solución de ensayo o control de inicio

PMX Erosionado = Intacto

P+F Erosionado = Intacto

FARN Erosionado = Intacto

Control solución salina Erosionado = Intacto

Inicio de tratamiento control Erosionado = Intacto

Efecto de las soluciones de ensayo en córneas con epitelio intacto

5 INICIO = PMX = P+F < FARN = CON

Efecto de las soluciones de ensayo en córneas con epitelio erosionado

PMX = P+F = INICIO < FARN = CON

Efecto del farnesol en el oligómero 4 al 0,25% en las córneas de epitelio intacto

PMX = P+F

10 Efecto del farnesol en el oligómero 4 al 0,25% en las córneas de epitelio erosionado

PMX = P+F

Resumen de resultados

15 El oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) eran eficaces en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, comparados con la solución salina de control en el modelo de queratitis de conejo NZW cuando el epitelio corneal estaba intacto o se había retirado de las córneas. El oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) no eran eficaces en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, comparados con el inicio del tratamiento de control en el modelo de queratitis de conejo NZW cuando el epitelio corneal estaba intacto o se había retirado de las córneas. No había

20 diferencia en los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, en el modelo de queratitis de conejo NZW entre el oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) con epitelio corneal intacto o erosionado. El farnesol 200 mM solo no era eficaz en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, comparado con la solución salina de control en el modelo de queratitis de conejo NZW. El oligómero 4 al

25 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) y el farnesol 200 mM solo, no indujeron toxicidad estadísticamente mayor (como se pone de manifiesto por las puntuaciones oculares totales mayores) comparado con los ojos tratados con solución salina, en ojos con epitelio corneal intacto o erosionado.

30 El oligómero 4 biomimético solo o en combinación con farnesol 200 mM era eficaz en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, en el modelo de queratitis de conejo NZW comparado con la solución salina de control. Sin embargo, el oligómero 4 solo o en combinación con farnesol 200 mM no era eficaz en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, cuando el epitelio corneal estaba intacto o se había retirado comparado con el inicio del tratamiento de control en el modelo de queratitis de conejo NZW de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina, indicando que los compuestos no reducían significativamente la carga bacteriana presente al inicio del tratamiento. La adición de farnesol 200 mM no parecía ayudar a la penetración del oligómero 4 al 0,25% a través del epitelio corneal intacto en el sitio de la infección en el estroma corneal ni potenciaba su eficacia antibacteriana en el modelo de queratitis de conejo NZW de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina. En el estudio actual, el oligómero 4 solo o en combinación con el

35 farnesol 200 mM no inducía toxicidad significativamente mayor en ojos de conejo infectados comparado con el control tratado con solución salina en el modelo de queratitis de conejo NZW de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a metilicina. Los resultados de este estudio reproducen esencialmente los obtenidos en estudios previos.

Ejemplo 4: Ker-4

Definiciones de las abreviaturas

ES 2 538 479 T3

	PMX-IE	Oligómero 4 al 0,25% con epitelio intacto
	PMX-AE	Oligómero 4 al 0,25% con epitelio erosionado
	P+F-IE	Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 200 µM con epitelio intacto
	P+F-AE	Oligómero 4 al 0,25% + farnesol 200 µM con epitelio erosionado
5	FARN-IE	Farnesol 200 µM con epitelio intacto
	FARN-AE	Farnesol 200 µM con epitelio erosionado
	CON-AE	Solución salina tamponada con Tris con epitelio erosionado
	CON-IE	Solución salina tamponada con Tris con epitelio intacto

Evaluación clínica - Estadística

10 Presentación de datos Puntuación ocular total

Fila	PMX-IE	PMX-AE	P+F-IE	P+F-AE	FARN-IE	FARN-AE	CON-IE	CON-AE	
1	6,5	9,5	13,0	9,5	10,0	11,0	9,5	10,0	
2	13,0	10,5	8,0	8,5	10,0	8,5	11,0	14,0	Ker-3
3	16,5	12,0	12,5	10,0	8,5	8,5	9,5	10,5	
4	12,0	11,0	6,5	8,5	9,0	11,0	6,5	6,0	
5	9,0	9,5	10,5	10,5	7,0	7,5	6,5	9,0	Ker-4
6	9,5	9,0	11,0	10,5	9,5	8,0	9,0	9,0	

