

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 019**

51 Int. Cl.:

A61K 31/10	(2006.01)	C12N 1/18	(2006.01)
A61K 31/437	(2006.01)	C12N 1/20	(2006.01)
A61K 31/43	(2006.01)	C12N 1/38	(2006.01)
A61K 31/431	(2006.01)	C12P 7/06	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)	C12P 7/56	(2006.01)
A61K 39/085	(2006.01)		
A61K 9/00	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A01N 31/00	(2006.01)		
A01N 41/10	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010 PCT/US2010/054837**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11053848**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10827568 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2493464**

54 Título: **Metilsulfonilmetano (MSM) para el tratamiento de microorganismos resistentes a fármacos**

30 Prioridad:

06.11.2009 US 259098 P
12.01.2010 US 294437 P
03.11.2009 US 257751 P
30.10.2009 US 256935 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2018

73 Titular/es:

BIOGENIC INNOVATIONS, LLC (100.0%)
 1000 West 8th Street
 Vancouver, WA 98660, US

72 Inventor/es:

BENJAMIN, RODNEY;
 VARELMAN, JEFFREY y
 KELLER, ANTHONY

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 674 019 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

Metilsulfonilmetano (MSM) para el tratamiento de microorganismos resistentes a fármacos

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales de Estados Unidos n.º 61/ 256.935, presentada el 30 de octubre de 2009, n.º 61/257.751 presentada el 3 de noviembre de 2009, n.º 61/259.098 presentada el 6 de noviembre de 2009 y n.º 61/294.437, presentada el 12 de enero de 2010.

10

Campo

La presente divulgación se refiere de forma general a composiciones que comprenden metilsulfonilmetano (MSM) para tratar enfermedades infecciosas resistentes a fármacos. Determinadas realizaciones se refieren a la sensibilización de microbios resistentes a fármacos. Algunas composiciones divulgadas en el presente documento son útiles para tratar MRSA, por ejemplo.

15

Antecedentes

20 Metilsulfonilmetano (MSM; $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$), conocido también como dimetilsulfona, es un compuesto de organoazufre que es un metabolito de DMSO y determinados aminoácidos que contienen azufre. MSM se ha comercializado principalmente como suplemento de la dieta.

25 Las enfermedades infecciosas son enfermedades producidas por agentes microbianos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos, parásitos, y priones, entre otros. A pesar de determinadas mejoras en el tratamiento médico de las enfermedades infecciosas (antibióticos y vacunas), sigue habiendo muchos obstáculos para reducir la mortalidad producida por las enfermedades infecciosas. Un problema principal es la emergencia y la diseminación de patógenos resistentes a fármacos.

30 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) es un patógeno bacteriano resistente a fármacos que es especialmente problemático en hospitales con donde los pacientes con heridas abiertas, dispositivos invasivos y sistemas inmunitarios debilitados están en mayor riesgo de infección que el público general. Por tanto, existe una necesidad de una terapia administrada de forma eficaz y fácil contra las enfermedades infecciosas resistentes a fármacos. El documento US2006/0229262 divulga el uso de flavonoides para potenciar la eficacia de los antibióticos de beta-lactama. El documento US 4 616 039 A divulga el efecto de MSM contra la pleuritis resistente a antibióticos cuando se añade a la dieta de un animal.

35

Sumario

40 Se describe en el presente documento el descubrimiento inesperado de que MSM sensibiliza patógenos bacterianos resistentes a fármacos diferentes de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo MRSA, a un fármaco al cual son resistentes. Por tanto, de manera sorprendente, un patógeno bacteriano resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* puede estar sensibilizado a un fármaco al que el patógeno es resistente poniendo en contacto el patógeno con MSM, y puede inhibirse poniendo en contacto el patógeno tanto con MSM como con un fármaco al que, por otra parte, el patógeno es resistente.

45

Las realizaciones preferidas de la invención son como se muestran en las reivindicaciones.

50 Se proporciona en el presente documento una composición que comprende MSM para su uso en un método de inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis*, cuyo método implica seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la forma sensible del fármaco del patógeno bacteriano resistente a fármaco, inhibiendo por tanto un patógeno bacteriano resistente a fármaco. El patógeno bacteriano resistente a fármaco puede ser MRSA.

55

Se proporciona también una composición que comprende MSM para su uso en un método para sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* a un fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente, cuyo método comprende seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM, sensibilizando por tanto el patógeno bacteriano resistente a fármaco al fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente. El patógeno bacteriano resistente a fármaco puede ser MRSA.

60

Se proporciona también en el presente documento una composición que comprende MSM para su uso en un método para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* desarrolle resistencia al fármaco, cuyo método comprende seleccionar un patógeno bacteriano sensible a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano sensible a fármaco con una composición que comprende una cantidad

65

terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe el patógeno bacteriano sensible a fármaco, para inhibir por tanto que el patógeno bacteriano sensible a fármaco desarrolle resistencia al fármaco. El patógeno bacteriano sensible a fármaco puede ser *Staphylococcus aureus*.

5 En diversos métodos descritos en el presente documento, el patógeno bacteriano está en (o sobre) un sujeto. La composición puede administrarse al sujeto por vía tópica o con un dispositivo inhalador.

10 En todas realizaciones, el agente es un antibiótico de beta-lactama (β -lactama). La cantidad eficaz de MSM puede ser 5-20 % de MSM, 5-16 % de MSM, 5-10 % de MSM, 5-8 % de MSM, 9-16 % de MSM o 10-15 % de MSM. MSM (porcentaje en peso de la composición que comprende MSM).

15 En una composición concreta que comprende MSM para su uso en un método para inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis*, el patógeno bacteriano es MRSA, el agente es un antibiótico de beta-lactama, la cantidad eficaz de MSM es 5-10 % de MSM como porcentaje en peso, y la composición se administra por vía tópica.

20 En una composición que comprende MSM para su uso en un método para sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* a un fármaco para el cual el patógeno bacteriano es resistente, el patógeno bacteriano es MRSA, la cantidad eficaz de MSM es aproximadamente 5-10 % de MSM en porcentaje en peso, y la composición se administra por vía tópica.

25 En una composición concreta que comprende MSM para su uso en un método para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* desarrolle resistencia al fármaco, el patógeno bacteriano es *Staphylococcus aureus*, el agente es un antibiótico de beta-lactama, la cantidad eficaz de MSM es aproximadamente 5-10 % de MSM, y la composición se administra por vía tópica.

30 Se entenderá además que las composiciones que comprenden MSM para su uso en un método de sensibilizar o inhibir los patógenos bacterianos divulgados en el presente documento son útiles más allá de las circunstancias específicas que se describen en detalle en el presente documento, y se espera, por ejemplo, que sean útiles para cualesquiera de numerosas dolencias en las que un patógeno bacteriano se ha convertido en resistente al fármaco o donde es deseable inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco se convierta en resistente al fármaco.

Breve descripción de las figuras

35 La **Fig 1** ilustra que MSM sensibiliza MRSA a oxacilina. La supervivencia *in vitro* de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa MRSA resistente a oxacilina y meticilina), se estudió en presencia de MSM, DMSO y oxacilina. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con 5-16 % de MSM y 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina ("MA"), 5-16 % de MSM, 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina y 1 % de DMSO ("MDA"), o 1 % de DMSO y 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina ("DA"), durante 48 horas a 25°C. 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina es la CIM para esta cepa de MRSA (ATCC). La
40 inoculación inicial de las bacterias fue de $3,15 \times 10^7$ ufc/ml (Log = 7,49). Todas las condiciones ensayadas mostraron una disminución en ufc/ml durante el periodo de 24 horas analizado. El control positivo mostró TNTC (demasiado numeroso para el recuento) en la placa de dilución 10^7 . Se observó una tasa de supervivencia más baja en presencia de 9-16 % de MSM con 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina que en presencia de 1 % de DMSO y 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina o en presencia de 1 % de DMSO, 9-16 % de MSM y 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina. Se observó la tasa de supervivencia más baja en las condiciones con 12 y 13 % de MSM con 6 $\mu\text{g/ml}$ de antibiótico. Estos resultados muestran que concentraciones específicas de MSM en solitario pueden aumentar la sensibilidad de una cepa MRSA al antibiótico más eficazmente que DMSO o una combinación de MSM y DMSO.

50 La **Fig 2** ilustra que MSM sensibiliza MRSA a oxacilina en un ciclo simulado de tratamiento. La supervivencia *in vitro* de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa MRSA resistente a oxacilina y meticilina), se estudió en presencia de MSM y oxacilina. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con 5-16 % de MSM y 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina ("MA") durante 24 horas a 25 °C. Después de 24 horas, se añadieron otros 6 $\mu\text{g/ml}$ de ml oxacilina a las incubaciones, llevando la cantidad total de oxacilina añadida hasta 12 $\mu\text{g/ml}$. 6 $\mu\text{g/ml}$ es la CIM para esta cepa de MRSA. Por tanto, las bacterias estuvieron bajo una CIM de oxacilina durante 24
55 horas y 2x CIM durante las siguientes 24 horas. Este paradigma experimental estimula la aplicación repetida de antibiótico que un sujeto recibiría durante un ciclo de tratamiento. La inoculación inicial de las bacterias fue de $9,14 \times 10^5$ ufc/ml (Log = 5,96). El control positivo mostró TNTC en la placa de dilución 10^5 . Similar a los resultados que se muestran en la Fig. 1, se observó la tasa de supervivencia más baja en presencia de MSM al 12 y 13 %. Estos resultados confirman que MSM sensibiliza MRSA al tratamiento con antibiótico y muestran que las concentraciones específicas de MSM en solitario pueden aumentar la sensibilidad de una cepa MRSA al antibiótico en un ciclo simulado de tratamiento.

65 La **Fig 3A-C** ilustra que MSM sensibiliza MRSA a múltiples antibióticos. La supervivencia *in vitro* de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa MRSA resistente a oxacilina y meticilina), se estudió en presencia de MSM y oxacilina o MSM y meticilina. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con 5-16 % de MSM en combinación 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina o 6 $\mu\text{g/ml}$ de meticilina. La inoculación inicial de las bacterias fue de

2,13 x10⁶/ml (Log = 6,3). Los periodos de crecimiento ensayados fueron 24 horas (Fig. 3A), 48 horas (Fig. 3B) y 5 días (Fig. 3C). Esta es la CIM de oxacilina y meticilina para esta cepa de bacterias. Un 3,5 % adicional de MSM y 6 µg/ml de oxacilina o 6 µg/ml de meticilina se añadieron cada día. A las 24 horas, MSM al 5 % y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. A las 48 horas, MSM al 5 % y meticilina o MSM al 8 % y oxacilina mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. A los 5 días, MSM al 13-16 % y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. En su conjunto, los resultados indican que MSM aumentó la sensibilidad de esta cepa de MRSA a oxacilina y meticilina.

La **Fig 4** ilustra que MSM sensibiliza MRSA a múltiples concentraciones de oxacilina. La supervivencia *in vitro* de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa MRSA resistente a oxacilina y meticilina), se estudió en presencia de MSM y oxacilina. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de oxacilina, correspondientes a 2x, 5x y 10x CIM para esta cepa de MRSA para cada antibiótico. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con MSM al 5-16 % y la cantidad indicada de antibiótico durante 24 horas a 25 °C. De esta forma, las bacterias estuvieron a concentraciones 2x, 5x, o 10x CIM de oxacilina durante 24 horas. La inoculación inicial de bacterias era de 3,3x10⁵/ml (log = 5,52). En este punto temporal, concentraciones más bajas de MSM con antibiótico tuvieron un efecto mayor sobre la supervivencia bacteriana que concentraciones mayores de MSM. Sin embargo, en su conjunto, estos resultados confirman que MSM sensibiliza MRSA a oxacilina.

La **Fig 5** ilustra que MSM sensibiliza MRSA a múltiples concentraciones de meticilina. La supervivencia *in vitro* de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa MRSA resistente a oxacilina y meticilina), se ensayó en presencia de MSM y meticilina. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de meticilina, correspondientes a 2x, 5x y 10x CIM para esta cepa de MRSA para cada antibiótico. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con MSM al 5-16 % y la cantidad indicada de antibiótico durante 24 horas a 25 °C. De esta forma, las bacterias estuvieron a concentraciones 2x, 5x, o 10x CIM de meticilina durante 24 horas. La inoculación inicial de bacterias era de 1,49x10⁵/ml (log = 5,17). En este punto temporal, concentraciones más bajas de MSM con antibiótico tuvieron un efecto mayor sobre la supervivencia bacteriana que concentraciones mayores de MSM. En su conjunto, estos resultados confirman que MSM sensibiliza MRSA a meticilina.

Descripción detallada

I. Términos y abreviaturas

UFC	unidades formadoras de colonias
DMEM:	medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO:	dimetilsulfóxido
ADN:	ácido desoxirribonucleico
ELISA	enzimoinmunoanálisis de adsorción
CI₅₀:	concentración inhibidora 50
LAB:	bacterias acidolácticas
MDSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> con resistencia multifármaco
MDR:	resistencia multifármaco
CIM:	concentración inhibidora mínima
MRSA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MSM:	metilsulfonilmetano
OSRA:	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a oxacilina
PAGE:	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBP	proteína de unión a penicilina
PBS:	solución salina tamponada con fosfato
PDA:	agar patata dextrosa
SDS:	dodecil sulfato de sodio
TNTC:	demasiado numeroso para el recuento
TSB:	caldo de soja trípico

Se proporcionan las siguientes explicaciones de términos y métodos para describir mejor la presente divulgación y para guiar a las personas normalmente expertas en la técnica de la presente divulgación. Las formas singulares "un", "uno/una", se refieren a uno o más de uno, a menos que el contexto determine claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "que comprende una célula bacteriana" incluye células bacterianas individuales o múltiples y se considera equivalente a la frase "que comprende al menos una célula bacteriana". El término "o" se refiere a un elemento individual o define elementos alternativos, o una combinación de dos o más elementos, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Como se usa en el presente documento, "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende A o B", significa "que incluye A, B, o A y B," sin excluir elementos adicionales.

a menos que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen en general el mismo significado que entiende de forma habitual una persona normalmente experta en la materia a la que pertenece esta divulgación. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los

descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de la presente divulgación, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos, y ejemplos son meramente ilustrativos. Por ejemplo, se describen métodos convencionales bien conocidos en la técnica a la cual pertenece la invención divulgada en varias referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y los suplementos hasta el 2000); Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; y Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999; Loudon, *Organic Chemistry*, Cuarta edición, Nueva York: Oxford University Press, 2002, pp. 360-361, 1084-1085; Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta Edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Cuarta edición, Nueva York: Longman, 1978.

Se pueden encontrar términos adicionales usados en genética molecular en Benjamin Lewin, *Genes V* publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Se pueden encontrar términos adicionales usados en química en Loudon, *Organic Chemistry*, Cuarta edición, Nueva York: Oxford University Press, 2002, pp. 360-361, 1084-1085; Smith y March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta Edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Cuarta edición, Nueva York: Longman, 1978.

Administración: Proporcionar o administrar a un sujeto, célula, o superficie, un compuesto o agente, tal como MSM, o una composición que comprende un compuesto o agente, tal como MSM, mediante cualquier ruta eficaz. Las rutas de administración ilustrativas a una superficie incluyen pulverizar o frotar un agente o composición que contiene un agente sobre la superficie. Las rutas de administración ilustrativas a un sujeto incluyen, aunque no de forma limitativa, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, e intravenosa), rutas oral, sublingual, rectal, transdérmica (tal como tópica), intranasal, vaginal y mediante inhalación. Los tipos concretos de administración a un sujeto incluyen la administración tópica o la administración a la mucosa nasal o a los pulmones mediante administración por inhalación.

Agente: Cualquier sustancia o cualquier combinación de sustancias que sea útil para conseguir un fin o resultado; por ejemplo, una sustancia o combinación de sustancias de utilidad para inhibir el crecimiento o la supervivencia bacteriana. Los ejemplos de agentes incluyen MSM, DMSO y antibióticos de beta-lactama, entre otros. Los agentes incluyen agentes antimicrobianos, que son útiles para inhibir un microbio. Los agentes antibióticos son útiles para inhibir bacterias.

Patógeno bacteriano: Una bacteria que produce enfermedad (bacteria patógena). Los ejemplos de bacterias patógenas para los cuales puede usarse MSM para modificar incluyen sin limitación una cualquiera o más de (o cualquier combinación de) *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus* sp., *Actinomycetes*, *Actinomyces* sp. (tales como *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii*), *Aeromonas* sp. (tales como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii biovar sobria* (*Aeromonas sobria*), y *Aeromonas caviae*), *Anaplasma phagocytophilum*, *Alcaligenes xylooxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus* sp. (tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus stearothermophilus*), *Bacteroides* sp. (tales como *Bacteroides fragilis*), *Bartonella* sp. (tales como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella henselae*, *Bifidobacterium* sp., *Bordetella* sp. (tales como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, y *Bordetella bronchiseptica*), *Borrelia* sp. (tales como *Borrelia recurrentis*, y *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* sp. (tales como *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melintensis* y *Brucella suis*), *Burkholderia* sp. (tales como *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Campylobacter* sp. (tales como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter fetus*), *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydomydia pneumoniae*, *Chlamydomydia psittaci*, *Citrobacter* sp. *Coxiella burnetii*, *Corynebacterium* sp. (tales como, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium*), *Clostridium* sp. (tales como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*), *Eikenella corrodens*, *Enterobacter* sp. (tales como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, incluyendo *Escherichia coli oportunistas*, tales como *E. coli enterotoxigénica*, *E. coli enteroinvasiva*, *E. coli enteropatógena*, *E. coli enterohemorrágica*, *enteroaggregative E. coli* y *uropathogenic E. coli*) *Enterococcus* sp. (tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*) *Ehrlichia* sp. (tales como *Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia canis*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* sp., *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilus* sp. (tales como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*, *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus*, *Helicobacter* sp. (tales como *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*), *Kingella kingii*, *Klebsiella* sp. (tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis* y *Klebsiella oxytoca*), *Lactobacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*,

Peptostreptococcus sp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella sp.*, *Mobiluncus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Mycoplasma sp.* (tales como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, y *Mycoplasma genitalium*), *Nocardia sp.* (tales como *Nocardia asteroides*, *Nocardia cyriacigeorgica* y *Nocardia brasiliensis*), *Neisseria sp.* (tales como *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*), *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*. *Prevotella sp.*,
 5 *Porphyromonas sp.*, *Prevotella melaninogenica*, *Proteus sp.* (tales como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*), *Providencia sp.* (tales como *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia sp.* (tales como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia akari* y *Rickettsia prowazekii*, *Orientia tsutsugamushi* (anteriormente: *Rickettsia tsutsugamushi*) y *Rickettsia typhi*),
 10 *Rhodococcus sp.*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella sp.* (tales como *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*), *Serratia sp.* (tales como *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens*), *Shigella sp.* (tales como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), *Staphylococcus sp.* (tales como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus sp.* (tales como *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae serotipo 4 resistente a cloranfenicol*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 6B resistente a espectinomina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 9V resistente a estreptomina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 14 resistente a eritromicina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 14 resistente a optoquina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 18C resistente a rifampicina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 19F resistente a tetraciclina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 19F resistente a penicilina*, y *Streptococcus pneumoniae serotipo 23F resistente a trimetoprima*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 4 resistente a cloranfenicol*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 6B resistente a espectinomina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 9V resistente a estreptomina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 14 resistente a optoquina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 18C resistente a rifampicina*, *Streptococcus pneumoniae serotipo 19F resistente a penicilina*, o *Streptococcus pneumoniae serotipo 23F resistente a trimetoprima*), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus del Grupo A*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus del Grupo B*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus del Grupo C*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equismilis*, *Streptococcus del Grupo D*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus del Grupo G* y *Streptococcus anginosus del Grupo G de estreptococos*, *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema sp.* (tales como *Treponema carateum*, *Treponema pertenue*, *Treponema pallidum* y *Treponema endemicum*, *Tropheryma whippelii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella sp.*, *Vibrio sp.* (tales como *Vibrio cholerae*,
 20 *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Vibrio damsela* y *Vibrio furnisii*), *Yersinia sp.* (tales como *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*) y *Xanthomonas maltophilia* entre otros. Como se usa en el presente documento, los patógenos bacterianos no incluyen *Mycobacterium tuberculosis*, u otras bacterias que pueden producir tuberculosis.
 25
 30
 35

Antibióticos de beta-lactama: Una clase de antibióticos que contienen un núcleo de beta-lactama en su estructura molecular. Los ejemplos de antibióticos de beta-lactama incluyen, derivados de penicilina, cefalosporinas, penemos, monobactamas, carbapenemos, inhibidores de la beta-lactamasa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de derivados de penicilina incluyen, aminopenicilinas (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, y epicilina);
 40 carboxipenicilinas (por ejemplo, carbenicilina, ticarcilina, y termocilina); ureidopenicilinas (por ejemplo, azlocilina, piperacilina y mezlocilina); mecilinamo, sulbenicilina, penicilina benzatínica, penicilina G (bencilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), penicilina O (alilmercaptopetilpenicilina), penicilina procaínica, oxacilina, metecilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, pivampicilina, hetacilina, becampicilina, metampicilina, talampicilina, co-amoxiclav (amoxicilina más ácido clavulánico), y piperacilina. Los ejemplos de cefalosporinas incluyen,
 45 cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefotetan, cefoxitina, ceforanida, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima proxetil, ceftazidima, cefepima, cefoperazona, ceftizoxima, cefixima y cefpiroma. Los ejemplos de penemos incluyen, faropenemo. Los ejemplos de monobactamas incluyen, aztreonamo y tigemonamo. Los ejemplos de carbapenemos incluyen, biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, y panipenem. Los ejemplos de inhibidores de la beta-lactamasa incluyen, tazobactam sal sódica de 4,4 dióxido del ácido tazobactam ([2S-(2alfa,3beta,5alfa)]-3-metil-7-oxo-3-(1H-1,2,3-triazol-1-ilmetil)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), sulbactam sal sódica de 4,4-dióxido del ácido (2S,5R)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), y ácido clavulánico (ácido (2R,5R,Z)-3-(2-hidroxitetideno)-7-oxo-4-oxa-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico).
 50
 55

Actividad biológica: Una expresión que describe los efectos beneficiosos o adversos de una sustancia sobre la materia viva. Cuando el agente es una mezcla química compleja, esta actividad se ejerce mediante el principio activo de la sustancia o farmacóforo, pero se puede modificar por el resto de componentes. La actividad es generalmente dependiente de la dosis y no es infrecuente que tenga efectos que varíen desde beneficiosos a adversos para la misma sustancia cuando se pasa de dosis bajas a altas. En un ejemplo, MSM altera, tal como aumenta o disminuye
 60 la actividad biológica de un microorganismo, tales como bacterias.