Estadística descriptiva Puntuación ocular total

Total

Variable	Recuento	Media	EE de la media	Desv. estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
Puntuación de PMX-IE	6	11,08	1,43	3,51	6,50	10,75	16,50
Puntuación de PMX-AE	6	10,250	0,461	1,129	9,000	10,000	12,000
Puntuación de P+F-IE	6	10,25	1,04	2,54	6,50	10,75	13,00
Puntuación de P+F-AE	6	9,583	0,375	0,917	8,500	9,750	10,500
Puntuación de FARN-IE	6	9,000	0,465	1,140	7,000	9,250	10,000
Puntuación de FARN-AE	6	9,083	0,625	1,530	7,500	8,500	11,000
Puntuación de CON-IE	6	8,667	0,738	1,807	6,500	9,250	11,000
Puntuación de CON-AE	6	9,75	1,06	2,60	6,00	9,50	14,00

15 Prueba de comparaciones múltiples de Duncan Puntuación total

Fila nº	Grupo/nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C.	
1	Punt. CON-IE	18,5833	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,	
2	Punt. FARN-AE	19,5833	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8,	
3	Punt. FARN-IE	19,7500	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8,	
4	Punt. P+F-AE	24,2500	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8,	P=0,05

ES 2 538 479 T3

Fila nº	Grupo/nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C.
5	Punt. CON-AE	24,4167	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8,
6	Punt. P+F-IE	29,0833	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8,
7	Punt. PMX-IE	30,1667	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8,
8	Punt. PMX-AE	30,1667	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

No hay diferencias entre los grupos

Resultados microbiológicos

Presentación de datos UFC/ml

Fila	PMX-IE	PMX-AE	P+F-IE	P+F-AE	FARN-IE	FARN-AE	
1	0	0	11950000	255	15200000	7500000	
2	16750000	0	415000	1100000	18150000	1285000	Ker-3
3	5800000	995000	16650000	35500	30100000	1400000	
4	1650000	0	50	9500	45200000	7750000	
5	12500	12500	13600000	50	18600000	6650000	Ker-4
6	92000	350	5200000	8050	21400000	8250000	

Fila	CON-IE	CON-AE	Inicio-IE	Inicio-AE	
1	467000000	1650000	15000	1635000	
2	221500000	23500000	107000	130000	PMX-Ker-3
3	202000000	5400000	132500	133000	
4	115000000	30500	75000	118000	
5	253000000	69000000	59000	61000	PMX-Ker-4
6	15000000	176000000	55500	2500	

5

Presentación de datos Log₁₀ UFC/ml

Fila	PMX-IE	Log PMX-AE	Log P+F-IE Log	P+F-AE Log	FARN-IE Log	FARN-AE	Log
1	0,00000	0,00000	7,07737	2,40654	7,18184	6,87506	
2	7,22401	0,00000	5,61805	6,04139	7,25888	6,10890	K-3
3	6,76343	5,99782	7,22141	4,55023	7,47857	6,14613	
4	6,21748	0,00000	1,69897	3,97772	7,65514	6,88930	
5	4,09691	4,09691	7,13354	1,69897	7,26951	6,82282	K-4
6	4,96379	2,54407	6,71600	3,90580	7,33041	6,91645	

Fila	CON-IE Log	CON-AE Log	Inicio-IE Log	Inicio-AE Log
1	8,66932	6,21748	4,17609	6,21352

ES 2 538 479 T3

Fila	CON-IE Log	CON-AE Log	Inicio-IE Log	Inicio-AE Log	
2	8,34537	7,37107	5,02938	5,11394	PMX-Ker-3
3	8,30535	6,73239	5,12222	5,12385	
4	8,06070	4,48430	4,87506	5,07188	
5	8,40312	7,83885	4,77085	4,78533	PMX-Ker-4
6	7,17609	8,24551	4,74429	3,39794	

Estadística descriptiva

Log₁₀ UFC/ml

Total

Variable	Recuento	Media	EE de la media	Desviación estándar	Mínimo	Mediana	Máximo
PMX-IE Log	6	4,88	1,08	2,66	0,00	5,59	7,22
PMX-AE Log	6	2,11	1,04	2,55	0,00	1,27	6,00
p+F-IE Log	6	5,911	0,876	2,147	1,699	6,897	7,221
p+F-AE Log	6	3,763	0,632	1,548	1,699	3,942	6,041
FARN-IE Log	6	7,3624	0,0712	0,1744	7,1818	7,3000	7,6551
FARN-AE Log	6	6,626	0,158	0,388	6,109	6,849	6,916
CON-IE Log	6	8,160	0,212	0,520	7,176	8,325	8,669
CON-AE Log	6	6,815	0,554	1,356	4,484	7,052	8,246
Inicio-IE Log	6	4,786	0,136	0,333	4,176	4,823	5,122
Inicio-AE Log	6	4,951	0,370	0,906	3,398	5,093	6,214

5 Resultados microbiológicos - Epitelio intacto

ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Duncan - Log₁₀ UFC/ml

Fila nº	Grupo/nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C.	
1	Inicio-IE L	6,8333	2, 3,	
2	PMX-IE Log	9,6667	1, 3,	
3	P+F-IE Log	12,6667	1, 2,	P=0,05
4	FARN-IE Lo	22,1667	5,	
5	CON-IE Log	26,1667	4,	

INICIO = PMX = P+F < FARN = CON

Resultados microbiológicos - Epitelio erosionado

ANOVA de Kruskal-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Duncan - Log₁₀ UFC/ml

Fila nº	Grupo/nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C.
1	PMX-AE Log	6,5000	2,
2	P+F-AE Log	9,3333	1,

ES 2 538 479 T3

Fila nº	Grupo/nivel	Rango medio	Solapamientos de I.C.
3	Inicio-AE L	14,3333	
4	FARN-AE Lo	23,5000	5,
5	CON-AE Log	23,8333	4,

P=0,05

PMX = P+F < INICIO < FARN = CON

Resultados microbiológicos - Oligómero 4 al 0,25% sin FARN frente a con FARN - Epitelio intacto

Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-IE Log, P+F-IE Log

	N	Mediana
PMX-IE Log	6	5,591
P+F-IE Log	6	6,897

5 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,757

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (-3,124,1,607)

W = 34,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,4712 NS

Resultados microbiológicos - Oligómero 4 al 0,25% sin FARN frente a con FARN - Epitelio erosionado

10 Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-AE Log, P+F-AE Log

	N	Mediana
PMX-AE Log	6	1,272
P+F-AE Log	6	3,942

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -1,822

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (-4,549,1,690)

W = 32,0

15 Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,2980

La prueba es significativa a 0,2946 NS (ajustado para empates)

Resultados microbiológicos - Epitelio intacto frente a erosionado

Prueba de Mann-Whitney e IC: PMX-IE Log, PMX-AE Log

	N	Mediana
PMX-IE Log	6	5,591
PMX-AE Log	6	1,272

20 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 3,400

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,001,6,764)

W = 50,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0927

La prueba es significativa a 0,0864 NS (ajustado para empates)

Prueba de Mann-Whitney e IC: P+F-IE Log, P+F-AE Log

	N	Mediana
P+F-IE Log	6	6,897
P+F-AE Log	6	3,942

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 2,705

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (-0,423,4,727)

5 W = 50,5

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0782

La prueba es significativa a 0,0776 NS (ajustado para empates)

Prueba de Mann-Whitney e IC: FARN-IE Log, FARN-AE Log

	N	Mediana	
FARN-IE Log	6	7,3000	
FARN-AE Log	6	6,8489	FARN-AE < FARN-IE

10 La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 0,5964

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,3588,1,1843)

W = 57,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0051

Prueba de Mann-Whitney e IC: CON-IE Log, CON-AE Log

	N	Mediana	
CON-IE Log	6	8,325	
CON-AE Log	6	7,052	CON-AE < CON-IE

15

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es 1,003

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (0,100,2,691)

W = 53,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,0306

20 Prueba de Mann-Whitney e IC: Inicio-IE Log, Inicio-AE Log

	N	Mediana
Inicio-IE Log	6	4,823
Inicio-AE Log	6	5,093

La estimación puntual para ETA1-ETA2 es -0,218

IC al 95,5 por ciento para ETA1-ETA2 es (-1,091,0,778)

W = 32,0

Prueba de ETA1 = ETA2 frente a ETA1 distinto de ETA2 es significativa a 0,2980

25

Resumen de las comparaciones estadísticas para los datos microbiológicos

<= Recuentos de colonias significativamente menores

Efecto del epitelio erosionado en la eficacia de cada solución de ensayo o control de inicio

PMX	Erosionado = Intacto
P+F	Erosionado = Intacto
FARN	Erosionado < Intacto
Control solución salina	Erosionado < Intacto
Inicio de tratamiento control	Erosionado = Intacto