Muestra biológica: Un espécimen biológico que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína, células completas, membranas celulares o combinaciones de los mismos, obtenidas de un sujeto. Los ejemplos incluyen, aunque no de forma limitativa, moco, sangre periférica, orina, saliva, biopsia de tejido, aspirados de aguja, especímenes quirúrgicos, muestras de amniocentesis y material de autopsias. En un ejemplo, una muestra incluye una biopsia de tejido obtenida de un sujeto con una infección bacteriana, tal como una infección por MRSA o
 65

Staphylococcus aureus. En otro ejemplo, una muestra incluye una muestra de moco obtenida de un sujeto con una infección bacteriana de los pulmones, tal como una infección por MRSA o *Staphylococcus aureus*.

5 **Composición (o formulación):** Un compuesto químico o mezcla de compuestos capaz de inducir un efecto deseado cuando se administra adecuadamente. Las composiciones normalmente incluyen al menos un agente. Una composición industrial es un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto deseado cuando se administra adecuadamente a una superficie. Una composición farmacéutica es un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto, o una célula. En muchos casos, una composición industrial podría también administrarse a un sujeto. En muchos
10 casos, una composición farmacéutica podría también administrarse a una superficie. En un ejemplo particular, una composición incluye un agente o agentes que inhiben un patógeno bacteriano resistente a fármaco. Por ejemplo, una composición puede incluir MSM y un agente antimicrobiano. Una composición puede incluir MSM y metilicina u oxacilina. Algunas realizaciones proporcionan composiciones que incluyen MSM sin DMSO.

15 **Puesta en contacto:** Colocación en asociación física indirecta; incluyendo en forma sólida, líquida, y gaseosa. La puesta en contacto incluye el contacto entre una molécula y otra molécula. El contacto puede producirse *in vitro* con células o tejido aislados o *in vivo* mediante administración a un sujeto.

20 **Control:** Muestras consideradas como normales (por ejemplo, actividad o función representativa en ausencia de la variable que se está ensayando) así como también los valores de laboratorio, aunque posiblemente se hayan establecido de forma arbitraria, teniendo en cuenta que dichos valores pueden variar de laboratorio a laboratorio. Un grupo del control es prácticamente idéntico al grupo de tratamiento, excepto por la única variable de interés cuyo efecto se está ensayando, que se aplica solo al grupo de tratamiento.

25 **Disminución o inhibición:** Reducir la calidad, cantidad, o concentración de algo. En un ejemplo, la administración de MSM disminuye o reduce una o más actividades biológicas, tales como crecimiento, reproducción, proliferación, tasa de supervivencia, metabolismo, vitalidad, solidez, acción, y/o función de los microorganismos en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 50 %, o incluso al menos un 90 %, incluyendo entre 10 % al 95 %, 20 % al 80 %, 30 % al 70 %, 40 % al 50 %, tal como un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %
30 o 100 %. Dicha disminución puede medirse utilizando los métodos divulgados en el presente documento así como los conocidos por una persona normalmente experta en la materia. MSM puede utilizarse para inhibir la supervivencia de los microorganismos específicos. Pueden observarse reducciones a escala log tras las primeras 24 horas.

35 **Dimetil sulfóxido (DMSO):** Dimetil sulfóxido (DMSO), conocido también como metilsulfonilmetano o metil sulfóxido, es un compuesto de organoazufre con la fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Este líquido incoloro es un disolvente aprótico polar que disuelve los compuestos polares y no polares y es miscible en una amplia gama de disolventes orgánicos así como en agua. Tiene una propiedad distintiva de penetrar la piel muy fácilmente, de tal manera que uno puede saborearlo después de haber entrado en contacto con la piel. DMSO es bien conocido como suplemento nutritivo y como
40 agente farmacéutico. Un experto en la materia relevante estará familiarizado con estos usos. Están disponibles comercialmente diversas calidades de DMSO (por ejemplo, el producto n.º472301 de Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO) y una persona experta en la materia estará familiarizada con las fuentes de DMSO.

45 **Patógeno bacteriano resistente a fármaco:** Esta expresión se refiere a un patógeno bacteriano que es resistente a uno o más agentes antimicrobianos. Resistente a fármaco se refiere tanto a resistencia parcial y como a resistencia completa. Por ejemplo, MRSA es un patógeno bacteriano resistente a fármaco que es resistente a los antibióticos de beta-lactama. Un patógeno bacteriano puede ser a la vez resistente a fármaco y sensible a fármaco si es sensible a un agente antimicrobiano, pero resistente a otro. Como se usa en el presente documento, un sujeto que entra en contacto con un patógeno bacteriano resistente a fármaco es un sujeto con una infección bacteriana resistente a fármaco. Como se usa en el presente documento, el patógeno bacteriano resistente a fármaco no incluye
50 *Mycobacterium tuberculosis* resistente a fármaco, u otro patógeno bacteriano resistente a fármaco que puede producir tuberculosis.

55 **Patógeno bacteriano sensible a fármaco:** Esta expresión se refiere a un patógeno bacteriano que es sensible a uno o más agentes antimicrobianos. Un patógeno bacteriano puede ser a la vez resistente a fármaco y sensible a fármaco si es sensible a un agente antimicrobiano, pero resistente a otro. En algunas realizaciones, un patógeno bacteriano resistente a un agente antimicrobiano concreto puede volverse sensible a este agente si el patógeno bacteriano se pone en contacto con MSM. Como se usa en el presente documento, un sujeto que entra en contacto con un patógeno bacteriano sensible a fármaco es un sujeto con una infección bacteriana sensible a fármaco. Como
60 se usa en el presente documento, el patógeno bacteriano sensible a fármaco no incluye *Mycobacterium tuberculosis*, sensible a fármaco, u otro patógeno bacteriano sensible a fármaco que produce tuberculosis.

Potenciación o aumento: Aumento en la calidad, cantidad, o concentración de algo.

65 **Patógeno fúngico:** Un hongo que produce enfermedad. Los ejemplos de patógenos fúngicos para los cuales puede usarse MSM para modificar incluyen, aunque no de forma limitativa uno o más de (o cualquier combinación de)

Trichophyton rubrum, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia furfur*), *Candida sp.* (tales como *Candida albicans*), *Aspergillus sp.* (tales como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus versicolor* y *Aspergillus clavatus*), *Cryptococcus sp.* (tales como *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus albidus*), *Coccidioides sp.*, *Histoplasma sp.* (tal como *Histoplasma capsulatum*), *Pneumocystis sp.* (tal como *Pneumocystis jirovecii*), *Stachybotrys sp.* (tal como *Stachybotrys chartarum*), *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Trichosporon*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Wangiella*, *Penicillium*, y *Cephalosporium*. En algunas realizaciones, MSM se administra para inhibir o prevenir una infección o trastorno asociado con uno o más de los patógenos fúngicos anteriormente mencionados.

Incubación: Un término que incluye un lapso suficiente de tiempo para que un agente, tal como MSM, interactúe con algo, tal como un célula o tejido.

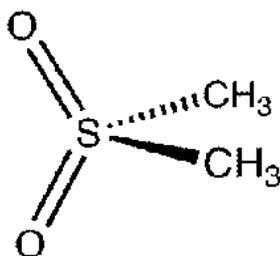
Dispositivo inhalador: Un dispositivo capaz de administrar una composición a un sujeto, por ejemplo, al tejido pulmonar de un sujeto. Por ejemplo, un dispositivo inhalador puede ser un inhalador, un nebulizador o un ventilador. Los dispositivos inhaladores descritos en el presente documento se construyen de un material adaptado para poner en contacto DMSO y/o MSM. En algunas realizaciones, un dispositivo inhalador es desechable o sustituible. Los dispositivos inhaladores descritos en el presente documento se configuran para administrar una composición que contiene DMSO o MSM para que entre en contacto directamente con patógenos bacterianos en el tejido pulmonar de un sujeto. Los dispositivos inhaladores se configuran para generar partículas de una composición que varía en tamaño. En algunas realizaciones, un dispositivo inhalador se configura para generar partículas de una composición que varían en tamaño desde aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 10 μm o de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm .

Inhibición o tratamiento de una infección o enfermedad: Inhibir el desarrollo completo de una infección, enfermedad o dolencia, por ejemplo, en un sujeto que está en riesgo de desarrollar una infección, tal como una infección bacteriana. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o dolencia patológica una vez que esta ha comenzado a desarrollarse. Como se usa en el presente documento, el término "mejorar", con referencia a una enfermedad, dolencia o síntoma patológico, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. El efecto beneficioso puede evidenciarse, por ejemplo, mediante un inicio retrasado de los síntomas clínicos de la enfermedad/infección en un sujeto susceptible, una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad/infección, una progresión más lenta de la enfermedad/infección, una reducción en el número de recaídas de la enfermedad/infección, una mejora en la salud o en el bienestar general del sujeto, o mediante otros parámetros bien conocidos en la materia que son específicos de una enfermedad/infección concreta, tales como una infección bacteriana.

***Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA):** Una bacteria de *Staphylococcus aureus* que tiene resistencia completa o parcial (o intermedia) a uno o más antibióticos de beta-lactama. MRSA se denomina también *Staphylococcus aureus* con resistencia a multifármaco (MDSA), *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (ORSA) o "Golden Staph." En algunas realizaciones, poner en contacto un MRSA con MSM vuelve el MRSA sensible a un antibiótico de beta-lactama que era resistente antes de la puesta en contacto con MSM. Usando el sistema Etest® para determinar la sensibilidad al antibiótico, MRSA muestra una CIM de al menos 2 $\mu\text{g/ml}$ para la oxacilina (véase por ejemplo, el manual técnico de Etest®, AB bioMérieux, 2008).

Metilsulfonilmetano (MSM): Un compuesto de organoazufre con la fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$. MSM es conocido también como DMSO₂, dimetil sulfona, metil sulfona y sulfonilbismetano. MSM se ha comercializado y vendido principalmente como suplemento de la dieta.

MSM está estructuralmente relacionado con el dimetil sulfóxido (DMSO), pero el comportamiento de ambos es diferente. DMSO es un disolvente muy polar y un excelente ligando, con propiedades de disolución similares al agua mientras que MSM es menos polar y menos reactivo. MSM es también un metabolito de DMSO. MSM tiene la siguiente estructura química:



Microorganismo: Un miembro de la especie microbiana procariota o eucariota de los dominios *Archaea*, *Bacteria*, y

Eucarya, incluyendo el último levaduras y hongos filamentosos, protozoos, algas, o *Protista* superiores. Las expresiones "células microbianas" y "microbios" se usan de manera indistinta con el término microorganismo.

5 **Concentración inhibidora mínima(CIM):** La concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo tras incubación durante la noche. Las concentraciones inhibidoras mínimas son importantes en los laboratorios de diagnóstico para confirmar la resistencia de los microorganismos a un agente antimicrobiano y también para vigilar la actividad de nuevos agentes antimicrobianos.

10 **Modular o modulación:** Ajustar, alterar, regular una actividad, un grado o índice de la misma, incluyendo un aumento o una disminución en la actividad biológica de una molécula. En un ejemplo, MSM se administra para modular la sensibilidad bacteriana a agentes antimicrobianos.

15 **Parásito:** Un organismo que vive en el interior de seres humanos u otros organismos que actúan como hospedadores (para el parásito). Los parásitos son dependientes de sus hospedadores durante al menos parte de su ciclo de vida. Los parásitos son perjudiciales debido a que consumen alimento necesario, consumen los tejidos corporales y las células, y eliminan residuos tóxicos, lo que hace que las personas enfermen. Los ejemplos de patógenos fúngicos para su uso con los métodos y composiciones divulgados incluyen, aunque no de forma limitativa, uno cualquiera o más de (o cualquier combinación de) Malaria (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*), Esquistosomas, Tripanosomas, Leishmania, Nematodos del tipo de las filarias, Tricomonirosis, Sarcosporidiasis, Tenia (*T. saginata*, *T. solium*), Leishmania, *Toxoplasma gondii*, Trichinelosis (*Trichinella spiralis*) o Coccidiosis (especies de *Eimeria*). MSM se puede usar para inhibir o prevenir la actividad de uno o más de los organismos relacionados anteriormente.

25 **Transportadores o vehículos farmacéuticamente aceptables:** Los transportadores (vehículos) farmacéuticamente aceptables útiles en esta divulgación son convencionales. Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª Edición (1995), describe composiciones y composiciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos o moléculas terapéuticas, tales como uno o más péptidos proporcionados en el presente documento. En general, la naturaleza del transportador dependerá del modo particular de administración que se está empleando. Por ejemplo, las composiciones parenterales comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, sueros salinos equilibrados, dextrosa acuosa, glicerol o similar como un vehículo. En una realización concreta, el transportador es uno que permite al compuesto terapéutico cruzar la capa dérmica. Para las composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, píldora, comprimido, o cápsula), los transportadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Además de transportadores biológicamente neutros, las composiciones que se van a administrar pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tamponantes del pH, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán.

40 **Cuantificación:** Determinar o medir una cantidad (tal como una cantidad relativa) de una molécula o la actividad de una molécula, tal como la cantidad de analito presente en una muestra.

45 **Sensibilización de un microorganismo resistente a fármaco:** Cualquier medio de disminuir la resistencia a un fármaco de un microorganismo, incluyendo patógenos bacterianos. Esto incluye modificaciones en el microorganismo, así como, el uso de un agente que aumenta la eficacia de otro agente para inhibir el microorganismo. Por ejemplo, la sensibilización de MRSA a metilicina incluye modular un MRSA de tal manera que no sea tan resistente a metilicina, así como, poner en contacto el MRSA con un agente que reduce la resistencia del MRSA a metilicina, por ejemplo, poniendo en contacto el MRSA con MSM.

50 ***Staphylococcus aureus*:** Un coco Gram-positivo de células redondas, de aproximadamente 1 µm de diámetro, que forma agrupaciones similares a racimos de uva indicadoras de la capacidad de dividirse en más de un plano. Son capaces de respiración aerobia y anaerobia y la mayoría de las cepas fermentan manitol anaerobiamente. Sobre agar sangre forman colonias doradas o blancas características. Producen catalasa, coagulasa y un factor extracelular de aglutinación de células, y algunas cepas producen cápsulas (véase Brown et al, J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018, 2005).

55 **Sujeto:** Organismos vivos vertebrados multicelulares, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos. "En un sujeto" se refiere a sustancias o microorganismos (por ejemplo, patógenos bacterianos) que se ponen en contacto con un sujeto o están en conexión física con un sujeto.

60 **Sujeto susceptible a una enfermedad o dolencia:** Un sujeto capaz de, propenso a, o predispuesto a desarrollar una enfermedad o dolencia. Se entiende que un sujeto que ya tiene o muestra síntomas de una enfermedad o dolencia se considera "susceptible" debido a que ya ha desarrollado esta.

65 **Superficie:** La capa externa de un objeto físico.

Síntomas y signos: Cualquier evidencia subjetiva de enfermedad o de dolencia en un sujeto, *por ejemplo*, dicha evidencia como se percibe por el sujeto; un cambio significativo en la dolencia de un sujeto indicador de algún estado corporal o mental. Un "signo" es cualquier anomalía indicativa de enfermedad, que se puede descubrir durante una exploración o evaluación de un sujeto. Un signo es generalmente una indicación objetiva de enfermedad. Los signos incluyen, aunque no de forma limitativa, cualquier parámetro mensurable tales como ensayos para detectar un trastorno o enfermedad, tal como una infección bacteriana o vírica. En un ejemplo, reducir o inhibir uno o más síntomas o signos asociados con una infección bacteriana o vírica, incluye reducir o inhibir la supervivencia bacteriana o la infección vírica en una cantidad deseada, por ejemplo en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 100 %, en comparación con la supervivencia bacteriana o la infectividad vírica en ausencia de MSM.

Cantidad o concentración terapéuticamente eficaz: Una cantidad de una composición que sola, o junto con agentes(s) adicional(es), es suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto, a la cual la composición se administra. La cantidad eficaz de un agente o composición dependerá de varios factores, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el sujeto, las células o la superficie a la cual el agente o composición se administra, y la forma de administración. En un ejemplo, una cantidad o concentración terapéuticamente eficaz es una que es suficiente para inhibir un patógeno bacteriano, por ejemplo, un patógeno bacteriano resistente a fármaco tal como MRSA.

En un ejemplo, un efecto deseado es reducir o inhibir uno o más síntomas asociados con una enfermedad. Por ejemplo los síntomas asociados con una infección por MRSA. El uno o más síntomas no han de eliminarse completamente para que la composición o agente sea eficaz. Por ejemplo, una composición o agente puede disminuir los signos o síntomas en una cantidad deseada, por ejemplo en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 100 %, en comparación con los signos o síntomas en ausencia de la composición o agente. En un ejemplo, un efecto deseado es reducir o inhibir un microorganismo (tal como la supervivencia del microorganismo) en una cantidad deseada, por ejemplo en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 100 %, en comparación con la supervivencia del microorganismo en ausencia de la composición o agente. En otro ejemplo, un efecto deseado es sensibilizar un microorganismo resistente a fármaco al fármaco para el cual el microorganismo es resistente en una cantidad deseada, por ejemplo en al menos un 20 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, o incluso al menos un 100 %, en comparación con la sensibilidad del microorganismo al fármaco en ausencia de la composición o agente.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o agente divulgado se puede administrar en una única dosis, o en varias dosis, por ejemplo, diariamente, durante un ciclo de tratamiento. Sin embargo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede depender del sujeto o la célula o la superficie a la cual la composición o agente se administra, la gravedad y el tipo de la dolencia que se está tratando, y la forma de administración. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o composición puede medirse como la concentración (moles por litro o M molar o peso por volumen u otra unidad de concentración) del agente o composición en sangre (*in vivo*) o tampón (*in vitro*), entre otros, que produce el(los) efecto(s) deseado(s). Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente o composición puede medirse como la cantidad administrada a un sujeto por peso corporal del sujeto, por ejemplo, mg de agente/kg de peso corporal.

Célula sin tratar: Una célula que no se ha puesto en contacto con un agente deseado, tal como MSM. En un ejemplo, una célula sin tratar es una célula que recibe el vehículo en el cual se ha administrado MSM.

Virus: Un organismo infeccioso microscópico que se reproduce en el interior de células vivas. Un virus consiste esencialmente en un núcleo de ácido nucleico rodeado por un revestimiento de proteína, y tiene la capacidad de replicarse solamente en el interior de una célula viva. "Replicación vírica" es la producción de virus adicionales por la aparición de al menos un ciclo de vida del virus. Un virus puede trastornar las funciones normales de las células hospedadoras, haciendo que la célula se comporte de una manera determinada por el virus. Por ejemplo, una infección vírica puede dar como resultado que una célula produzca una citoquina, o la sensibilización a una citoquina, cuando la célula sin infectar normalmente no lo hace. En algunos ejemplos, un virus es un patógeno.

Los ejemplos específicos de patógenos víricos que podrían tratarse de acuerdo con los métodos y composiciones divulgados incluyen, aunque no de forma limitativa, uno cualquiera o más de (o cualquier combinación de); Arenavirus (tal como el virus Guanarito, virus de Lassa, virus de Junin, virus Machupo y Sabia), Arterivirus, Ronivirus, Astrovirus, Bunyavirus (tal como el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y Hantavirus), Barnavirus, Birnavirus, Bornavirus (tal como el virus de la enfermedad de Borna), Bromovirus, Calicivirus, Crisovirus, Coronavirus (tal como Coronavirus y SARS), Cistovirus, Closterovirus, Comovirus, Dicistovirus, Flavivirus (tal como el virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus de la hepatitis C, y virus de la fiebre del Dengue), Filovirus (tal como virus del Ébola y virus de Marburg), Flexivirus, Hepevirus (tal como el virus de la Hepatitis E), adenovirus humanos (tal como los adenovirus A-F humanos), astrovirus humanos, poliomavirus BK humanos, bocavirus humanos, coronavirus humanos (tales como los coronavirus humanos HKU1, NL63, y OC43), los enterovirus humanos (como los enterovirus A-D humanos), eritrovirus V9 humano, espumavirus humanos, herpesvirus humanos

(tal como el herpesvirus 1 humano (virus del herpes simple de tipo 1), herpesvirus 2 humano (virus del herpes simple de tipo 2), herpesvirus 3 humano (virus de la varicela zóster), herpesvirus 4 de tipo 1 humano (virus de Epstein-Barr de tipo 1), herpesvirus 4 de tipo 2 humano (virus de Epstein-Barr de tipo 2), cepa AD169 del herpesvirus 5 humano, cepa Merlin del herpesvirus 5 humano, herpesvirus 6A humano, herpesvirus 6B humano, herpesvirus 7 humano, herpesvirus 8 tipo M humano, herpesvirus 8 de tipo P humano y Citomegalovirus humano), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (tales como VIH 1 y VIH 2), metapneumovirus humanos, papilomavirus humanos (tales como el papilomavirus-1 humano, papilomavirus-18 humano, papilomavirus-2 humano, papilomavirus-54 humano, papilomavirus-61 humano, papilomavirus-cand90 humano, papilomavirus RTRX7 humano, y papilomavirus de tipo 10 humano, papilomavirus de tipo 101 humano, papilomavirus de tipo 103 humano, papilomavirus de tipo 107 humano, papilomavirus de tipo 16 humano, papilomavirus de tipo 24 humano, papilomavirus de tipo 26 humano, papilomavirus de tipo 32 humano, papilomavirus de tipo 34 humano, papilomavirus de tipo 4 humano, papilomavirus de tipo 41 humano, papilomavirus de tipo 48 humano, papilomavirus de tipo 49 humano, papilomavirus de tipo 5 humano, papilomavirus de tipo 50 humano, papilomavirus de tipo 53 humano, papilomavirus de tipo 60 humano, papilomavirus de tipo 63 humano, papilomavirus de tipo 6b humano, papilomavirus de tipo 7 humano, papilomavirus de tipo 71 humano, papilomavirus de tipo 9 humano, papilomavirus de tipo 92 humano, y papilomavirus de tipo 96 humano), virus paragripales humanos (tales como el virus paragripal 1-3 humano), paraecovirus humanos, parvovirus humanos (tales como parvovirus 4 humano y parvovirus B19 humano), virus sincitiales respiratorios humanos, rinovirus humanos (tales como rinovirus A humano y rinovirus B humano), espumaretrovirus humanos, virus linfotrópicos T humanos (tales como virus linfotrópico T 1 humano y virus linfotrópico T 2 humano), virus del polioma humano, Hipovirus, Levivirus, Luteovirus, Virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), Mamavirus, Namavirus, Nidovirales, Nodavirus, Ortomixovirus (tales como los virus de la gripe), Partitivirus, Paramixovirus (tales como el virus de las paperas y el virus del sarampión), Picornaviruses (tales como Poliovirus, el virus del resfriado común, y el virus de la hepatitis A), Potivirus, Poxvirus (tales como el virus de la viruela y el virus de la viruela bovina), Sequivirus, Reovirus (tales como Rotavirus), Rabdovirus (tales como el virus de la rabia), Rabdovirus (tales como el virus de la estomatitis vesicular, Tetravirus, Togavirus (tales como el virus de la rubeola y el virus del río Ross), Tombusvirus, Totivirus, Timovirus, y Norovirus entre otros.

En algunos aspectos de la divulgación, MSM se usa para inhibir la actividad biológica de uno o más de los virus relacionados anteriormente.

Levadura: Un microorganismo eucariota clasificado en el reino de los hongos, con aproximadamente 1.500 especies descritas. La mayoría se reproduce sexualmente mediante gemación, aunque una pocas se reproducen mediante fisión binaria. Las levaduras generalmente son unicelulares, aunque algunas especies pueden convertirse en multicelulares mediante la formación de un anillo de células en gemación conectadas conocido como pseudohifas, o falsas hifas. Las levaduras ilustrativas que pueden utilizarse en los métodos y composiciones divulgados incluyen, aunque no de forma limitativa *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Hansenula*, y *Debaryomyces*.

II. Panorámica de algunas realizaciones

Se divulga en el presente documento un método para inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármaco, cuyo método implica seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la forma sensible del fármaco del patógeno bacteriano resistente a fármaco, inhibiendo por tanto un patógeno bacteriano resistente a fármaco. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano resistente a fármaco es MRSA.

Se divulga también un método para sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a fármaco al fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente, cuyo método comprende seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM, sensibilizando por tanto el patógeno bacteriano resistente a fármaco al fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano resistente a fármaco es MRSA.

Se divulga también en el presente documento un método para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco desarrolle resistencia al fármaco, cuyo método comprende seleccionar un patógeno bacteriano sensible a fármaco; y poner en contacto el patógeno bacteriano sensible a fármaco con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe el patógeno bacteriano sensible a fármaco, para inhibir por tanto que el patógeno bacteriano sensible a fármaco desarrolle resistencia al fármaco. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano sensible a fármaco es *Staphylococcus aureus*.

En los métodos descritos en el presente documento, el agente es un antibiótico de beta-lactama. En algunas realizaciones, el agente comprende derivados de penicilina, cefalosporinas, penemos, monobactamas, carbapenemos, inhibidores de la beta-lactamasa o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el agente comprende metilicina u oxacilina. En diversas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un

agente comprende aproximadamente 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 o aproximadamente 90-100 CIM de un antibiótico de beta-lactama. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente comprende aproximadamente 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 o 1 CIM de un antibiótico de beta-lactama.

5 En varias realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, el patógeno bacteriano está en un sujeto. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano está sobre una superficie.

10 En varias realizaciones, la cantidad eficaz de MSM es de 5-20 % de MSM, 5-16 % de MSM, 5-10 % de MSM, 5-8 % de MSM, 9-16 % de MSM o 10-15 % de MSM. MSM (porcentaje en peso de la composición que comprende MSM). En otras realizaciones, la cantidad eficaz de MSM es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 % de MSM. En otras realizaciones adicionales, la cantidad eficaz de MSM es de 10-16 % de MSM.

15 En varias realizaciones, el patógeno bacteriano se pone en contacto con la composición durante 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 o 120 horas.

En algunas realizaciones, la composición se administra por vía tópica o con un dispositivo inhalador. En algunas realizaciones, la composición comprende 0-5 % de cloruro sódico.

20 Por ejemplo, en una realización concreta de un método para inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármaco, el patógeno bacteriano es MRSA, el agente es un antibiótico de beta-lactama, la cantidad eficaz de MSM es aproximadamente 5-10 % de MSM en porcentaje en peso.

25 Por ejemplo, en una realización concreta de un método para sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a un fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente, el patógeno bacteriano es MRSA, la cantidad eficaz de MSM es aproximadamente 5-10 % de MSM en porcentaje en peso.

30 Por ejemplo, en una realización concreta de un método para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco desarrolle resistencia al fármaco, el patógeno bacteriano es *Staphylococcus aureus*, el agente es un antibiótico de beta-lactama, la cantidad eficaz de MSM es 5-10 % de MSM y la composición se administra tópicamente.

35 Se entenderá, además, que los métodos para sensibilizar o inhibir los patógenos bacterianos divulgados en el presente documento son útiles más allá de las circunstancias específicas que se describen en detalle en el presente documento, y se espera, por ejemplo, que sean útiles para cualesquiera de numerosas dolencias en las que un patógeno bacteriano se ha convertido en resistente al fármaco o donde sea deseable inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco se convierta en resistente al fármaco.

III. MSM

40 MSM es un compuesto de organoazufre con la fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_2$. MSM está estructuralmente relacionado con el dimetil sulfóxido (DMSO), pero el comportamiento de ambos es diferente. DMSO es un disolvente muy polar y un excelente ligando, con propiedades de disolución similares al agua mientras que MSM es menos polar y menos reactivo. MSM es bien conocido como suplemento nutritivo y como agente farmacéutico (véase, por ejemplo, Jacob and Appleton, MSM; the definitive guide: A comprehensive review of the science and therapeutics of

45 Methylsulfonylmethane, Topanga, CA: Freedom Press, 2003). MSM es conocido también por ser útil para el tratamiento de la artrosis (Kim et al., Osteoarthritis Cartilage, 14:286-94, 2006) y fiebre del heno (Barrager et al., J. Altern. Complement. Med., 8:167-74, 2002). Un experto en la materia relevante estará familiarizado con estos usos. Están disponibles comercialmente diversas calidades de MSM (por ejemplo, OptiMSM® comercializado por Bergstrom Nutrition, Corp., Vancouver, WA); una persona experta en la materia estará familiarizada con la fuente de

50 MSM. MSM es muy soluble en agua. A temperatura ambiente, las soluciones acuosas de 20 % de MSM pueden prepararse fácilmente. Son posibles soluciones acuosas de concentraciones de MSM más altas a temperaturas elevadas sobre la temperatura ambiente.

IV. DMSO

55 Dimetil sulfóxido (DMSO) es un compuesto de organoazufre con la fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Este líquido incoloro es un disolvente aprótico polar que disuelve los compuestos polares y no polares y es miscible en una amplia gama de disolventes orgánicos así como en agua. Tiene una propiedad distintiva de penetrar la piel muy fácilmente, de tal manera que uno puede saborearlo después de haber entrado en contacto con la piel. DMSO es bien conocido como

60 suplemento nutritivo y como agente farmacéutico. Un experto en la materia relevante estará familiarizado con estos usos. Están disponibles comercialmente diversas calidades de DMSO (por ejemplo, el producto n.º472301 de Sigma-Aldrich, Corp., St. Louis, MO) y una persona experta en la materia estará familiarizada con las fuentes de DMSO.

65 V. Antibióticos de Beta-lactama

Los antibióticos de beta-lactama son una clase amplia de agentes antibióticos, consistente en todos los agentes antibióticos que contienen un núcleo de beta-lactama en su estructura molecular. Esta clase de antibióticos es el grupo de antibióticos más ampliamente utilizado; una persona experta en la técnica relevante entenderá como seleccionar un antibiótico de beta-lactama adecuado para su uso para inhibir o tratar una bacteria.

5 Los ejemplos de antibióticos de beta-lactama incluyen, derivados de penicilina, cefalosporinas, penemos, monobactamas, carbapenemos, inhibidores de la beta-lactamasa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de derivados de penicilina incluyen, aminopenicilinas (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, y epicilina); carboxipenicilinas (por ejemplo, carbenicilina, ticarcilina, y termocilina); ureidopenicilinas (por ejemplo, azlocilina, piperacilina y mezlocilina); mecilinamo, sulbenicilina, penicilina benzatínica, penicilina G (bencilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), penicilina O (alilmercaptometilpenicilina), penicilina procaínica, oxacilina, metcilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, pivampicilina, hetacilina, becampicilina, metampicilina, talampicilina, co-amoxiclav (amoxicilina más ácido clavulánico), y piperacilina. Los ejemplos de cefalosporinas incluyen, cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefotetan, cefoxitina, ceforanida, ceftriaxona, cefotaxima, cefepodoxima proxetil, ceftazidima, cefepima, cefoperazona, ceftizoxima, cefixima y cefpiroma. Los ejemplos de penemos incluyen, faropenemo. Los ejemplos de monobactamas incluyen, aztreonamo y tigemonamo. Los ejemplos de carbapenemos incluyen, biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, y panipenem. Los ejemplos de inhibidores de la beta-lactamasa incluyen, tazobactam sal sódica de 4,4 dióxido del ácido tazobactam ([2S-(2alfa,3beta,5alfa)]-3-metil-7-oxo-3-(1H-1,2,3-triazol-1-ilmetil)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), sulbactam sal sódica de 4,4-dióxido del ácido (2S,5R)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), y ácido clavulánico (ácido (2R,5R,Z)-3-(2-hidroxietitideno)-7-oxo-4-oxa-1-aza-bicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico). Estos antibióticos están disponibles comercialmente y un experto en la materia estará familiarizado con la fuente de cada uno de los antibióticos divulgados en el presente documento.

25 Los antibióticos de beta-lactama son bactericidas, y actúan inhibiendo la síntesis de la capa de peptidoglicano de las paredes de las células bacterianas. Estos antibióticos actúan mediante unión irreversible a proteínas de unión a penicilina (PBP); esta unión perturba la síntesis de la pared celular, evitando la división celular.

30 Todos los antibióticos de beta-lactama tienen un anillo de beta-lactama en su estructura. La eficacia de estos antibióticos se basa en su capacidad de alcanzar las PBP intactas y su capacidad de unirse a las PBP. De este modo, existen dos modos principales de resistencia bacteriana a las beta-lactamas.

35 En primer lugar, las bacterias desarrollan algunas veces resistencia a los antibióticos de beta-lactama sintetizando beta-lactamasa, una enzima que ataca el anillo de beta-lactama. Si la bacteria produce la enzima beta-lactamasa (o la enzima penicilinasa), la enzima abrirá el anillo de beta-lactama del antibiótico, volviendo el antibiótico ineficaz. Los genes que codifican estas enzimas pueden estar presentes de forma inherente en el cromosoma bacteriano o pueden adquirirse mediante transferencia de plásmidos (resistencia mediada por plásmidos), y la expresión del gen de la beta-lactamasa puede inducirse mediante exposición a beta-lactamas. La producción de una beta-lactamasa por una bacteria no descarta necesariamente todas las opciones de tratamiento con antibióticos de beta-lactama. Por ejemplo, para superar este tipo de resistencia, los antibióticos de beta-lactama se administran a menudo con inhibidores de la beta-lactamasa tales como ácido clavulánico. Sin embargo, en todos los casos donde se sospecha la infección con bacterias productoras de beta lactamasa, la selección de un antibiótico de beta-lactama adecuado debe considerarse cuidadosamente antes del tratamiento. En particular, la elección de un tratamiento con un antibiótico de beta-lactama adecuado es de la mayor importancia frente a organismos con expresión inducible de la beta-lactamasa. Si la producción de beta lactamasa es inducible, entonces, el fracaso en el uso del tratamiento de beta-lactama más adecuado al inicio del tratamiento dará como resultado la inducción de producción de beta-lactamasa, dificultando de esta forma esfuerzos adicionales con otros antibióticos de beta-lactama.

50 En segundo lugar, una bacteria puede expresar una PBP alterada, a la cual no pueden unirse las beta-lactamas tan eficazmente como una PBP sin alterar. Como resultado, las beta-lactamas son menos eficaces para alterar la síntesis de la pared celular. Ejemplos notables de este modo de resistencia incluyen *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina y MRSA.

VI. MRSA

55 *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) es una bacteria de *Staphylococcus aureus* que tiene resistencia a uno o más antibióticos de beta-lactama. El nivel de resistencia al antibiótico de beta-lactama puede variar dependiendo de la cepa de MRSA. Por ejemplo, una cepa de MRSA concreta puede presentar resistencia completa o parcial a un antibiótico de beta-lactama.

60 La resistencia al antibiótico de beta-lactama de la bacteria *Staphylococcus aureus* se debe generalmente a la expresión de una PBP alterada, tal como PBP2a o PBP2', que tiene baja afinidad por los antibióticos de beta-lactama y puede funcionar en lugar de la PBP nativa. PBP2a está codificada por el gen *mecA* (véase Brown et al., J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018, 2005). Genes adicionales, que se encuentran también en aislados susceptibles, pueden alterar la expresión de la resistencia a la metilina en *Staphylococcus aureus*, dando como resultado una heterogeneidad de la resistencia (véase Brown et al., J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018,

2005).

La infección por MRSA está producida por una bacteria de *Staphylococcus aureus* que tiene resistencia completa o parcial a uno o más antibióticos de beta-lactama. *Staphylococcus aureus* coloniza más comúnmente las narinas anteriores (las fosas nasales), aunque el tracto respiratorio, las heridas abiertas, los catéteres intravenosos, y el tracto urinario son también sitios potenciales para la infección. Los individuos sanos pueden transportar MRSA asintóticamente durante periodos que varían de unas pocas semanas a muchos años. Los pacientes con sistemas inmunitarios comprometidos tienen un riesgo significativamente mayor de infección secundaria sintomática.

MRSA puede progresar sustancialmente en un lapso de tiempo de 24-48 horas desde los síntomas iniciales, incluyendo los síntomas tópicos iniciales. Después de 72 horas, MRSA arraiga en tejidos humanos y, eventualmente, se vuelve resistente al tratamiento. Por vía tópica, la presentación inicial de MRSA es de pequeñas protuberancias rojas que se asemejan a espinillas, picaduras de araña, o forúnculos que pueden estar acompañados por fiebre y, ocasionalmente, erupciones. En unos pocos días, las protuberancias se hacen más grandes, más dolorosas, y, eventualmente, se abren convertidas en profundos forúnculos rellenos de pus.

Se sabe que existen muchas cepas de MRSA, incluyendo MRSA asociado a hospitales (o centros médicos) (HA-MRSA) y MRSA asociado a comunidades (CA-MRSA). Aproximadamente, un 75 por ciento de infecciones de CA-MRSA se localizan en la piel y el tejido blando y normalmente pueden tratarse eficazmente. Sin embargo, algunas cepas de CA-MRSA presentan una virulencia aumentada, diseminándose más rápidamente y produciendo enfermedades mucho más graves que las infecciones de HA-MRSA tradicionales, y pueden afectar órganos vitales y conducir a una infección generalizada (septicemia), síndrome de choque tóxico y neumonía necrotizante ("carnívora"). Se cree que esto se debe a las toxinas transportadas por las cepas de CA-MRSA. No se sabe por qué algunas personas sanas desarrollan infecciones de la piel por CA-MRSA que son tratables mientras que otras infectadas con la misma cepa desarrollan infecciones graves o mueren.

Las manifestaciones más comunes de CA-MRSA son infecciones de la piel tales como fascitis necrotizante o piomiositis (que se encuentran más comúnmente en los trópicos), neumonía necrotizante, endocarditis infectiva (que afecta a las válvulas del corazón), o infecciones de huesos o articulaciones. CA-MRSA da como resultado a menudo la formación de abscesos que requieren incisión y drenaje. Antes de la diseminación del MRSA en la comunidad, los abscesos no se consideraban contagiosos ya que se suponía que la infección requería romper la integridad de la piel y la introducción de estafilococos procedentes de la colonización normal de la piel. Sin embargo, el CA-MRSA que ha emergido recientemente es transmisible (similar, pero con diferencias muy importantes) de HA-MRSA. Adicionalmente, CA-MRSA tiene menos probabilidad de causar celulitis que otras formas de MRSA.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para tratar, inhibir y/o sensibilizar MRSA. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento son útiles para tratar, inhibir y/o sensibilizar MRSA en un sujeto. Se divulgan en el presente documento métodos para detectar MRSA y seleccionar un sujeto con infección por MRSA.

VII. Otros patógenos bacterianos resistentes a fármacos

Un patógeno bacteriano resistente a fármaco es un patógeno bacteriano que es resistente a uno o más agentes antimicrobianos. Un patógeno bacteriano puede ser a la vez resistente a fármaco y sensible a fármaco si es sensible a un agente antimicrobiano, pero resistente a otro.

En algunas realizaciones, la composición divulgada en el presente documento se usa para tratar, inhibir o sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a fármacos.