5 Efecto de las soluciones de ensayo en córneas con epitelio intacto

INICIO = PMX = P+F < FARN = CON

Efecto de las soluciones de ensayo en córneas con epitelio erosionado

PMX = P+F = INICIO < FARN = CON

Efecto del farnesol en el oligómero 4 al 0,25% en córneas de epitelio intacto

10 PMX = P+F

Efecto del farnesol en el oligómero 4 al 0,25% en las córneas de epitelio erosionado

PMX = P+F

Resumen de resultados

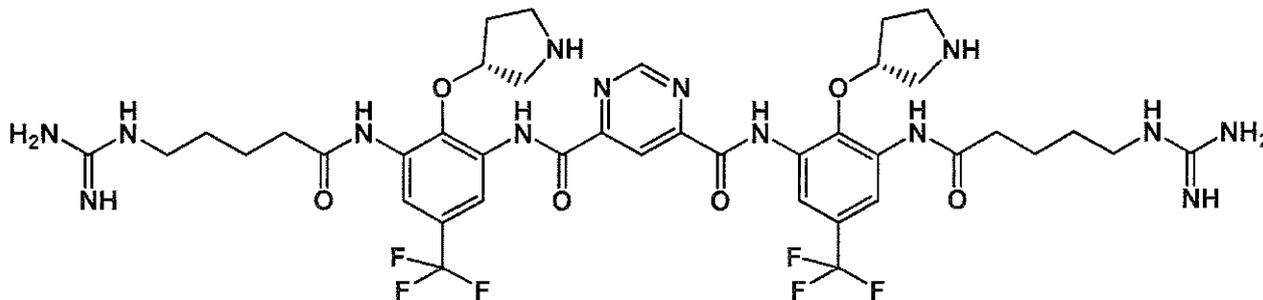
15 El oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) eran eficaces en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina, comparados con la solución salina de control en el modelo de queratitis de conejo NZW cuando el epitelio corneal estaba intacto o se había retirado de las córneas. El oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) eran eficaces en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina, comparados con el inicio del tratamiento de control en el modelo de queratitis de conejo NZW cuando el epitelio corneal se había retirado pero no cuando el epitelio estaba intacto. No había diferencia en los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina, en el modelo de queratitis de conejo NZW entre el oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) con epitelio corneal intacto o erosionado. El farnesol 200 mM solo no era eficaz en la reducción de los recuentos de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina, comparado con la solución salina de control en el modelo de queratitis de conejo NZW. Los ojos tratados con farnesol 200 mM solo y solución salina demostraron recuentos de colonias significativamente menores en los ojos con el epitelio corneal retirado comparado con los que tenían el epitelio intacto. El oligómero 4 al 0,25% (PMX) y el oligómero 4 al 0,25% con farnesol 200 mM (P+F) y el farnesol 200 mM solo, no indujeron toxicidad estadísticamente mayor (como se pone de manifiesto por las puntuaciones oculares totales mayores) comparado con los ojos tratados con solución salina, en ojos con epitelio corneal intacto o erosionado.

El oligómero 4 biomimético era eficaz en la reducción significativa de los recuentos de colonias en un modelo de queratitis de conejo NZW de *Staphylococcus aureus* resistente a fluoroquinolona, resistente a meticilina. Las formulaciones de oligómero 4 eran eficaces cuando se había retirado el epitelio corneal sugiriendo que el epitelio parece ser una barrera para la penetración del oligómero 4 en el sitio de la infección en el estroma corneal. La adición de farnesol 200 mM no promovía la penetración del oligómero 4 a través del epitelio corneal intacto, ni potenciaba su eficacia antibacteriana. De hecho, se observó una tendencia hacia el antagonismo. La erosión mecánica del epitelio corneal solo redujo los recuentos de colonias bacterianas en los ojos de control. Por lo tanto, los recuentos de colonias más bajos observados en los ojos erosionados tratados con el oligómero 4 no indicaban necesariamente mayor eficacia del fármaco. No se observó toxicidad ocular significativa para ninguna formulación en este modelo de queratitis de conejo.

5 Habiendo descrito ahora completamente esta invención, los expertos en la técnica entenderán que se puede llevar a cabo la misma dentro de un intervalo amplio y equivalente de condiciones, formulaciones y otros parámetros sin afectar al alcance de la invención o cualquiera de sus realizaciones. Todos los documentos, p. ej., publicaciones científicas, patentes, solicitudes de patente, y publicaciones de patente citadas en la presente memoria se hace referencia a ellos en su totalidad. Cuando el documento citado solo proporciona la primera página del documento, se incluye el documento entero, incluyendo el resto de las páginas del documento.