En determinadas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento son eficaces para tratar, inhibir o sensibilizar varias formas resistentes a fármacos de patógenos bacterianos incluyendo la forma resistente a fármaco de uno o más de *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus* sp., *Actinomyces*, *Actinomyces* sp. (tales como *Actinomyces israelii* y *Actinomyces naeslundii*), *Aeromonas* sp. (tales como *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii biovar sobria* (*Aeromonas sobria*), y *Aeromonas caviae*), *Anaplasma phagocytophilum*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacillus* sp. (tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, y *Bacillus stearothermophilus*), *Bacteroides* sp. (tales como *Bacteroides fragilis*), *Bartonella* sp. (tales como *Bartonella bacilliformis* y *Bartonella henselae*, *Bifidobacterium* sp., *Bordetella* sp. (tales como *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, y *Bordetella bronchiseptica*), *Borrelia* sp. (tales como *Borrelia recurrentis*, y *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* sp. (tales como *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melintensis* y *Brucella suis*), *Burkholderia* sp. (tales como *Burkholderia pseudomallei* y *Burkholderia cepacia*), *Campylobacter* sp. (tales como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Campylobacter fetus*), *Capnocytophaga* sp., *Cardiobacterium hominis*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Citrobacter* sp. *Coxiella burnetii*, *Corynebacterium* sp. (tales como, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeum* y *Corynebacterium*), *Clostridium* sp. (tales como *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium tetani*), *Eikenella corrodens*, *Enterobacter* sp. (tales como *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae* y *Escherichia coli*, incluyendo *Escherichia coli oportunistas*, tales como *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatógena, *E.*

coli enterohemorrágica, enteroaggregative *E. coli* y uropathogenic *E. coli*) *Enterococcus* sp. (tales como *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*) *Ehrlichia* sp. (tales como *Ehrlichia chafeensis* y *Ehrlichia canis*), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* sp., *Francisella tularensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Haemophilus* sp. (tales como *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus ducreyi*,
5 *Haemophilus aegyptius*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus* y *Haemophilus parahaemolyticus*, *Helicobacter* sp. (tales como *Helicobacter pylori*, *Helicobacter cinaedi* y *Helicobacter fennelliae*), *Kingella kingii*, *Klebsiella* sp. (tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella granulomatis* y *Klebsiella oxytoca*), *Lactobacillus* sp., *Listeria monocytogenes*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*,
10 *Peptostreptococcus* sp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella* sp., *Mobiluncus* sp., *Micrococcus* sp., *Mycoplasma* sp. (tales como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, y *Mycoplasma genitalium*), *Nocardia* sp. (tales como *Nocardia asteroides*, *Nocardia cyriacigeorgica* y *Nocardia brasiliensis*), *Neisseria* sp. (tales como *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*), *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*. *Prevotella* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella melaninogenica*, *Proteus* sp. (tales como *Proteus vulgaris* y *Proteus mirabilis*),
15 *Providencia* sp. (tales como *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri* y *Providencia stuartii*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes*, *Rhodococcus equi*, *Rickettsia* sp. (tales como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia akari* y *Rickettsia prowazekii*, *Orientia tsutsugamushi* (anteriormente: *Rickettsia tsutsugamushi*) y *Rickettsia typhi*), *Rhodococcus* sp., *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* sp. (tales como *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*), *Serratia* sp. (tales como *Serratia marcescens* y *Serratia liquifaciens*), *Shigella* sp. (tales como *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* sp. (tales como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* sp. (tales como
20 *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a cloranfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a eritromicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a tetraciclina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina, y *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprim, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 4 resistente a cloranfenicol, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6B resistente a espectinomicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 9V resistente a estreptomina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 resistente a optoquina,
30 *Streptococcus pneumoniae* serotipo 18C resistente a rifampicina, *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F resistente a penicilina, o *Streptococcus pneumoniae* serotipo 23F resistente a trimetoprima), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Estreptococos del Grupo A*, *Streptococcus pyogenes*, *Estreptococos del Grupo B*, *Streptococcus agalactiae*, *Estreptococos del Grupo C*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus equismilis*, *Estreptococos del Grupo D*, *Streptococcus bovis*, *Estreptococos del Grupo G* y *Streptococcus anginosus del Grupo G* de *estreptococos*, *Spirillum minus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema* sp. (tales como *Treponema carateum*, *Treponema petenue*, *Treponema pallidum* y *Treponema endemicum*, *Tropheryma whippelii*, *Ureaplasma urealyticum*, *Veillonella* sp., *Vibrio* sp. (tales como *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*,
35 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio metchnikovii*, *Vibrio damsela* y *Vibrio furnisii*), *Yersinia* sp. (tales como *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*) o *Xanthomonas maltophilia*, entre otros.

VIII. Enfermedades resistentes a fármacos

En algunas realizaciones, una composición divulgada en el presente documento es para su uso en un método de
45 tratar, inhibir o sensibilizar una enfermedad infecciosa resistente a fármaco.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden ser eficaces en el tratamiento o la inhibición de
50 infecciones resistentes a fármacos, sarampión, tétanos, malaria, infecciones del tracto respiratorio superior e inferior, hepatitis, fiebre tifoidea, infección por *Staphylococcus aureus* con el intermedio de vancomicina/glicopéptido, enterococos resistentes a vancomicina, MRSA, y *Streptococcus pneumoniae*, entre otros.

Se divulgan también en el presente documento composiciones que pueden tratar, inhibir o sensibilizar eficazmente
55 varias formas resistentes a fármacos de enfermedades infecciosas, incluyendo la forma resistente a fármaco de uno o más de una infección de *Acinetobacter*, actinomicosis, infección por adenovirus, enfermedad del sueño de África (tripanosomiasis africana), SIDA, amebiasis, anaplasmosis, Ántrax, infección por *Arcanobacterium haemolyticum*, fiebre hemorrágica argentina, ascariasis, aspergilosis, infección por astrovirus, babesiosis, infección por *Bacillus cereus*, neumonía bacteriana, vaginosis bacteriana (VB), infección por bacteroides, balantidiasis, infección por *Baylisascaris*, infección por virus BK, piedra negra, infección por *Blastocystis hominis*, blastomicosis, fiebre hemorrágica boliviana, infección por *Borrelia*, botulismo, fiebre hemorrágica brasileña, brucelosis, infección por *Burkholderia*, infección por *Calicivirus*, campylobacteriosis, candidiasis (moniliasis; candidiasis vaginal, enfermedad por arañazo de gato, celulitis, enfermedad de Chagas, chancroide, viruela aviar, clamidia, infección por *Chlamydomonas pneumoniae*, cólera, cromoblastomicosis, clonorquiasis, infección por *Clostridium difficile*, coccidioidomicosis, fiebre de la garrapata de Colorado, resfriado común, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, criptococosis, criptosporidiosis, larva migrans cutánea (CLM), ciclosporiasis,
65 cisticercosis, infección por citomegalovirus, fiebre del dengue, dientamoebiasis, difteria, difilobotriasis, dracunculiasis, fiebre hemorrágica del Ébola, equinococosis, erliquiosis, enterobiasis (infección por lombrices intestinales), infección

por Enterococos, infección por enterovirus, tífus epidémico, eritema infeccioso, exantema súbito, fasciolopsiasis, fasciolosis, insomnio familiar fatal (FFI), filariasis, envenenamiento alimenticio, infección por amebas de vida libre, infección por Fusobacterium, gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial), geotricosis, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), giardiasis, muermo, gnatostomiasis, gonorrea, granuloma inguinal (donovanosis),
 5 infección por estreptococos del grupo A, infección por estreptococos del grupo B, infección por Haemophilus influenzae, enfermedad de la mano, el pie y la boca (HMF), Hantavirus, infección por Helicobacter pylori, síndrome urémico-hemolítico (HUS), fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS), Hepatitis A, B, C, D, o E, herpes simple, histoplasmosis, infección por anquilostomiasis, infección por bocavirus humano, Ehrlichiosis ewingii humana, anaplasmosis granulocítica humana (HGA), infección por metapneumovirus humano, Erlichiosis monocítica humana,
 10 infección por el virus del papiloma humano (VPH), infección por virus paragripal humano, o himenolepiasis, entre otros.

Se divulgan también en el presente documento composiciones que pueden tratar, inhibir o sensibilizar eficazmente varias formas resistentes a fármacos de enfermedades infecciosas, incluyendo la forma resistente a fármaco de una
 15 o más de Mononucleosis infecciosa por virus de Epstein-Barr (Mono), gripe (flu), Isosporiasis, Enfermedad de Kawasaki, Queratitis, infección por Kingella kingae, Kuru, fiebre de Lassa, Legionelosis, Leishmaniasis, Lepra, Leptospirosis, Listeriosis, enfermedad de Lyme, Filariasis linfática, Coriomeningitis linfocítica, Malaria, Fiebre hemorrágica de Marburg (MHF), Sarampión, Melioidosis (enfermedad de Whitmore), Meningitis, Enfermedad meningocócica, Metagonimiasis, Microsporidiosis Microsporidia, Molusco contagioso (MC), Paperas, Tífus murino, Mycoplasma pneumoniae, Micetoma, Miasis, Conjuntivitis neonatal, Oncocerciasis (ceguera del río), Paracoccidioidomycosis (blastomycosis de Sudamérica), Paragonimiasis, Pasteurellosis, Pediculosis capitis (Piojos de la cabeza), Pediculosis corporis (Piojos del cuerpo), Pediculosis pubis (Piojos de la zona púbica, liendres), Enfermedad inflamatoria pélvica (PID), Pertussis (Tosferina), Peste, Infección pneumocócica, Pneumocystis pneumoniae (PCP), Neumonía, poliomielitis, poliovirus, meningoencefalitis amebica primaria (PAM),
 20 Leucoencefalopatía multifocal progresiva, Psitacosis, fiebre Q, Rabia, Fiebre por mordedura de rata, Virus sincitial respiratorio, Rinosporidiosis, Infección por rinovirus, Infección por Rickettsia, Viruela por Rickettsia, Fiebre del valle del Rift (RVF), Fiebre maculosa de las Montañas Rocosas (RMSF), Infección por rotavirus, Rubeola, Salmonelosis, SARS (Síndrome respiratorio agudo grave), Sarna, Esquistosomiasis, Septicemia, Shigelosis, Herpes (Herpes zóster), Viruela, Esporotricosis, Envenenamiento alimenticio por estafilococos, Infección por estafilococos,
 30 Strongiloidiasis, Sífilis, Teniasis, Tétanos (Lockjaw), Tinea barbae (foliculitis de la barba), Tinea capitis (tiña del cuero cabelludo), Tinea corporis (Tiña del cuerpo), Tinea cruris (Tiña inguinal), Tinea manuum (Tiña de la mano), Tinea nigra, Tinea pedis (Pie de atleta), Tinea unguium (Onicomycosis), Tinea versicolor (Pitiriasis versicolor), Toxocariasis (Larva Migrans Ocular (OLM)), Toxocariasis (Larva Migrans Visceral (VLM)), Toxoplasmosis, Triquinelosis, Tricomoniasis, Tricuriasis (Infección por tricocéfalos), Tularemia, Infección por Ureaplasma urealyticum, Encefalitis equina venezolana, Fiebre hemorrágica de Venezuela, Neumonía vírica, Fiebre del Nilo occidental, Piedra blanca, Yersiniosis, Fiebre amarilla, o zigomicosis, entre otros.

VIII. Métodos de tratamiento, inhibición o sensibilización de un patógeno bacteriano

40 Las realizaciones divulgadas en el presente documento incluyen composiciones para su uso en métodos de inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármaco, métodos de sensibilizar un patógeno bacteriano resistente a fármaco a un fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente y métodos para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco desarrolle resistencia al fármaco, entre otros.

45 Algunas realizaciones incluyen composiciones para su uso en métodos de inhibir un patógeno bacteriano diferente de *Mycobacterium tuberculosis* al seleccionar un patógeno resistente a fármaco y poner en contacto el patógeno con una composición como se describe en el presente documento, por ejemplo, una composición que comprende MSM y un agente antimicrobiano. Por ejemplo, poner en contacto un patógeno bacteriano resistente a fármaco seleccionado con una composición que comprende 10-16 % MSM y un nivel CIM de un agente antimicrobiano. En algunas
 50 realizaciones, el patógeno bacteriano es MRSA y el agente microbiano es un antibiótico de beta-lactama, por ejemplo, metilicina u oxacilina. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano está en un sujeto o sobre una superficie.

Algunas realizaciones incluyen composiciones para su uso en métodos para sensibilizar un patógeno bacteriano
 55 resistente a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* a un fármaco al cual el patógeno bacteriano es resistente, seleccionando un patógeno bacteriano resistente a fármaco y poniendo en contacto el patógeno con una composición que comprende MSM. Por ejemplo, poniendo en contacto un patógeno bacteriano seleccionado con una composición que comprende 10-16 % de MSM. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano seleccionado es MRSA. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano está en un sujeto o sobre una superficie.

60 Algunas realizaciones incluyen composiciones para su uso en métodos para inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* desarrolle resistencia al fármaco seleccionando un patógeno bacteriano sensible a fármaco y poniendo en contacto el patógeno con una composición, como se describe en el presente documento, por ejemplo, una composición que comprende MSM y un agente antimicrobiano. Por
 65 ejemplo, poniendo en contacto un patógeno bacteriano sensible a fármaco seleccionado con 10-16 % de MSM y un nivel CIM de un agente antimicrobiano. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano es *Staphylococcus aureus*

y el agente antimicrobiano es un antibiótico de beta-lactama, por ejemplo, meticilina u oxacilina. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano está en un sujeto o sobre una superficie.

En algunas realizaciones, una composición que comprende MSM y una concentración sub-CIM de un antibiótico es igualmente o más eficaz en la reducción o en la destrucción de determinadas bacterias resistentes a fármaco en comparación con el antibiótico solo a niveles CIM. En otras realizaciones, una composición que comprende MSM y un antibiótico es más eficaz en la reducción o eliminación de bacterias procedentes de un sitio de infección en comparación con el antibiótico solo. En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento aumentan el tratamiento de MRSA.

Selección de un patógeno bacteriano sensible a fármaco

Los métodos de seleccionar un patógeno bacteriano sensible a fármaco son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones se detecta un patógeno bacteriano sensible a fármaco como se describe en el presente documento, y posteriormente se selecciona, seleccionando por tanto un patógeno bacteriano sensible a fármaco. Los métodos de detección de un patógeno bacteriano como se describe en el presente documento son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dicha detección puede estar basada en la determinación de la CIM de un antibiótico para un patógeno bacteriano sensible a fármaco. Los métodos de determinación de una CIM son bien conocidos de aquellas personas expertas en la materia (véase, por ejemplo, Andrews, J. of Antimicrobial Chemotherapy, 48:5-16, 2001). Por ejemplo, se pueden determinar las CIM mediante métodos de dilución en agar o caldo siguiendo usualmente las directrices de un cuerpo de referencia tal como CLSI, BSAC o EUCAST. Existen algunos métodos comerciales disponibles, incluyendo las tiras Etest® bien establecidas (bioMérieux SA, Francia), y el método Oxoid MICEvaluator. El sistema Etest® comprende un gradiente de concentración predefinido y continuo de diferentes agentes antimicrobianos, que cuando se aplica a placas de agar inoculadas y se incuban, crea elipsis de inhibición microbiana. La CIM se determina cuando la elipsis de inhibición interseca con la tira, y se lee fácilmente la escala de lectura de la CIM sobre la tira (véase, por ejemplo, Andrews, J. of Antimicrobial Chemotherapy, 48:5-16, 2001).

En algunas realizaciones, se detecta una bacteria de *Staphylococcus aureus* como se describe en el presente documento, y posteriormente se selecciona, seleccionando por tanto un patógeno bacteriano sensible a fármaco. *Staphylococcus aureus* es un coco Gram-positivo en el que las células redondeadas, de aproximadamente 1 µm de diámetro, forman agrupaciones similares a racimos indicadoras de la capacidad de dividirse en más de un plano. Esta bacteria es capaz de respiración aerobia y anaerobia y la mayoría de las cepas fermentan manitol anaerobiamente. Sobre agar sangre forman colonias doradas o blancas características. Producen catalasa, coagulasa y un factor extracelular de aglutinación de células, y algunas cepas producen cápsulas (véase Brown et al., J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018, 2005).

Los métodos para detectar *Staphylococcus aureus* son bien conocidos de los expertos en la materia. Los métodos de detección no limitantes incluyen la prueba de la coagulasa en tubo, la prueba de la coagulasa en porta, la prueba de aglutinación del látex, las pruebas de la ADNasa y de la nucleasa termoestable, las pruebas bioquímicas comerciales tales como el sistema VITEK 2 (bioMérieux), Staphychrom II (International Microbio, Signes, Francia), el sistema Phoenix (Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD) y los ensayos moleculares, incluyendo la PCR- y los ensayos basados en sondas de ADN. Para una revisión, véase Brown et al., J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018, 2005). Utilizando el sistema Etest®, un patógeno bacteriano *Staphylococcus aureus* sensible a fármaco tendrá en general una CIM para la oxacilina de 2 µg/ml o menos (véase, por ejemplo, el manual técnico de Etest®, AB bioMérieux, 2008).

Algunas realizaciones comprenden seleccionar un patógeno bacteriano sensible a fármaco, en el que el patógeno está en la superficie. Estas realizaciones comprenden determinar si un patógeno bacteriano sensible a fármaco está en una superficie, y seleccionar dicha superficie, seleccionando por tanto un patógeno sensible a fármaco en una superficie. Como alternativa, algunas realizaciones incluyen seleccionar una superficie con un patógeno bacteriano sensible a fármaco. Un experto en la materia relevante entenderá como llevar a cabo dichos métodos. Los ejemplos no limitantes incluyen la observación de la superficie u obtener una muestra de la superficie y detectar un patógeno bacteriano sensible a fármaco en la muestra. Los expertos en la materia conocen los métodos para detectar un patógeno bacteriano sensible al fármaco y se describen en el presente documento. Los ejemplos de observación de la superficie incluyen reconocer cuándo una superficie ha entrado en contacto con un patógeno bacteriano sensible a fármaco, por ejemplo, si se sabe que un patógeno bacteriano sensible a fármaco ha entrado en contacto con la superficie.

Algunas realizaciones comprenden seleccionar un patógeno bacteriano sensible a fármaco, en el que el patógeno está en un sujeto. Estas realizaciones comprenden determinar si un patógeno bacteriano sensible a fármaco está en un sujeto, y seleccionar dicho sujeto, seleccionando por tanto un patógeno sensible a fármaco en un sujeto. Como alternativa, algunas realizaciones incluyen seleccionar un sujeto con un patógeno bacteriano sensible a fármaco. Un experto en la materia relevante entenderá como llevar a cabo dichos métodos. Los ejemplos no limitantes incluyen la observación del sujeto u obtener una muestra biológica del sujeto y detectar un patógeno bacteriano sensible a fármaco en la muestra. Los expertos en la materia conocen los métodos para detectar un patógeno bacteriano

sensible al fármaco y se describen en el presente documento. Los ejemplos de observación del sujeto incluyen reconocer los síntomas presentados por un sujeto que tiene un patógeno bacteriano sensible a fármaco en el mismo así como observar el éxito del tratamiento farmacológico del patógeno bacteriano en el sujeto.

5 **Selección de un patógeno bacteriano resistente a fármaco**

Los métodos de seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones se detecta un patógeno bacteriano resistente a fármaco como se describe en el presente documento, y posteriormente se selecciona, seleccionando por tanto un patógeno bacteriano resistente a fármaco. Los métodos de detección de un patógeno bacteriano resistente a fármaco como se describe en el presente documento son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dicha selección puede estar basada en la CIM de un antibiótico para un patógeno bacteriano. Los métodos de determinación de una CIM son bien conocidos de aquellas personas expertas en la materia y se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco comprende seleccionar un MRSA. Los métodos de selección de un patógeno en el que el patógeno bacteriano resistente a fármaco es un MRSA son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones se detecta una bacteria MRSA como se describe en el presente documento, y posteriormente se selecciona, seleccionando por tanto un MRSA. Los métodos para detectar MRSA son conocidos por los expertos en la materia.

Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de detección de un MRSA incluyen el sistema Etest® (bioMérieux SA, Francia) en combinación con un hallazgo de que la bacteria en cuestión es una bacteria *Staphylococcus aureus*, La difusión en disco, una prueba de aglutinación del látex con anticuerpos contra PBP2a o PBP2', y los ensayos moleculares que incluyen la PCR y los ensayos basados en sondas de ADN. Para una revisión, véase Brown et al., J. Antimicrob. Chemother., 56: 1000-1018, 2005 y Sturenburg, Ger. Med. Sci., 6: Doc 06, 2009. Se describen más métodos en las patentes de Estados Unidos 7.449.289, 7.297.517, 5.496.706, 5.776.712 y 6.197.504 y en las publicaciones de solicitudes de patente de Estados Unidos números 2003/0165953, 2006/0040871, 2007/0082340, 2008/0220428, 2008/0227087, 2009/0081663, 2009/0130115, 2009/0181395, 2009/0203013, 2009/0325147, 2010/0197649. Utilizando el sistema Etest®, Un patógeno bacteriano MRSA tendrá en general una CIM para la oxacilina de 2 µg/ml o más (véase, *por ejemplo.*, el manual técnico de Etest®, AB bioMerieux, 2008).

Algunas realizaciones comprenden seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco, en el que el patógeno está en la superficie. Estas realizaciones comprenden determinar si un patógeno bacteriano resistente a fármaco está en una superficie, y seleccionar dicha superficie, seleccionando por tanto un patógeno resistente a fármaco en una superficie. Como alternativa, algunas realizaciones incluyen seleccionar una superficie con un patógeno bacteriano resistente a fármaco. Un experto en la materia relevante entenderá como llevar a cabo dichos métodos. Los ejemplos no limitantes incluyen la observación de la superficie u obtener una muestra de la superficie y detectar un patógeno bacteriano resistente a fármaco en la muestra. Los expertos en la materia conocen los métodos para detectar un patógeno bacteriano resistente al fármaco y se describen en el presente documento. Los ejemplos de observación de la superficie incluyen reconocer cuándo una superficie ha entrado en contacto con un patógeno bacteriano resistente a fármaco, por ejemplo, si se sabe que un patógeno bacteriano resistente a fármaco ha entrado en contacto con la superficie.

Algunas realizaciones comprenden seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco, en el que el patógeno está en un sujeto. Estas realizaciones comprenden determinar si un patógeno bacteriano resistente a fármaco está en un sujeto, y seleccionar dicho sujeto, seleccionando por tanto un patógeno bacteriano resistente a fármaco en un sujeto. Como alternativa, algunas realizaciones incluyen seleccionar un sujeto con un patógeno bacteriano resistente a fármaco. Un experto en la materia relevante entenderá como llevar a cabo dichos métodos. Los ejemplos no limitantes incluyen la observación del sujeto u obtener una muestra biológica del sujeto y detectar un patógeno bacteriano resistente a fármaco en la muestra. Los expertos en la materia conocen los métodos para detectar un patógeno bacteriano resistente al fármaco y se describen en el presente documento. Los ejemplos de observación del sujeto incluyen reconocer los síntomas presentados por un sujeto que tiene un patógeno bacteriano resistente a fármaco en el mismo así como observar el fracaso del tratamiento farmacológico del patógeno bacteriano en el sujeto.

Algunas realizaciones comprenden seleccionar un patógeno bacteriano resistente a fármaco en un sujeto, en el que el patógeno resistente a fármaco es MRSA. Estas realizaciones comprenden determinar si MRSA está en un sujeto, y seleccionar dicho sujeto, seleccionando por tanto un MRSA en un sujeto. Como alternativa, algunas realizaciones incluyen seleccionar un sujeto con MRSA. Un experto en la materia conocerá como llevar a cabo dichos métodos. Los ejemplos no limitantes incluyen la observación de un sujeto u obtener una muestra biológica del sujeto y detectar la presencia de MRSA en la muestra.

Los ejemplos de observación del sujeto incluyen reconocer los síntomas de infección por MRSA en el sujeto, observar el fracaso del tratamiento con un antibiótico de beta-lactama de un sujeto que tiene una infección por patógenos bacterianos, por ejemplo, una infección por *Staphylococcus aureus*, así como, observar el fracaso del tratamiento con un antibiótico de beta-lactama de un sujeto que tiene un síntoma de MRSA. Los expertos en la

materia conocen otros métodos de observar un sujeto para determinar si el sujeto es un sujeto con MRSA.

Son bien conocidos por los expertos en la materia los métodos para obtener una muestra biológica del sujeto y ensayar la muestra para la presencia de MRSA. Por ejemplo, MRSA puede detectarse limpiando las fosas nasales de los pacientes y aislando las bacterias que se encuentran en el interior. Los expertos en la materia conocen los métodos para detectar un patógeno bacteriano resistente al fármaco y se describen en el presente documento. Los ejemplos de observación del sujeto incluyen reconocer los síntomas presentados por un sujeto que tiene un patógeno bacteriano en el mismo así como observar el fracaso del tratamiento farmacológico del patógeno bacteriano en el sujeto.

10 ***Puesta en contacto de un patógeno bacteriano***

Los métodos de poner en contacto un patógeno bacteriano con una composición son bien conocidos por los expertos en la materia relevante. Dichos métodos dependerán del tipo y la localización del patógeno bacteriano y del tipo de composición utilizada. Se describen en el presente documento métodos de poner en contacto un patógeno bacteriano, incluyendo los métodos de poner en contacto un patógeno bacteriano en un sujeto, y los métodos de poner en contacto un patógeno bacteriano en una superficie, entre otros. Un experto en la materia sabrá que método aplicar.

Se proporciona un método de poner en contacto un patógeno bacteriano en una superficie con una composición como se describe en el presente documento. Por ejemplo, pulverizando una composición como se proporciona en el presente documento sobre la superficie, o limpiando una superficie con un paño que comprende una composición que se proporciona en el presente documento. Un experto en la materia comprenderá como aplicar composiciones que se describen en el presente documento a una superficie.

Se divulga un método de poner en contacto un patógeno bacteriano en un sujeto con una composición, como se describe en el presente documento. Dichos métodos incluyen la administración de un compuesto como se describe en el presente a un sujeto, de tal manera que el compuesto entra en contacto con un patógeno bacteriano. Por ejemplo, un compuesto o agente, tal como MSM, puede administrarse a un sujeto mediante cualquier ruta eficaz. Las vías de administración a modo de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, e intravenosa), rutas oral, sublingual, rectal, transdérmica (tal como tópica), intranasal, vaginal y mediante inhalación. Los tipos concretos de administración incluyen la administración tópica o la administración a la mucosa nasal o a los pulmones mediante administración por inhalación.

En algunas realizaciones, una composición formulada para la administración tópica puede utilizarse para entrar en contacto con un patógeno bacteriano localizado en o en la piel de un sujeto. Una composición formulada para la administración por inhalación se de usar para entrar en contacto con un patógeno bacteriano localizado las vías aéreas, membranas mucosales o pulmones de un sujeto, entre otros.

En algunas realizaciones, una composición que comprende MSM, o MSM y un agente antimicrobiano, se formula para la administración tópica y se usa para entrar en contacto con un patógeno bacteriano resistente a fármaco localizado sobre o en un sujeto. Un experto en la materia entenderá cuando es adecuada la administración tópica. Por ejemplo, La administración tópica es adecuada cuando el patógeno bacteriano está localizado en la piel de un sujeto o en la superficie del cuerpo del sujeto.

En otras realizaciones, una composición que comprende MSM o MSM y un agente antimicrobiano se formula para la administración mediante un dispositivo inhalador y se usa para entrar en contacto con un patógeno bacteriano resistente a fármaco localizado sobre o en un sujeto. Un experto en la materia entenderá cuando es adecuada la administración mediante un dispositivo inhalador... Por ejemplo, la administración mediante un dispositivo inhalador es adecuada cuando el patógeno bacteriano está localizado en las membranas de las mucosas de los sujetos o en los pulmones de los sujetos.

Los métodos de entrar en contacto con un patógeno bacteriano pueden emplear dispositivos especializados, por ejemplo, un dispositivo inhalador. Los dispositivos inhaladores son útiles para administrar una composición que se describe en el presente documento a un patógeno bacteriano localizado en las membranas de las mucosas, las vías aéreas y/o los pulmones de un sujeto.

Los inhaladores, de acuerdo con algunas realizaciones, proporcionan acceso directo de MSM y/u otros agentes al tejido pulmonar infectado para sensibilizar patógenos bacterianos al antibiótico. Como alternativa, los inhaladores proporcionan acceso directo de MSM y un agente antimicrobiano al tejido pulmonar infectado para inhibir o tratar el patógeno bacteriano. De acuerdo con algunas realizaciones, los inhaladores son útiles para tratar tejido pulmonar infectado con MRSA.

En una realización, se proporciona un inhalador a la diana del sitio de infección (por ejemplo, pulmones) de algunas enfermedades infecciosas, tales como una infección por MRSA. En algunas de dichas realizaciones, el dispositivo inhalador comprende un nebulizador. En otras realizaciones, se usa un inhalador. En algunas realizaciones, se usa

un inhalador de dosis medida presurizado, y la composición se inhala en forma de aerosol líquido. En otras realizaciones, se usan inhaladores de polvo seco y la composición se inhala en forma de aerosol en polvo. En algunas realizaciones, se usa la administración oral, intravenosa, intramuscular, o subcutánea además de o en vez de una terapia de inhalación.

5 En determinadas realizaciones, el dispositivo inhalador administra gotículas o partículas de la formulación inhalada de un tamaño capaz de alcanzar los bronquiolos de los pulmones del paciente. En algunas realizaciones, el dispositivo inhalador está sincronizado con el ritmo respiratorio del paciente para transportar la formulación a los bronquiolos. La terapia de inhalación de acuerdo con una realización, permite una administración más directa de la formulación inhalada a los tejidos diana pulmonares infectados. El direccionamiento directo es ventajoso en algunas realizaciones debido a que permite la reducción de la cantidad de compuestos antimicrobianos incorporados en la formulación manteniendo a la vez o mejorando la eficacia de la formulación frente a los microorganismos infecciosos. En otras realizaciones, la administración directa aumenta la eficacia de un régimen antimicrobiano dado contra una o más cepas de microorganismo resistentes a fármaco. El direccionamiento directo, de acuerdo con otras realizaciones, minimiza los efectos secundarios minimizando el contacto con el tejido no dirigido.

La gotícula directa o el tamaño de partículas que se proporcionan de acuerdo con algunas realizaciones reduce el volumen de MSM que se administra en comparación con la terapia de ventilación tradicional.

20 La capacidad de administrar agentes antimicrobianos como un inhalador (por ejemplo, en forma de aerosol en polvo) con MSM, es especialmente ventajosa en algunas realizaciones debido a que permite una autoestabilidad aumentada y dosificaciones preenvasadas. Estos es de particular utilidad para individuos en naciones subdesarrolladas o en desarrollo que no tienen acceso regular a instalaciones sanitarias. Se pueden proporcionar ciclos completos de tratamiento a un sujeto afectado en una única visita a un especialista a cargo de la atención médica sin necesidad de permanencia en el hospital o de visitas repetidas. En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento son adecuadas para la autoadministración (por ejemplo, mediante dispositivos inhaladores) y son por tanto especialmente adecuadas para los pacientes con acceso a atención médica.

30 En determinadas realizaciones, el volumen total de composición inhalada que comprende MSM y/u otros agentes es aproximadamente de 2-8 ml. En algunas realizaciones, el volumen total de composición inhalada que comprende MSM y/u otros agentes es aproximadamente de 2 ml a aproximadamente 4 ml. En algunas realizaciones, el volumen total de MSM y/u otros agentes es aproximadamente de 6 ml a aproximadamente 8 ml. En otras realizaciones adicionales, el volumen total de composición inhalada que comprende MSM y/u otros agentes es aproximadamente de 3 ml a aproximadamente 7 ml, incluyendo 4, 5, y 6 ml. Por tanto, en algunas realizaciones, la concentración de MSM administrada mediante inhalación varía desde aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 20 %, incluyendo aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 %.

40 En varias realizaciones, poner en contacto un patógeno bacteriano incluye poner en contacto el patógeno bacteriano con una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente antimicrobiano. Dicha puesta en contacto puede implicar la administración en una única dosis, o en varias dosis, por ejemplo, diariamente, durante un ciclo de tratamiento.

45 En algunas realizaciones, poner en contacto un patógeno bacteriano con una composición, como se describe en el presente documento incluye poner en contacto el patógeno con la composición durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 días, o cualquier tiempo entre ellos. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano se pone en contacto durante aproximadamente 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, o aproximadamente 120 horas, con una composición, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano se pone en contacto durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o aproximadamente 24 horas, con una composición, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el patógeno bacteriano se pone en contacto con una composición, como se describe en el presente documento, durante aproximadamente 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, o aproximadamente 120 horas. En algunas realizaciones, se pueden usar tiempos de contacto superiores o inferiores.

55 X. Composiciones

Los agentes (*por ejemplo*, MSM y los antibióticos de beta-lactama) descritos en el presente documento pueden formularse de varias maneras dependiendo del uso previsto. Se divulgan en el presente documento varios tipos de composiciones, incluyendo composiciones para su uso en un sujeto y composiciones para su uso en un escenario industrial. El experto en la materia conocerá cuando usar una composición concreta.

60 Las composiciones para su uso en un sujeto pueden formularse en varias formas dependiendo de la localización y el tipo de enfermedad que se va a tratar o evitar en el sujeto. Dichas composiciones se proporcionan por tanto para uso local en o cerca de una zona afectada y para uso sistémico (en el que el agente se administra de manera que se disemina ampliamente mediante el sistema cardiovascular). Se divulgan también en el presente documento otros tipos de composiciones, por ejemplo, composiciones para su uso en una superficie.

Esta divulgación incluye en su alcance composiciones que incluyen DMSO, SMSO sin MSM, MSM, MSM sin DMSO y/o agentes antimicrobianos, o combinaciones de los mismos que se formulan para su uso en medicina humana o medicina veterinaria.

- 5 Por ejemplo, Las composiciones proporcionadas pueden incluir composiciones que comprenden MSM en los intervalos de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 20 % en peso. En otras realizaciones, la composición contiene entre aproximadamente 0,01 % y 5 % de MSM en peso. Otras realizaciones contienen entre aproximadamente 5 y 10 % de MSM, aproximadamente 10-15 % de MSM, aproximadamente 15-20 % de MSM. Otra composición comprende aproximadamente 5-20 % de MSM, aproximadamente 5-16 % de MSM, aproximadamente 10 5-10 % de MSM, aproximadamente 5-8 % de MSM, aproximadamente 9-16 % de MSM o 10-15 % de MSM. otras realizaciones incluyen aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 % de MSM. Algunas realizaciones incluyen aproximadamente 10-16 % de MSM, aproximadamente 10-14 % de MSM o 10-12 % de MSM. En algunas realizaciones, se pueden usar porcentajes superiores o inferiores. Aunque las composiciones que comprenden MSM se usarán normalmente para tratar sujetos humanos, se pueden usar también para tratar enfermedades similares o idénticas en otros vertebrados, como otros primates, perros, gatos, caballos, y vacas.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen también composiciones que contienen un antibiótico de beta-lactama. Por ejemplo, las composiciones como se describen en el presente documento pueden incluir derivados de penicilina, cefalosporinas, penemos, monobactamas, carbapenemos, inhibidores de la beta-lactamasa y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de derivados de penicilina incluyen, aminopenicilinas (por ejemplo, amoxicilina, ampicilina, y epicilina); carboxipenicilinas (*por ejemplo*, carbenicilina, ticarcilina, y temocilina); ureidopenicilinas (*por ejemplo*, azlocilina, piperacilina y mezlocilina); mecilinamo, sulbenicilina, penicilina benzatínica, penicilina G (bencilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), penicilina O (alilmercaptometilpenicilina), penicilina procainica, oxacilina, meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, pivampicilina, hetacilina, becampicilina, metampicilina, talampicilina, co-amoxiclav (amoxicilina más ácido clavulánico), y piperacilina. Los ejemplos de cefalosporinas incluyen, cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefuroxima, cefamandol, cefotetan, cefoxitina, ceforanida, ceftriaxona, cefotaxima, cefpodoxima proxetil, ceftazidima, cefepima, cefoperazona, ceftizoxima, cefixima y cefpiroma. Los ejemplos de penemos incluyen, faropenemo. Los ejemplos de monobactamas incluyen, aztreonamo y tigemonamo. Los ejemplos de carbapenemos incluyen, biapenem, doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem, y panipenem. Los ejemplos de inhibidores de la beta-lactamasa incluyen, tazobactam sal sódica de 4,4 dióxido del ácido tazobactam ([2S-(2alfa,3beta,5alfa)]-3-metil-7-oxo-3-(1H-1,2,3-triazol-1-ilmetil)-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), sulbactam 4,4-dióxido de sodio del ácido (2S,5R)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico, y ácido clavulánico ido ((2R,5R,Z)-3-(2-hidroxiethylideno)-7-oxo-4-oxa-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxílico), u otro antibiótico de beta-lactama.

Muchos antibióticos tienen una concentración inhibidora mínima (CIM) establecida a la cual son eficaces en reducir o destruir determinadas bacterias. Dichas composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden una cantidad de un antibiótico de beta-lactama igual a aproximadamente 0,001 a 100 CIM de los patógenos bacterianos concretos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 o aproximadamente 90-100 CIM de un antibiótico de beta-lactama. En algunas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 0,001,0,01,0,1,0,5 o 1 CIM de un antibiótico de beta-lactama. Un experto en la materia conocerá la CIM de un antibiótico para un patógeno bacteriano concreto, o el técnico experto conocerá como determinar la CIM de un antibiótico para un patógeno bacteriano concreto. Se divulgan en el presente documento los métodos de determinar la CIM de un antibiótico concreto para un patógeno bacteriano determinado, como se divulga en el presente documento, por ejemplo, el uso del sistema Etest®. es convencional para el técnico experto calcular una CIM de un antibiótico concreto para un patógeno bacteriano determinado.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen también combinaciones de MSM y un antibiótico de beta-lactama. Dichas combinaciones pueden incluir cualquier cantidad de MSM y/o antibiótico de beta-lactama como una composición que incluye solo MSM o un antibiótico de beta-lactama. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento incluyen 10-16 % de MSM y una cantidad de antibiótico de beta-lactama igual a 1 CIM para que un patógeno bacteriano entre en contacto con la composición.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento que contienen MSM son composiciones basadas en agua. Las composiciones proporcionadas en el presente documento que contienen MSM contienen preferentemente aproximadamente 0 % a aproximadamente 5 % de cloruro de sodio en peso. En algunas realizaciones, las composiciones comprende aproximadamente 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,2, 3, 4 o 5 % de cloruro de sodio.

La forma farmacéutica de la composición estará influenciada por el modo de administración seleccionado. Por ejemplo, además de fluidos inyectable, se pueden emplear formulaciones mediante inhalación, tópicas, oftálmicas, peritoneales, y formulaciones orales. Las preparaciones mediante inhalación pueden incluir aerosoles, partículas. En general, el objetivo para el tamaño de partícula para inhalación es aproximadamente 1 µm o menos, a fin de que el agente alcance la región alveolar del pulmón para la absorción.

Las composiciones que incluyen MSM, DMSO, un agente antimicrobiano o un compuesto terapéutico, como se

describe en el presente documento como principio activo, o que incluyen una mezcla de dos o más agentes de los mismos, con o sin agente(s) adicionales como principios activos, pueden formularse con un transportador sólido o líquido adecuado, dependiendo del modo concreto de administración seleccionado. Las formulaciones orales pueden ser líquidas (por ejemplo, jarabes, soluciones, o suspensiones), o sólidas (por ejemplo, polvos, píldoras, comprimidos, o cápsulas). Para las composiciones sólidas, los transportadores sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, o estearato de magnesio. Los métodos reales para preparar dichas formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes, para las personas normalmente expertas en la materia.

Para administración oral, las composiciones pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil metilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o acacia); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres grasos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponantes, aromatizantes, agentes colorantes, y edulcorantes, según sea adecuado.

Para la administración mediante inhalación, Los agentes y composiciones para su uso de acuerdo con la presente divulgación se administran convenientemente en la forma de una preparación de pulverizador en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o cualquier otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. cápsulas y cartuchos para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Para la administración tópica, los compuestos pueden, por ejemplo, mezclarse con un agente de administración líquido para la administración local. Los agentes utilizados terapéuticamente (tales como DMSO, MSM y/o un antibiótico de beta-lactama diferente del inhibidor o compuesto terapéutico que se describe en el presente documento) son fácilmente solubles o suspendibles en agua, y como tal, esto sería útil para la administración debido a que el agua no produce efectos adversos sobre los tejidos biológicos. Esto permite que se administren dosis suficientemente altas local o sistémicamente, sin toxicidad secundaria procedente del vehículo de administración. Los expertos en la materia entenderán las condiciones tamponantes adecuadas para el MSM y el antibiótico de beta-lactama.