REIVINDICACIONES

1.- Una composición oftálmica u ótica que comprende un compuesto que tiene la fórmula:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

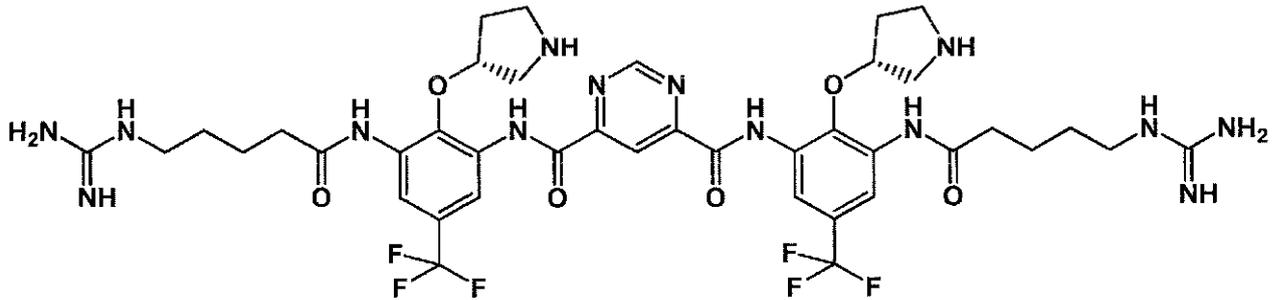
- 5 2.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 1, que está en forma de un líquido o sólido.
- 3.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 1, que está en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un gel o una pomada.
- 4.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 1, que además comprende un conservante, un estabilizante, un antioxidante, un agente quelante o un tensioactivo.
- 10 5.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 1, que además comprende un medicamento adicional.
- 6.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 5, en donde el medicamento adicional se selecciona de un antibiótico, un agente antiinflamatorio, un agente anestésico, un agente antialérgico, un agente bloqueante de acetilcolina, un agonista adrenérgico, un agente bloqueante beta-adrenérgico, un agente antiglaucoma y un agente antihipertensivo.
- 15 7.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el antibiótico se selecciona de un aminoglucósido, una cefalosporina, una diaminopiridina, una fluoroquinolona, una sulfonamida y una tetraciclina.
- 8.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el antibiótico se selecciona de amikacina, azitromicina, cefixima, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, colistina, domeclociclina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, mafenida, metaciclina, minociclina, neomicina, norfloxacina, ofloxacina, oxitetraciclina, polimixina B, pirimetamina, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfisoxazol, tetraciclina, tobramicina y trimetoprim.
- 20 9.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el agente antiinflamatorio es un agente esteroideo.
- 10.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 9, en donde el agente esteroideo se selecciona de dexametasona, rimexolona, prednisolona, fluorometolona, e hidrocortisona.
- 25 11.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el agente antiinflamatorio es un agente no esteroideo.
- 12.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 11, en donde el agente no esteroideo se selecciona de un inhibidor de la ciclooxigenasa de tipo I o tipo II, un antagonista de PAF, un inhibidor de PDE IV, y un inhibidor de la producción de citoquinas.
- 30 13.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 12, en donde el inhibidor de ciclooxigenasa de tipo I o tipo II se selecciona de diclofenaco, flurbiprofeno, ketorolaco, suprofen, nepafenaco, amfenaco, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, bromfenaco, ketoprofeno, meclofenamato, piroxicam, sulindaco, ácido mefanámico, diflusinal, oxaprozina, tolmetina, fenoprofeno, benoxaprofeno, nabumetona, etodolaco, fenilbutazona, aspirina, oxifenbutazona, tenoxicam, carprofeno, Vioxx, celecoxib y etodolaco.
- 35 14.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 12, en donde el antagonista de PAF se selecciona preferiblemente de apafant, bepafant, minopafant, nupafant y modipafant.
- 15.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 12, en donde el inhibidor de PDE IV se selecciona de ariflo, torbafilina, rolipram, filaminast, piclamilast, cipamfilina y roflumilast.

16.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el agente antialérgico es pemirolast u olopatadina.

17.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 6, en donde el agente antialérgico es un corticosteroide.

5 18.- La composición oftálmica u ótica de la reivindicación 17, en donde el corticosteroide se selecciona de prednisolona, fluorometolona, loteprenol y dexametasona.

19.- Un compuesto que tiene la fórmula:



10 20.- Una composición oftálmica u ótica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, o un compuesto según la reivindicación 19, para usar en el tratamiento de una infección oftálmica u ótica bacteriana en un mamífero.