Las composiciones que comprenden al menos un agente que se describe en el presente documento como un principio activo se formularán normalmente con un transportador sólido o líquido adecuado, dependiendo del modo concreto de administración seleccionado. Los transportadores y excipientes farmacéuticamente aceptables útiles en esta divulgación son convencionales. Por ejemplo, las formulaciones parenterales comprenden normalmente fluidos inyectables que son vehículos fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, otras soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Los excipientes que pueden estar incluidos son, por ejemplo, proteínas, tales como albúmina de suero humano o preparaciones de plasma. Si se desea, la composición que se va a administrar puede contener también cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tamponantes del pH, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitán. Los métodos reales para preparar dichas formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes, para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, para administración parenteral, el(los) agente(s) terapéutico(s) puede formularse generalmente mezclándolo en un grado deseado de pureza, en una forma farmacéutica inyectable unitaria (solución, suspensión o emulsión), con un transportador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, uno que no sea tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y sea compatible con otros ingredientes de la formulación. Un transportador farmacéuticamente aceptable es una carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo.

En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto el(los) agente(s) cada uno de forma uniforme e íntima con transportadores líquidos o transportadores sólidos finalmente divididos o ambos. Después, en caso necesario, el producto se conforma en la formulación deseada. Opcionalmente, el transportador es un transportador parenteral, y, en algunas realizaciones, es una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de dichos vehículos transportadores incluyen agua, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. Los

vehículos no acuosos tales como los aceites fijados y oleato de etilo son también útiles en el presente documento, así como los liposomas.

Las composiciones que comprenden al menos un agente, en algunas realizaciones, se formularán en una forma farmacéutica unitaria, adecuada para la administración individual de dosificaciones precisas. La cantidad de compuesto(s) activo(s) administrada dependerá del sujeto que se está tratando, la gravedad de la dolencia, y la manera de administración y es mejor dejarlo al criterio del médico que prescribe el tratamiento. Dentro de estos límites, la formulación que se va a administrar contendrá una cantidad del(de los) componente(s) activo(s) en cantidades eficaces para conseguir el efecto deseado en el sujeto que se está tratando.

- 10 Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera adecuada para proporcionar la liberación controlada del(de los) agente(s) terapéutico(s) (*por ejemplo*, DMSO, MSM, antibiótico de beta-lactama y así sucesivamente). Por ejemplo, las composiciones pueden estar en la forma de partículas que comprenden un polímero biodegradable y/o un polisacárido gelatinizante y/o un polímero bioadhesivo, un polímero anfífilico, un agente modificador de las propiedades de la interfase de las partículas y una sustancia farmacológicamente activa.
- 15 Estas composiciones presentan determinadas características de biocompatibilidad que permiten una liberación controlada de la sustancia activa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.700.486.

- Se pueden usar polímeros para la liberación controlada. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la administración controlada del fármaco (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537, 1993). Por ejemplo, el copolímero en bloque, polaxámero 407 existe como un líquido móvil más viscoso a temperaturas bajas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Ha mostrado ser un vehículo eficaz para la formulación y administración sostenida de la interleuquina-2 y la ureasa recombinantes (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425, 1992; Pec, J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58, 1990). Como alternativa, se ha utilizado hidroxiapatita como un microtransportador para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215, 1994).
- 25 En otro aspecto más, se utilizan liposomas para la liberación controlada así como el direccionamiento farmacológico de los compuestos capsulados lipídicos (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de las proteínas terapéuticas (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.055.303; patente de Estados Unidos n.º 5.188.837; patente de Estados Unidos n.º 4.235.871; patente de Estados Unidos n.º 4.501.728; patente de Estados Unidos n.º 4.837.028; patente de Estados Unidos n.º 4.957.735; y la patente de Estados Unidos n.º 5.019.369; patente de Estados Unidos n.º 5.055.303; patente de Estados Unidos n.º 5.514.670; patente de Estados Unidos n.º 5.413.797; patente de Estados Unidos n.º 5.268.164; patente de Estados Unidos n.º 5.004.697; patente de Estados Unidos n.º 4.902.505; patente de Estados Unidos n.º 5.506.206; patente de Estados Unidos n.º 5.271.961; patente de Estados Unidos n.º 5.254.342; y la patente de Estados Unidos n.º 5.534.496).

- Se pueden formular composiciones para su uso en escenarios industriales en varias formas dependiendo de la localización y el tipo de superficie que se va a tratar. Dichas composiciones pueden formularse de acuerdo con cualquier medio con el que pueda formularse una composición farmacéutica, pero adicionalmente, pueden formularse en medios adicionales que normalmente no serían aceptables para la administración a un sujeto. Las composiciones para su uso en un escenario industrial están basadas en agua y contienen 0-5 % de cloruro sódico. En algunas realizaciones, dichas composiciones se formulan para aplicarse a una superficie mediante un paño. En algunas realizaciones dichas composiciones se formulan para pulverizarse sobre una superficie. Un experto en la materia entenderá como preparar dichas formulaciones.

45 X. Otras realizaciones

- Como se describe en el presente documento, se proporcionan formulaciones que comprenden DMSO y/o MSM. A pesar de la prevalencia creciente de microbios patógenos resistentes a fármacos, algunas de las formulaciones divulgadas en el presente documento son inesperadamente eficaces en el tratamiento de bacterias resistentes a fármacos u otros microbios. Otros microbios patógenos resistentes a fármacos se tratan también mediante DMSO solo, MSM solo, o una combinación de DMSO y MSM, junto con un agente terapéutico.

- La combinación de DMSO y MSM puede permitir utilizar una concentración más baja de DMSO y/o MSM. Como alternativa, el uso de DMSO y/o MSM reduce la concentración eficaz mínima de los diferentes constituyentes de la formulación, reduciendo también por tanto los efectos secundarios de aquellos constituyentes. Por ejemplo, en una realización, la adición de DMSO, MSM o DMSO y MSM permitirá una dosificación reducida de antibióticos para conseguir efectos terapéuticos comparables o potenciados.

- Las formulaciones que comprenden DMSO y/o MSM pueden sensibilizar los patógenos resistentes a fármacos a los fármacos o invertir parcial o completamente la naturaleza resistente al fármaco de las cepas bacterianas.

- En algunas realizaciones, las formulaciones que comprenden DMSO y/o MSM y al menos un agente terapéutico dan como resultado disminuciones de concentración de DMSO, MSM y/o el agente terapéutico necesario para tratar eficazmente uno o más tipos de infección. Una formulación que comprende DMSO, MSM, o una combinación de los dos puede sensibilizar bacterias (tanto si son farmacorresistentes como si no) a antibióticos. Por tanto, dicha formulación: (i) reduce la dosis de antibiótico necesaria; (ii) reduce el tiempo de tratamiento; (iii) reduce el número de

antibióticos diferentes necesario, y/o (iv) hace un antibiótico efectivo. Por consiguiente, los efectos secundarios indeseados asociados con antibióticos pueden reducirse en algunas realizaciones, incluyendo daño hepático, daño renal, defectos oculares, hiperuricemia, trombocitopenia, leucopenia, y neutropenia. Una formulación de DMSO y/o MSM puede sensibilizar los patógenos resistentes a fármacos a isoniazida, rifampicina, pirazinamida, y/o etambutol.
 5 Como alternativa, DMSO y/o MSM puede potenciar los efectos de isoniazida, rifampicina, pirazinamida, y/o etambutol sobre la tuberculosis no resistente a fármaco.

Muchas infecciones conducen a la inflamación local (o incluso a la inflamación de un gran área de tejido alrededor del sitio de infección). DMSO y/o MSM puede trabajar sinérgicamente con agentes terapéuticos para reducir la inflamación a un grado mayor que DMSO, MSM o el agente solo.
 10

En algunos ejemplos divulgados en el presente documento, DMSO y MSM en una única formulación con un agente terapéutico actúan sinérgicamente para reducir la cantidad de DMSO necesaria para conseguir cantidades eficaces de administración de un agente terapéutico a un sitio diana de infección. MSM potencia el efecto penetrante de DMSO, permitiendo a un agente terapéutico alcanzar un área diana de la infección a una concentración aumentada (o un marco de tiempo reducido). Por tanto, la sinergia entre MSM y DMSO reduce los efectos secundarios asociados con la administración de DMSO, que incluyen una administración posterior de olor desagradable, náuseas, diarrea, e irritación de la piel/garganta, entre otros.
 15

Como alternativa, DMSO y MSM en una única formulación con un agente terapéutico actúan sinérgicamente para reducir la cantidad de agente terapéutico necesaria para tratar eficazmente una infección. Por ejemplo, muchos antibióticos tienen una concentración inhibitoria mínima (CIM) establecida a la cual son eficaces en reducir o destruir determinadas bacterias. una formulación que comprende DMSO y MSM y una concentración sub-CIM de un antibiótico es igualmente o más eficaz en la reducción o en la destrucción de determinadas bacterias resistentes en comparación con el antibiótico solo a niveles CIM. Como alternativa, una formulación que comprende DMSO, MSM y un antibiótico es más eficaz en la reducción o eliminación de bacterias procedentes de un sitio de infección en comparación con el antibiótico solo. Algunas formulaciones divulgadas en el presente documento aumentan el tratamiento de múltiples patógenos bacterianos resistentes a fármacos.
 20
 25

Se divulga también en el presente documento una formulación que comprende DMSO y etambutol que sensibiliza bacterias a fármacos diferentes de etambutol. Las formulaciones que comprenden DMSO potencian la sensibilidad o la susceptibilidad a los fármacos tal como las concentraciones sub-CIM de etambutol, isoniazida, rifampicina, y estreptomycinina en aproximadamente 2 veces a aproximadamente 100 veces. A diferencia de los informes anteriores, concentraciones de DMSO mayores del 50 % pueden ser muy particularmente ventajosas (Jagannath et al. J. Antimicrobial Chemotherapy 35, 381-390, 1995).
 30
 35

En algunos aspectos de la divulgación, DMSO y/o MSM permiten a los antibióticos (u otros agentes terapéuticos) penetrar el tejido pulmonar infectado con un patógeno bacteriano, incluyendo un patógeno bacteriano resistente a fármaco. En un aspecto de la divulgación, DMSO y/o MSM: (i) permite a los antibióticos alcanzar niveles más profundos de tejido infectado; (ii) permite el contacto directo del tejido infectado; (iii) alarga el tiempo de exposición del antibiótico del tejido infectado; y/o (iiv) disminuye el tiempo para conseguir un efecto antibiótico deseado. En un aspecto de la divulgación, DMSO y/o MSM consigue uno o más de estos efectos deseados mediante el uso de un inhalador, en el que el inhalador comprende adicionalmente uno o más antibióticos u otros agentes terapéuticos.
 40

En algunos aspectos de las divulgaciones, el uso combinado de MSM reduce o elimina el olor normalmente asociado con DMSO. Esto es sorprendentemente beneficioso debido a que los especialistas a cargo del tratamiento han evitado usar DMSO en altas concentraciones (o en cualquier cantidad) debido a su olor desagradable.
 45

En algunos aspectos de la divulgación, las formulaciones de DMSO y/o MSM comprenden agentes antiparasitarios que son importantes en el tratamiento de infecciones producidas por parásitos, tales como nematodos, cestodos, trematodos, protozoos, o amebas.
 50

En algunos aspectos de la divulgación, las formulaciones de DMSO y/o MSM comprenden agentes antifúngicos que son eficaces en el tratamiento de infecciones fúngicas, tales como las producidas por tiña, candidiasis, y Cryptococcus (por ejemplo, meningitis criptocócica).
 55

En algunos aspectos de la divulgación, las formulaciones de DMSO y/o MSM comprenden agentes antivíricos que son eficaces en el tratamiento de infecciones víricas. En algunos aspectos de la divulgación, las clases específicas de agentes antivíricos se utilizan para tratar infecciones producidas por un tipo concreto de virus. En algunos aspectos de la divulgación, se utilizan agentes que se dirigen al VIH, los virus del herpes, los virus de la hepatitis B o C, y los virus de la gripe.
 60

En algunos aspectos de la divulgación, las formulaciones de DMSO y/o MSM comprenden antibióticos que son eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas inhibiendo, por ejemplo, el crecimiento bacteriano, el metabolismo, la proliferación, la actividad y/o la función. En algunos aspectos de la divulgación, se usan antibióticos bacteriostáticos, mientras que en otros se utilizan antibióticos bactericidas. Los antibióticos bacteriostáticos y
 65

bactericidas pueden incorporarse en una única formulación que comprende DMSO y/o MSM. Pueden incorporarse antibióticos de una o más clases en una formulación que comprende DMSO y/o MSM. La formulación puede incluir uno o más de un: aminoglicósido, ansamicina, carbacefenos, carbapenemos, cefalosporinas (1ª, 2ª, 3ª, 4ª, o 5ª generación), glucopéptidos, macrólidos, monobactamas, penicilina, polipéptido, quinolona, sulfonamida, tetraciclina.

5 En algunos aspectos de la divulgación, las enfermedades específicas se dirigen incorporando antibióticos específicos en una formulación que comprende DMSO y/o MSM. Por ejemplo, macrólidos, tales como azitromicina o eritromicina se incorporan en las formulaciones utilizadas para tratar las infecciones respiratorias o por micoplasmas. Asimismo, penicilinas, tales como amoxicilina u oxacilina se incorporan en las formulaciones utilizadas para tratar un
10 amplio intervalo de infecciones estreptocócicas.

15 En otros aspectos más de la divulgación, los microorganismos que producen enfermedades específicas -son el objetivo de antibióticos específicos incorporados en una formulación que comprende DMSO y/o MSM. Por ejemplo, aminoglicósidos, tales como neomicina se incorporan en las formulaciones utilizadas para tratar infecciones por *Escherichia coli*. Se pueden usar antibióticos normalmente usados para combatir infecciones micobacterianas. Se pueden incorporar antibióticos que incluyen, pero sin limitación, isoniazida, rifampicina, pirazinamida, y etambutol en formulaciones que comprende uno o más de DMSO y MSM y se usan para tratar patógenos bacterianos, incluyendo bacterianos resistentes a fármacos.

20 Se divulgan también formulaciones que comprenden DMSO, MSM y uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: rifampicina, isoniazida, and etambutol. Se divulgan también formulaciones que comprenden DMSO y al menos uno de rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol. Se divulgan también formulaciones que comprenden MSM y al menos uno de rifampicina, isoniazida, pirazinamida and etambutol. Se divulgan además formulaciones que comprenden DMSO y/o MSM en combinación rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol
25 para tratar patógenos bacterianos, incluyendo bacterianos resistentes a fármacos.

Se puede proporcionar rifampicina en una dosis diaria que varía desde aproximadamente 400 mg a aproximadamente 800 mg por día, o en un intervalo de dosis diaria total que varía desde aproximadamente 500 mg a aproximadamente 700 mg por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 550 a
30 aproximadamente 650 mg por día, incluyendo 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, y 640 mg por día.

Se puede proporcionar isoniazida en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 200 mg a aproximadamente 400 mg por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 250 mg a
35 aproximadamente 350 mg por día, incluyendo 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, y 340 mg por día.

Se puede proporcionar pirazinamida en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0 g por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,0 g por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 2,0 a 2,5 g por día,
40 incluyendo 2,1, 2,2, 2,3, y 2,4 g.

Se proporciona etambutol en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2,5 g por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 1,0 a 2,0 g por día, o en una dosis diaria total que varía desde aproximadamente 1,0 a aproximadamente 1,5 g por día, incluyendo 1,1, 1,2, 1,3, y 1,4 g.
45

En algunos aspectos de la divulgación, DMSO y/o MSM se usa para pretratar a un paciente que padece una enfermedad infecciosa. La dosis de DMSO y/o MSM utilizada para pretratar pacientes puede variar desde aproximadamente 10 % a 50 % en peso a volumen, o desde aproximadamente 20 % a aproximadamente 40 %, desde aproximadamente 25 % a 35 %, incluyendo 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, y 34 %. En algunos aspectos de la divulgación, se usa aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % de DMSO y/o MSM. El pretratamiento con
50 DMSO y/o MSM puede potenciar la capacidad de un antibiótico de inhibir la actividad bacteriana y/o sensibilizar una cepa resistente a fármaco a un fármaco que era ineficaz anteriormente.

En algunos aspectos de la divulgación, se prepara una formulación en la que disuelven agentes antimicrobianos en DMSO y/o MSM antes de la administración. Esto es particularmente ventajoso debido a que el agente antimicrobiano y DMSO (y opcionalmente MSM) pueden administrarse a un sujeto mediante inhalación. Los inhaladores proporcionan acceso directo del DMSO y/o MSM al pulmón infectado.
55

El uso de MSM reduce la cantidad de DMSO necesaria para conseguir un efecto comparable y/o potencia la eficacia de DMSO en al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces. En otras realizaciones, el uso de MSM reduce la cantidad de un agente terapéutico necesaria para conseguir un efecto comparable y/o potencia la eficacia del agente terapéutico en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces. También se divulga en el presente documento, que el uso de DMSO reduce la cantidad de un agente terapéutico necesaria para conseguir un efecto comparable y/o potencia la eficacia del agente terapéutico en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces. En otras realizaciones, el uso de DMSO y MSM reduce la cantidad de un agente terapéutico necesaria para
60
65

conseguir un efecto comparable y/o potencia la eficacia del agente terapéutico en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces en comparación con DMSO o MSM solo y/o el agente terapéutico solo.

5 También se divulga en el presente documento, que una formulación de pretratamiento que comprende DMSO, solo o combinado con MSM, se administra a un sujeto por vía intravenosa, intramuscular, tópica u oralmente para potenciar los efectos de una terapia inhaladora que comprende DMSO y/o MSM con agentes terapéuticos, tal como antibióticos. El pretratamiento con DMSO, solo o combinado con MSM, potencia los efectos terapéuticos del inhalador en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 10 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, o 100 veces.

10 También se divulga en el presente documento, que sujetos que tienen una enfermedad infecciosa resistente a fármaco se tratan con una formulación que comprende, que consiste o consiste esencialmente de DMSO, solo o combinado con MSM y uno o más agentes terapéuticos, tal como antibióticos. La formulación incluye adicionalmente otros agentes terapéuticos, transportadores o excipientes. La formulación incluye adicionalmente arginina, vitamina D, antioxidantes, macrólidos, linezolid, tioacetazona, tioridazina, o combinaciones de los mismos.

15 DMSO perturba fácilmente la integridad de muchos materiales (particularmente los plásticos y polímeros utilizados en la fabricación de equipo médico desechable). Por consiguiente, se divulgan en el presente documento dispositivos para facilitar el almacenamiento y la administración de DMSO. DMSO puede almacenarse en botellas de vidrio y administrarse a través de una tubería no reactiva. Se pueden diseñar especialmente dispositivos inhaladores para ser resistentes a DMSO. Las partes de los dispositivos inhaladores pueden ser desechables o sustituibles. Se pueden fabricar formulaciones que comprenden DMSO, almacenarse y/o administrarse utilizando los materiales y dispositivos divulgados en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º: 12/066.480, que es la entrada de la fase nacional de la solicitud internacional n.º: PCT/US06/35499, presentado el 11 de septiembre de 2006.

20 En algunas realizaciones, la adición de MSM reduce inesperadamente reduce el olor desagradable normalmente experimentado con el uso de DMSO. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las formulaciones de DMSO y MSM no producen olor perceptible después del uso. En algunas realizaciones diferentes que tienen concentraciones de DMSO que se aproximan o exceden el 50 %, la combinación con MSM en la formulación reduce o elimina el olor basado en DMSO. Dicho resultado es inesperado, dado que el uso de DMSO se asocia normalmente con un fuerte olor desagradable.

25 El uso de DMSO y/o MSM con agentes terapéuticos (tal como antibióticos) permite la fabricación y/o la administración de gotículas o tamaños de partículas pequeños, reduciendo por tanto la irritación de la mucosa de la boca y la garganta, a medida que las gotículas o partículas viajan más profundamente en los pulmones del paciente. La profundidad del viaje de las gotículas o partículas aumenta la concentración de los antibióticos disueltos en los pulmones del paciente.

30 Las formulaciones de DMSO y/o MSM pueden combinarse con agentes terapéuticos (tales como antibióticos) y proporcionarse como un aerosol para administrar fármacos localmente activos al sistema respiratorio para tratar enfermedades infecciosas u otras enfermedades respiratorias. Las vías aéreas inferiores pueden ponerse en contacto (o ponerse en contacto exclusivamente) con la formulación. La formulación puede utilizarse para tratar sistémicamente las enfermedades. Para fármacos sistémicamente activos, las partículas de aerosol se dimensionan para alcanzar la superficie alveolar en áreas periféricas del pulmón.

35 El uso de formulaciones de DMSO y/o MSM que comprenden un agente terapéutico (tal como un antibiótico) es particularmente ventajoso debido a que este proporciona un rápido inicio de la acción. La administración mediante inhalación proporciona un área de absorción grande del pulmón. Para fármacos que actúan localmente, el inicio de la acción puede ser inmediato. Las formulaciones inhaladas sistémicamente activas, de acuerdo con algunas realizaciones, alcanzan rápidamente el torrente sanguíneo. La terapia mediante inhalación puede proporcionar un efecto terapéutico en aproximadamente 1-90 minutos. DMSO y/o MSM pueden potenciar la biodisponibilidad del agente terapéutico. DMSO y/o MSM pueden reducir la degradación del agente terapéutico. Las formulaciones en aerosol divulgadas en el presente documento pueden reducir los efectos secundarios gastrointestinales o la irritación de la piel que puede producirse con el tratamiento oral o tópico.

40 El uso de formulaciones de DMSO y/o MSM que comprenden un agente terapéutico (tal como un antibiótico) es particularmente ventajoso debido a que este proporciona un rápido inicio de la acción. La administración mediante inhalación proporciona un área de absorción grande del pulmón. Para fármacos que actúan localmente, el inicio de la acción puede ser inmediato. Las formulaciones inhaladas sistémicamente activas, de acuerdo con algunas realizaciones, alcanzan rápidamente el torrente sanguíneo. La terapia mediante inhalación puede proporcionar un efecto terapéutico en aproximadamente 1-90 minutos. DMSO y/o MSM pueden potenciar la biodisponibilidad del agente terapéutico. DMSO y/o MSM pueden reducir la degradación del agente terapéutico. Las formulaciones en aerosol divulgadas en el presente documento pueden reducir los efectos secundarios gastrointestinales o la irritación de la piel que puede producirse con el tratamiento oral o tópico.

45 Las partículas inhalantes pueden dimensionarse para minimizar el depósito de aquellas partículas mediante el impacto inercial en las vías aéreas superiores sin alcanzar el sitio de acción. Las partículas pueden dimensionarse para minimizar el depósito en la boca y la garganta, minimizando por tanto la hinchazón y los efectos secundarios locales o sistémicos indeseados. Las partículas pueden ser más pequeñas de 2, 5 o 10 μm . En una realización, las partículas tienen aproximadamente 3-5 μm y se transportan en las bifurcaciones y las vías aéreas más pequeñas de los bronquios y los bronquiolos. En otra realización, las partículas tienen menos de 3 μm y siguen el flujo de aire en los alvéolos. El uso de DMSO y/o MSM permite optimizar el tamaño de partículas del agente terapéutico. Además, el uso de DMSO y/o MSM puede sensibilizar los patógenos bacterianos resistentes a fármacos a los antibióticos.

50 DMSO y/o MSM puede formar una solución, mezcla, emulsión, suspensión, u otra combinación adecuada con el agente terapéutico. Se pueden usar la homogeneización, sonicación, procesamiento de fluidos de alta cizalladura u

otros métodos mecánicos para combinar el agente terapéutico con el DMSO y/o MSM. El agente terapéutico puede disolverse fácilmente en DMSO. A diferencia de otros disolventes fuertes, DMSO no es perjudicial para el tejido pulmonar. Por tanto, DMSO es especialmente ventajoso debido a que puede disolver el agente terapéutico y administrar dicho agente sin dañar el tejido pulmonar. DMSO puede disolver al menos un 50 %, 75 %, 90 %, 95 % o 99 % del agente terapéutico, y puede evitar la precipitación indeseada del agente terapéutico.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar determinadas características y/o realizaciones concretas.

Ejemplos

Ejemplo 1. MSM en solitario no afecta la supervivencia del MRSA.

Este ejemplo describe los experimentos *in vitro* que prueban la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa resistente a meticilina y oxacilina) en presencia de MSM solo. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con 5-16 % de MSM durante 24 y 48 horas. Se añadió un 3,5 % más de MSM cada día. Los resultados muestran que MSM no afecta la supervivencia de esta cepa bacteriana.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51> como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones iniciales de MSM ensayadas fueron 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, y 16 % de MSM. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10^{-7} para discernir las ufc/ml.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, lote 108-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42), oxacilina de sodio calidad USP lote J y meticilina de sodio (AS; n.º de cat. 1410002, Lote KOH338).

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5 g), 8 % (0,8 g), 10 % (1,0 g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3 g), 14 % (1,4 g), 15 % (1,5 g), y 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml.

Se inocularon todos los tubos con una dilución de MRSA que proporciona un nivel final de unidades formadoras de colonias de $2,0 \times 10^5$ /ml (Log = 5,23). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 24 y 48 horas. Cada condición se sembró en placas diluyendo 1 ml de material de crecimiento en 9 ml de caldo de dilución MLB. Esta mezcla se diluyó en serie hasta 10^{-7} , y se colocó 1 ml en una placa petri estéril para cada punto de dilución. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución, se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 horas. Se contaron las colonias bacterianas de cada placa y los recuentos de colonias se transformaron al formato logarítmico. Se diluyó un control positivo y negativo.

Resultados:

Los resultados mostraron que ninguna de las concentraciones de MSM ensayadas tuvo ningún efecto sobre la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* para cualquier punto temporal de 24 o 48 horas.

Ejemplo 2. MSM sensibiliza MRSA a oxacilina.

Este ejemplo describe los experimentos *in vitro* que estudian la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa de MRSA resistente a oxacilina y meticilina) en presencia de MSM, DMSO y oxacilina. Los resultados se muestran en la Figura 1. Se observó una tasa de supervivencia más baja en presencia de 9-16 % de MSM con 6 µg/ml de oxacilina que en presencia de 1 % de DMSO y 6 µg/ml de oxacilina o en presencia de 1 % de DMSO, 9-16 % de MSM y 6 µg/ml de oxacilina. Se observó la tasa de supervivencia más baja en las condiciones con 12 y 13 % de MSM con 6 µg/ml de antibiótico. Estos resultados muestran que concentraciones específicas de MSM en solitario pueden aumentar la sensibilidad de una cepa MRSA al antibiótico más eficazmente que DMSO o una combinación de MSM y DMSO.

Métodos

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51> como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones de MSM ensayadas fueron del 5-16 % en incrementos de uno. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10^{-7} para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de oxacilina utilizada fue de 6 µg/ml, que es la CIM para la oxacilina. Esta concentración es el patrón industrial para determinar la resistencia del MRSA en aplicaciones clínicas.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), DMSO (Jacob Labs, lote número 48074), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, lote 108-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42) y oxacilina de sodio calidad USP lote J.

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5 g), 6 % (0,6 g), 7 % (0,7 g), 8 % (0,8 g), 9 % (0,9 g), 10 % (1,0 g), 11 % (1,1 g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3 g), 14 % (1,4 g), 15 % (1,5 g), y 16 % (1,6 g). Se añadió DMSO estéril a los tubos adecuados. Se añadió oxacilina estéril a los tubos adecuados en 300 microlitros de concentración de 30 mg/10 ml proporcionando al mismo una concentración final de 6 µg/ml. Las condiciones de control fueron caldo de lactosa inoculado con la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* con y sin 6 µg/ml de oxacilina, así como controles negativos sin inocular que no muestran signos de contaminación.

Se inocularon los tubos adecuados a una dilución de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* que proporcione una concentración final de unidades formadoras de colonias de $3,15 \times 10^7$ /ml (Log = 7,49). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 48 horas. Los tubos del 5-16 % se sembraron en placas diluyendo 1 ml de material en 9 ml de caldo de dilución MLB. Se diluyeron en serie hasta 10^{-7} con 1 ml colocado en una placa petri estéril para cada punto de dilución. A continuación se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución y se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 horas. se contaron las placas y se cambiaron los recuentos de colonias al formato logarítmico. Se diluyó un control positivo y negativo.

Resultados:

En la Tabla 1 y la Figura 1 se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 1: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM al 5-16 % y oxacilina durante 48 horas.

% de MSM (si se añade)	(MA) 6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)	(MDA) 6 µg/ml de oxacilina MSM 1 % de DMSO (Log ufc/ml)	(DA) 6 µg/ml de oxacilina sin MSM 1 % de DMSO (Log ufc/ml)
16	5,1	5,5	5,8
15	4,9	5,7	5,7
14	4,8	5,7	5,7
13	4,6	5,8	5,4
12	4,6	5,8	5,8
11	4,8	5,8	5,8
10	5,1	5,8	5,7
9	5,5	5,9	5,9
8	5,9	5,8	5,9
7	6,8	5,9	5,9
6	6,6	6,1	6,3
5	6,7	6,2	6,2

Estos resultados muestran que 9-16 % de MSM aumentó la sensibilidad de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* a oxacilina durante al menos 48 horas. Se observó una reducción log. mínima en las ufc/ml en las condiciones de MA, DA, y MDA para el intervalo de concentraciones del 5-8 % de MSM. "Reducción log en ufc/ml" se refiere a una disminución (reducción) en las ufc/ml de un cultivo bacteriano en comparación con las ufc/ml que se inocularon inicialmente del cultivo bacteriano. Para la concentración de 9 % de MSM, la condición MA mostró una reducción logarítmica de 2,0 en las ufc/ml en comparación con las condiciones DA y MDA, que muestran una reducción log. de 1,6 en ufc/ml. Para la concentración de 10-16 % de MSM, la condición MA mostró una reducción logarítmica máxima de 2,9 en las ufc/ml en comparación con las condiciones DA y MDA, que mostraron una reducción log. en ufc/ml de 1,69 y 2,0, respectivamente. Para la concentración de 5-7 % de MSM, la condición MA mostró un aumento en el crecimiento bacteriano en comparación con las condiciones DA y MDA. DMSO puede tener algún efecto inhibitorio sobre la capacidad de 9-16 % MSM/oxacilina de inhibir el crecimiento de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*.

El control positivo mostró TNTC en la placa de dilución 10^6 . El control negativo no mostró signos de contaminación. En su conjunto, estos resultados indican que MSM puede sensibilizar una cepa de MRSA al tratamiento con el antibiótico.

Ejemplo 3. MSM sensibiliza MRSA a oxacilina en un ciclo simulado de tratamiento.

Este ejemplo describe los experimentos *in vitro* que prueban la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa resistente a meticilina y oxacilina) en presencia de MSM y oxacilina. Los resultados se muestran en la Figura 2. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con MSM al 5-16 % y 6 µg/ml de oxacilina ("MA") durante 24 horas a 25°C. Después de 24 horas, se añadieron otros 6 µg/ml de ml oxacilina a las incubaciones, llevando la cantidad total de oxacilina añadida hasta 12 µg/ml. 6 µg/ml es la CIM para esta cepa de MRSA. Por tanto, las bacterias estuvieron bajo una CIM de oxacilina durante 24 horas y 2x CIM durante las siguientes 24 horas. Este paradigma experimental estimula la aplicación repetida de antibiótico que un sujeto recibiría durante un ciclo de tratamiento. Análogamente a los resultados que se muestran en el Ejemplo 2, se observó la tasa de supervivencia más baja en presencia de MSM al 12 y 13 %. Estos resultados confirman que MSM sensibiliza MRSA al tratamiento con antibiótico y muestran que las concentraciones específicas de MSM en solitario pueden aumentar la sensibilidad de una cepa MRSA al antibiótico en un ciclo simulado de tratamiento.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51>como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones de MSM ensayadas fueron 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, y 16 %. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10⁻⁷ para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de oxacilina utilizada fue de 6 µg/ml, que es la CIM de oxacilina para esta cepa de bacterias. Esta concentración es el patrón industrial para determinar la resistencia del MRSA en aplicaciones clínicas. Se añadieron diariamente 6 µg/ml de oxacilina adicionales.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, lote 108-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42) y oxacilina de sodio, calidad USP grade lote J. Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN:1115210833 y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5 g), 8 % (0,8 g), 10 % (1,0 g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3g), 14 % (1,4g), 15 % (1,5g), 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadió oxacilina estéril a cada condición experimental diariamente a 300 µl de una concentración de 30 mg/10 ml proporcionando en cada caso una concentración final de 6 µg/ml.

Se inocularon todos los tubos a una dilución de MRSA que proporcione una concentración final de unidades formadoras de colonias de 9,14x10⁵/ml (Log = 5,96). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 48 horas y 7 días. Los tubos del 5-16 % de MSM se sembraron en placas diluyendo 1 ml de material en 9 ml de caldo MLB. Se diluyeron en serie hasta 10⁻⁷ con 1 ml colocado en una placa petri estéril para cada punto de dilución. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución y se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 horas. se contaron las placas y se cambiaron los recuentos de colonias al formato logarítmico. Se diluyó un control positivo y negativo.

En la Tabla 2 y la Figura 2 se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 2: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM al 5-16 % y oxacilina a las 48 y 168 horas:

	48 horas	7 días
% MSM	6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)	6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	5,3	1,0
15	4,1	6,9
14	4,0	7,0
13	3,8	7,2
12	3,8	7,1
10	4,6	7,2
8	4,0	7,6
5	7,0	7,9

Estos resultados muestran que MSM aumentó la sensibilidad de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* a oxacilina durante al menos 48 horas. En el punto temporal de las 48 horas, MSM al 12-15 % aumentó la sensibilidad de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* a oxacilina más que cualquier otra concentración de MSM estudiada. En el punto temporal de los siete días, excepto para la concentración más alta de MSM ensayada (16 %),

MSM no aumentó la sensibilidad de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* a oxacilina. El MSM al 16 % con adición de 6 µg/ml cada día no mostró bacterias supervivientes en el día 7. Este resultado muestra que, excepto a la concentración de MSM más alta ensayada (16 %), cualquier sensibilización a oxacilina inducida por MSM inicial de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se redujo tras una exposición prolongada a MSM y antibiótico. Se terminaron los controles después de 48 horas para minimizar el peligro asociado con el crecimiento sin control del organismo MRSA.

Ejemplo 4. MSM sensibiliza MRSA a múltiples antibióticos.

Este ejemplo describe los experimentos *in vitro* que prueban la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa resistente a metilina y oxacilina) en presencia de MSM y oxacilina o MSM y metilina. Los periodos de crecimiento ensayados fueron de 24 horas, 48 horas y 5 días. Se ensayó MSM 5-16 % junto con 6 µg/ml de oxacilina o 6 µg/ml de metilina. Esta es la CIM de oxacilina y metilina para esta cepa de bacterias. Un 3,5 % adicional de MSM y 6 µg/ml de oxacilina o 6 µg/ml de metilina se añadieron cada día. Los resultados se muestran en las Figuras 3A-3C. A las 24 horas, MSM al 5 % y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. A las 48 horas, MSM al 5 % y metilina o MSM al 8 % y oxacilina mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. A los 5 días, MSM al 13-16 % y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. En su conjunto, los resultados indican que MSM aumentó la sensibilidad de esta cepa de MRSA a oxacilina y metilina.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51> como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones iniciales de MSM ensayadas fueron 5, 8, 10, 12, 13, 14, 15, y 16 % de MSM. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10^{-7} para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de oxacilina metilina utilizada fue de 6 µg/ml, que es la CIM para la oxacilina. Esta concentración es el patrón industrial para determinar la resistencia del MRSA en aplicaciones clínicas. Un 3,5 % adicional de MSM y 6 µg/ml de oxacilina o 6 µg/ml de metilina se añadieron diariamente.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, lote 108-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42), oxacilina de sodio calidad USP lote J y metilina de sodio (AS; n.º de cat. 1410002, Lote KOH338).

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5g), 8 % (0,8g), 10 % (1,0g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3g), 14 % (1,4g), 15 % (1,5g), 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadió oxacilina o metilina estéril a cada condición experimental diariamente a 300 µl de una concentración de 30 mg/10 ml proporcionando en cada caso una concentración final de 6 µg/ml. Un 3,5 % adicional de MSM y 6 µg/ml se añadieron cada día.

Se inocularon todos los tubos con una dilución de MRSA que proporciona un nivel final de unidades formadoras de colonias de $2,13 \times 10^6$ /ml (Log = 6,3). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 24 horas, 48 horas y 5 días. Cada condición se sembró en placas diluyendo 1 ml de material de crecimiento en 9 ml de caldo de dilución MLB. Esta mezcla se diluyó en serie hasta 10^{-7} , y se colocó 1 ml en una placa petri estéril para cada punto de dilución. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución, se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 horas. Se contaron las colonias bacterianas de cada placa y los recuentos de colonias se transformaron al formato logarítmico. Se diluyó un control positivo y negativo.

Resultados:

En la Tabla 3 se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 3: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y oxacilina o metilina durante 24, 48 y 120 horas.

24 horas		
% MSM	6 µg/ml de metilina MSM (Log ufc/ml)	6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	5,00	5,25
15	5,00	5,23
14	4,90	5,20

ES 2 674 019 T3

13	4,90	5,00
12	4,60	5,20
10	4,40	5,00
8	4,50	5,0
5	4,30	4,90
48 horas		
% MSM	6 µg/ml de metilina MSM (Log ufc/ml)	6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	4,17	4,17
15	4,00	4,40
14	3,98	4,40
13	3,90	4,20
12	3,70	4,30
10	3,70	4,20
8	3,60	3,60
5	3,60	5,20
120 horas		
% MSM	6 µg/ml de metilina MSM (Log ufc/ml)	6 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	2,80	3,00
15	2,80	3,00
14	2,90	3,00
13	2,80	TNTC
12	4,20	TNTC
10	TNTC	TNTC
8	TNTC	TNTC
5	TNTC	TNTC

Los resultados de este estudio indican que MSM aumentó la sensibilidad de una cepa de MRSA a oxacilina y metilina. A las 24 horas, se observaron menos ufc/ml con MSM y metilina que con MSM y oxacilina, para todas las concentraciones de MSM ensayadas. Como la CIM para metilina y oxacilina es la misma para esta cepa de MRSA (6 µg/ml), este resultado sugiere que MSM aumenta la sensibilidad a la metilina más que la sensibilidad a la oxacilina. A las 24 horas, MSM al 5 % y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana.

Se observaron resultados similares a las 48 horas. En este punto temporal, la reducción logarítmica promedio en las ufc/ml observada para la metilina fue de 2,7 (5 % inicial de MSM) a 2,1 (16 % inicial de MSM) y para oxacilina 2,7 (8 % inicial de MSM) a 2,1 (16 % inicial de MSM). A las 48 horas, MSM al 5 % y metilina o MSM al 8 % y oxacilina mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana. A las 48 horas, la supervivencia bacteriana fue la misma que para el 8 % inicial de MSM y en cualquiera de las condiciones de oxacilina o metilina.

A las 120 horas, las condiciones iniciales de MSM 14-16 % y oxacilina y las condiciones iniciales de MSM 13-16 % y metilina mostraron una reducción logarítmica en las ufc/ml de -3,3-3,5 respectivamente. El 5-10 % inicial de MSM y metilina y el 13 % inicial de MSM y oxacilina mostraron recuentos de colonias que fueron demasiado numerosos para el recuento (TNTC). El 13-16 % de MSM y antibiótico mostraron el nivel más bajo de supervivencia bacteriana.

En su conjunto, estos resultados muestran que MSM puede aumentar la sensibilidad de una cepa de MRSA de bacterias a metilina y oxacilina. Estos resultados sugieren también que una combinación de metilina y MSM es

más eficaz en la sensibilización de la cepa de MRSA que una combinación de MSM y oxacilina. Una explicación meramente hipotética de estos resultados es que la molécula de MSM de alguna manera está superando la resistencia a los antibióticos, posiblemente por penetración, o transportando el antibiótico al interior de la célula. Otra conclusión meramente hipotética es que la metilina puede unirse al MSM y transportarse al interior de la célula de MRSA directamente debido a un número mayor de sitios de unión a MSM en comparación a oxacilina. Los inventores observaron que, para los puntos temporales de 24 y 48 horas, concentraciones más bajas de MSM con antibiótico tuvieron un efecto mayor sobre la supervivencia bacteriana que en el punto temporal del día 5. Una explicación meramente hipotética y no limitante de esto es que la concentración de MSM en el tubo de ensayo disminuye en el tiempo, debido posiblemente a la acción de las bacterias.

Ejemplo 5. MSM sensibiliza MRSA a múltiples antibióticos.

Este ejemplo describe los experimentos preliminares *in vitro* que estudian la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* (una cepa de MRSA resistente a oxacilina y metilina), en presencia de MSM y oxacilina o MSM y metilina. Se ensayaron tres concentraciones diferentes de estos dos antibióticos: 12, 30 y 60 µg/ml, correspondientes a 2x, 5x y 10x CIM para esta cepa de MRSA para cada antibiótico. La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se incubó con MSM al 5-16 % y la cantidad indicada de antibiótico durante 24, 48 o 96 horas a 25 °C.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51>como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones de MSM iniciales ensayadas fueron del 5-16 % en incrementos de uno. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10⁻⁷ para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de oxacilina y metilina utilizada fue de 12, 30 o 60 µg/ml, que corresponde a 2x, 5x y 10x CIM para la oxacilina. Esta concentración es el patrón industrial para determinar la resistencia del MRSA en aplicaciones clínicas.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, Lote I08-09, agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42), oxacilina de sodio calidad USP lote J y metilina de sodio (AS; n.º de cat. 1410002, Lote KOH338).

La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se extendió en vetas para los aislamientos y se repicaron 25 clones que se diluyeron hasta un patrón de McFarland de uno. Posteriormente, el valor estimado se tomó para inocular los tubos que contenían medio de crecimiento y 12, 30 o 60 µg/ml de metilina u oxacilina u alrededor de 10⁻⁷ ufc/tubo. Para el resto del experimento, se seleccionó un clon que demostraba crecimiento turbio a las 24 horas para todas las concentraciones de antibiótico.

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5g), 6 % (0,6g), 7 % (0,7g), 8 % (0,8g), 9 % (0,9g), 10 % (1,0g), 11 % (1,1g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3g), 14 % (1,4g), 15 % (1,5 g), y 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadieron oxacilina o metilina estériles a cada condición experimental hasta una concentración final de 12, 30 o 60 µg/ml de antibiótico. Se ensayaron condiciones de control de MSM 5-16 % y sin antibióticos para determinar la supervivencia del MRSA. Se ensayaron condiciones de control con 12, 30 o 60 µg/ml de antibiótico, pero no con MSM para el crecimiento de MRSA.

A continuación se inocularon todos los tubos con una dilución del clon seleccionado de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* que proporcione un nivel final de unidades formadoras de colonias de 9,4x10⁷/ml (Log = 7,97). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Diariamente se añadió a los tubos un 3,5 % de MSM adicional así como la cantidad inicial de antibiótico. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 24 horas. Cada condición se sembró en placas diluyendo 1 ml de material de crecimiento en 9 ml de caldo de dilución MLB. Esta mezcla se diluyó en serie hasta 10⁻⁷, y se colocó 1 ml en una placa petri estéril para cada punto de dilución. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución, se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 horas. Se contaron la colonias bacterianas de cada placa y los recuentos de colonias se transformaron al formato logarítmico. Se diluyó un control positivo y negativo.

Resultados:

En la Tabla 4 y la Figura 3A-C se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 4: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30 o 60 µg/ml oxacilina o metilina durante 24 horas.

% MSM	12 µg/ml de metilina MSM (Log ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
-------	---------------------------------------	--

16	4,56	4,77
15	4,7	4,93
14	4,7	4,88
13	4,77	4,9
12	4,89	4,8
11	4,87	4,8
10	4,8	4,96
9	4,99	5,16
8	5,0	5,18
7	5,46	5,18
6	5,2	5,26
5	5,43	5,28
% MSM		
	30 µg/ml de metilicina MSM (Log ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	4,47	4,59
15	4,54	4,74
14	4,6	4,82
13	4,7	4,9
12	4,7	4,87
11	4,8	4,94
10	4,8	4,99
9	5,07	5,02
8	5,09	5,2
7	5,13	5,12
6	5,18	5,15
5	5,3	5,17
% MSM		
	60 µg/ml de metilicina MSM (Log ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (Log ufc/ml)
16	4,8	4,6
15	4,65	4,75
14	4,77	4,8
13	4,77	4,83
12	4,68	4,77
11	4,66	4,8
10	4,66	4,87
9	4,9	4,95
8	5,1	5,0
7	5,0	5,14
6	5,2	5,12
5	5,2	5,2

La reducción logarítmica observada en ufc/ml fue similar para todas las concentraciones de antibióticos. La reducción logarítmica promedio en ufc/ml para el 5 % de MSM con antibiótico fue de 2,2, mientras que la reducción logarítmica promedio en ufc/ml para el MSM al 16 % con antibiótico fue de 3,3 (excluyendo la metilicina 60 µg/ml como valor atípico). La eficacia general de la metilicina fue ligeramente mejor que la de oxacilina. En su conjunto, se observó una mayor sensibilidad al antibiótico cuanto mayores fueron las concentraciones de MSM. La condición de control de antibiótico sin MSM presentó un mayor número de colonias que las que se inocularon inicialmente. Las condiciones de control con antibiótico, pero sin MSM, mostraron TNTC, demostrando que no hubo inhibición con el antibiótico en solitario.

5

10

Los resultados de los puntos temporales de 48 y 96 horas mostraron que todos los cultivos de estos puntos temporales eran demasiado numerosos para el recuento. Esto se puede explicar por el uso de un clon que tenía un gran crecimiento para las tres concentraciones de antibióticos, lo que selecciona una cepa de MRSA más resistente de la obtenida de forma natural. Añadido a esto, habría un mayor valor de inoculación de $9,4 \times 10^7$ /ml ($\log=7,97$); normalmente, la inoculación debería estar comprendida entre 10^4 y 10^6 ufc/ml. Una explicación meramente hipotética no limitante para esto es que para estas condiciones experimentales, cualquier efecto de MSM y antibiótico sobre la supervivencia bacteriana está enmascarado por otros factores. Como alternativa, el antibiótico también podría haberse degradado ya que los inventores lo utilizaron en el último experimento durante un largo periodo de tiempo.

15

20

Estos resultados muestran que MSM aumentó la sensibilidad de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* a

oxacilina y metilina para al menos un punto temporal de 24 horas; sin embargo, los resultados no son concluyentes en otros puntos temporales. En el punto temporal de las 24 horas, se observó mayor sensibilidad para todas las concentraciones de antibiótico ensayadas, y para todas las concentraciones de MSM ensayadas. Mayores concentraciones de MSM aumentaron la sensibilidad al antibiótico en una mayor extensión que a concentraciones más bajas de MSM. Una diferencia entre este experimento y los experimentos previos es que se seleccionó un clon que cumplía los requerimientos de crecimiento para las tres concentraciones de antibiótico.

Ejemplo 6. Efecto de MSM y 12, 30, o 60 µg/ml de oxacilina sobre MRSA.

Este ejemplo describe un experimento *in vitro* que estudia la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en presencia de MSM 5-16 % y una concentración inicial de 12, 30 o 60 µg/ml de oxacilina. Esto corresponde a 2x, 5x y 10x CIM para la oxacilina. Se añadió más cantidad de antibiótico cada 24 horas. Los periodos de crecimiento ensayados fueron 24 (véase la Fig. 4), 48, 72, 96 y 120 horas. Los resultados muestran que MSM sensibilizó una cepa de MRSA a oxacilina. En los puntos iniciales más tempranos (24 y 48 horas), los resultados muestran una menor supervivencia bacteriana, indicando una mayor sensibilidad a la oxacilina, para todas las concentraciones de antibiótico ensayadas, y para todas las concentraciones de MSM ensayadas. Sin embargo, en los últimos puntos temporales (96 y 120 horas), se observó solo una menor supervivencia bacteriana a concentraciones de MSM mayores (10-16 % de MSM), indicando que la sensibilidad a oxacilina inducida por MSM es dependiente del tiempo. Los resultados también muestran que, en los últimos puntos temporales, una concentración alta de oxacilina estuvo correlacionada con una supervivencia bacteriana disminuida.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51> como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones de MSM iniciales ensayadas fueron del 5-16 % en incrementos de uno. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10^{-7} para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de oxacilina utilizada fue de 12, 30 o 60 µg/ml, que corresponde a 2x, 5x y 10x CIM para la oxacilina. Se añadió más antibiótico a la concentración inicial cada 24 horas.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, lote 108-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42) y oxacilina de sodio calidad USP lote J.

La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se extendió en forma de vetas desde los aislamientos. Se seleccionó una colonia aislada, se extendió en vetas de nuevo y se incubó. Se seleccionó el aislado y a continuación se diluyó hasta un patrón de McFarland de uno. Posteriormente, el valor estimado se tomó para inocular los tubos que contenían medio de crecimiento y 12, 30 o 60 µg/ml de metilina u oxacilina con alrededor de 10^5 ufc/ml. Estos tubos se incubaron y se sembraron en placas para determinar el recuento de ufc. Un clon para el que no observó reducción logarítmica de las ufc se seleccionó para el resto del experimento.

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5g), 6 % (0,6 g), 7 % (0,7g), 8 % (0,8g), 9 % (0,9g), 10 % (1,0g), 11 % (1,1g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3g), 14 % (1,4g), 15 % (1,5 g), y 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadió oxacilina estéril a cada condición experimental hasta una concentración final de 12, 30 o 60 µg/ml de antibiótico. Se ensayaron condiciones de control con 5, 10 y 16 % de MSM y sin antibiótico, o sin MSM y 12, 30 o 60 µg/ml de antibiótico.

A continuación se inocularon todos los tubos con una dilución de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* que proporcione clones a un nivel final de unidades formadoras de colonias de $3,3 \times 10^5$ /ml ($\log = 5,52$). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se reinoculó antibiótico cada 24 horas a la concentración inicial para mantener la presión sobre el organismo. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 24, 48, 72, y 120 horas. Cada condición se sembró en placas diluyendo 1 ml de material de crecimiento en 9 ml de caldo de dilución MLB. Esto se llevó a cabo cada tiempo, Se añadió 1 ml de medio de crecimiento que contenía MSM posteriormente al tubo para mantener un volumen y una concentración constantes de MSM. Esta mezcla se diluyó en serie hasta 10^{-7} , y se colocó 1 ml en una placa petri estéril en cada punto de dilución, por triplicado. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución, se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 a 72 horas. Se contaron las colonias bacterianas de cada placa y el promedio tomado se transformó al formato logarítmico. Cualesquiera ufc/ml mayores que $3,3 \times 10^5$ ($\log = 5,5$) se registraron como $>3,3 \times 10^5$.

Resultados:

En este experimento los controles positivos (los inoculados con MRSA) usados para las tres concentraciones de oxacilina sola (12 µg/ml, 30 µg/ml and 60 µg/ml) no mostraron disminución significativa en las unidades formadoras de colonias a partir del valor de los inóculos iniciales. En las Tablas 5 -9 se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 5: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en 5-16 % de MSM y 12, 30 o 60 µg/ml de oxacilina durante 24 horas.

% MSM	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 24 horas
16	7,6x10 ³	7,4x10 ³	7,6x10 ³	3,88
15	1,35x10 ⁴	1,30x10 ⁴	1,29x10 ⁴	4,11
14	1,00x10 ⁴	1,02x10 ⁴	1,01x10 ⁴	4,00
13	9,0x10 ³	8,7x10 ³	9,2x10 ³	3,95
12	7,0x10 ³	7,0x10 ³	7,3x10 ³	3,85
11	8,2x10 ³	8,5x10 ³	8,0x10 ³	3,91
10	5,8x10 ³	5,6x10 ³	6,0x10 ³	3,76
9	5,6x10 ³	5,2x10 ³	5,0x10 ³	3,72
8	6,6x10 ³	6,6x10 ³	6,9x10 ³	3,82
7	8,2x10 ³	8,5x10 ³	8,3x10 ³	3,91
6	8,6x10 ³	8,5x10 ³	8,0x10 ³	3,92
5	8,4x10 ³	8,0x10 ³	8,0x10 ³	3,91
0	3,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵	5,5
% MSM	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 24 horas
16	8,3x10 ³	8,3x10 ³	8,0x10 ³	3,91
15	8,7x10 ³	8,9x10 ³	8,8x10 ³	3,94
14	6,1x10 ³	6,0x10 ³	6,0x10 ³	3,78
13	4,4x10 ³	4,1x10 ³	4,2x10 ³	3,62
12	3,9x10 ³	3,9x10 ³	3,9x10 ³	3,59
11	3,9x10 ³	3,7x10 ³	3,7x10 ³	3,57
10	2,2x10 ³	2,2x10 ³	2,0x10 ³	3,32
9	1,06x10 ³	1,05x10 ³	1,02x10 ³	3,01
8	1,18x10 ³	1,18x10 ³	1,16x10 ³	3,07
7	9,7x10 ²	9,6x10 ²	9,2x10 ²	2,98
6	2,9x10 ²	2,9x10 ²	2,9x10 ²	2,46
5	3,1x10 ²	3,3x10 ²	3,3x10 ²	2,51
0	3,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵	3,3x10 ⁵	5,5
% MSM	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 24 horas
16	6,9x10 ³	6,9x10 ³	6,9x10 ³	3,83
15	6,6x10 ³	6,2x10 ³	6,4x10 ³	3,81
14	1,8x10 ²	1,7x10 ²	1,8x10 ²	2,03

13	6,3x10 ²	6,0x10 ²	6,0x10 ²	2,80
12	7,3x10 ²	7,1x10 ²	7,5x10 ²	2,86
11	6,7x10 ²	6,7x10 ²	6,9x10 ²	2,83
10	4,2x10 ²	4,4x10 ²	4,4x10 ²	2,63
9	3,2x10 ²	3,2x10 ²	3,2x10 ²	2,50
8	4,6x10 ²	4,6x 10 ²	5,0x10 ²	2,67
7	2,1x10 ²	2,3x10 ²	2,1x10 ²	2,34
6	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,4x10 ²	2,38
5	3,5x10 ²	3,3x10 ²	3,6x10 ²	2,54
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5

Como se muestra en la Tabla 5 y en la Figura 4, el número de ufc/ml observado en el punto temporal de 24 horas fue similar para todas las concentraciones de oxacilina. Las concentraciones de MSM inferiores tuvieron una reducción logarítmica mayor en el recuento de colonias que las concentraciones de MSM superiores. La reducción logarítmica promedio en el número de ufc/ml para 12 µg/ml de oxacilina es de 1,5 logs que se arrastra para todas las concentraciones con poco o ningún cambio. Las condiciones de 30 µg/ml y 60 µg/ml tuvieron una reducción logarítmica en el número de ufc/ml en el extremo inferior de las concentraciones de MSM, siendo un promedio de una diferencia de 3 log. La condición 60 µg/ml demostró la mayor reducción logarítmica en el número de ufc/ml en el periodo de las primeras 24 horas de las tres concentraciones de oxacilina. La condición de 60 µg/ml de oxacilina para MSM al 14 % tuvo una reducción de 3,5 log en el número de ufc/ml. Los controles LB negativos no mostraron signos de contaminación. Los controles LB positivos mostraron crecimiento turbio. Los controles de 5 %, 10 % y 16 % de MSM negativos no tenían signos de contaminación. Los controles de 5 %, 10 % y 16 % de MSM positivos tuvieron signos de crecimiento turbio. Los controles de oxacilina no mostraron signos de reducción significativa a partir de los inóculos iniciales, y los controles negativos no mostraron signos de contaminación.

Tabla 6: Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en 5-16 % de MSM y 12, 30 o 60 µg/ml de oxacilina durante 48 horas.

% MSM	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	4,2x10 ³	5,0x10 ³	4,3x10 ³	3,7
15	5,0x10 ³	4,5x10 ³	4,6x10 ³	3,7
14	1,0x10 ¹	1,2x10 ¹	1,1x10 ¹	1,0
13	6,8x10 ²	6,8x10 ²	5,8x10 ²	2,8
12	3,6x10 ²	4,0x10 ²	4,2x10 ²	2,8
11	6,4x10 ²	5,8x10 ²	6,5x10 ²	2,8
10	5,6x10 ²	5,4x10 ²	5,4x10 ²	2,7
9	2,4x10 ²	2,5x10 ³	2,3x10 ²	3,4
8	4,9x10 ³	4,9x10 ³	5,4x10 ³	3,7
7	9,0x10 ³	8,9x10 ³	8,5x10 ³	3,9
6	1,7x10 ³	1,4x10 ³	1,7x10 ³	3,2
5	4,5x10 ³	4,0x10 ³	4,2x10 ³	3,6
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
% MSM	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	4,6x10 ²	4,0x10 ²	4,1x10 ²	2,6

15	6,2x10 ²	6,4x10 ²	6,4x10 ²	2,8
14	3,6x10 ²	3,2x10 ²	3,5x10 ²	2,5
13	3,0x10 ²	3,1x10 ²	3,1x10 ²	2,5
12	3,9x10 ²	3,6x10 ²	4,0x10 ²	2,6
11	2,5x10 ²	2,7x10 ²	2,8x10 ²	2,4
10	4,3x10 ²	4,3x10 ²	4,0x10 ²	2,6
9	2,8x10 ²	2,6x10 ²	2,2x10 ²	2,4
8	1,23x10 ³	1,24x10 ³	1,20x10 ³	3,1
7	2,0x10 ²	2,1x10 ²	2,2x10 ²	2,3
6	5,5x10 ³	5,5x10 ³	5,9x10 ³	3,7
5	5,8x10 ³	6,0x10 ³	5,9x10 ³	3,8
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
% MSM	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	9,0x10 ¹	9,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,9
15	1,2x10 ²	1,3x10 ²	1,2x10 ²	2,1
14	1,5x10 ²	1,7x10 ²	1,2x10 ²	2,2
13	6,0x10 ¹	4,0x10 ¹	5,0x10 ¹	1,7
12	1,1x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²	2,0
11	1,3x10 ²	1,7x10 ²	1,2x10 ²	2,1
10	1,6x10 ²	1,4x10 ²	1,6x10 ²	2,2
9	1,8x10 ²	1,7x10 ²	1,5x10 ²	2,2
8	7,5x10 ²	7,3x10 ²	7,0x10 ²	2,8
7	1,0x10 ¹	1,1x10 ⁴	1,1x10 ⁴	4,0
6	6,0x10 ¹	5,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,8
5	3,0x10 ³	2,7x10 ²	3,3x10 ³	3,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5

Como se muestra en la Tabla 6, el número de ufc/ml observado en el punto temporal de 48 horas fue similar para todas las concentraciones de oxacilina. Se observó una tendencia para la mayoría de las concentraciones de MSM inferiores a tener una reducción logarítmica menor en el número de ufc/ml que las concentraciones de MSM superiores a través de todas las concentraciones de oxacilina. Las condiciones de 30 µg/ml y 60 µg/ml de oxacilina mostraron una mayor reducción logarítmica en el número de ufc/ml en el punto temporal de las 48 horas que en el punto temporal de las 24 horas para concentraciones de 8 %-16 % de MSM. La condición de 60 µg/ml de oxacilina mantuvo una reducción logarítmica promedio mayor en el número de ufc/ml en comparación con los puntos temporales de 24 horas correspondientes para las tres concentraciones de oxacilina. Dos puntos de interés son que el 14 % de MSM a 12 µg/ml de oxacilina tuvo una reducción logarítmica de 4,5 en el número de ufc/ml y el 14 % de MSM a 60 µg/ml de oxacilina mostró solamente una reducción logarítmica ligeramente mayor en el número de ufc/ml que el punto temporal de 24 horas correspondiente. Este podría representar un punto óptimo para el tratamiento con oxacilina y MSM. Los controles LB negativos no mostraron signos de contaminación. Los controles LB positivos mostraron crecimiento turbio. Los controles de 5 %, 10 % y 16 % de MSM negativos no tenían signos de contaminación. Los controles de oxacilina no mostraron signos de reducción significativa a partir de los inóculos iniciales, y los controles negativos no mostraron signos de contaminación.

Tabla 7. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 µg/ml de oxacilina durante 72 horas.

ES 2 674 019 T3

% MSM	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 72 horas
16	1,1x10 ²	1,2x10 ²	1,6x10 ²	2,1
15	2,3x10 ²	2,2x10 ²	1,2x10 ²	2,3
14	1,1x10 ²	1,2x10 ²	1,1x10 ²	2,0
13	5,2x10 ²	5,1x10 ²	5,4x10 ²	2,7
12	1,5x10 ³	3,1x10 ¹	1,3x10 ³	3,1
11	4,4x10 ³	4,5x10 ³	4,0x10 ³	3,6
10	1,2x10 ⁴	1,1x10 ⁴	1,0x10 ¹	4,0
9	4,7x10 ⁴	4,2x10 ⁴	4,5x10 ⁴	4,5
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
	30 µg/ml	30 µg/ml	30 µg/ml	72 horas
% MSM	oxacilina MSM (ufc/ml)	oxacilina MSM (ufc/ml)	oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio
16	9x10 ¹	8,0x10 ¹	8,0x10 ¹	1,9
15	2,3x10 ²	2,2x10 ²	2,8x10 ²	2,4
14	1,4x10 ²	1,7x10 ²	1,8x10 ²	2,2
13	9,0x10 ¹	8,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,8
12	4,8x10 ²	3,9x10 ²	4,9x10 ²	2,6
11	3,2x10 ¹	1,7x10 ³	1,5x10 ³	3,2
10	8,9x10 ³	9,0x10 ³	8,5x10 ³	3,9
9	8,8x10 ²	8,1x10 ²	8,5x10 ²	2,9
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,6x10 ⁴	3,6x10 ⁴	3,2x10 ⁴	4,5
6	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
% MSM	60 µg/ml de oxacilina MSM ((ufc/ml))	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 72 horas
16	6,0x10 ¹	6,0x10 ¹	5,0x10 ¹	1,8
15	0	0	0	
14	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,5
13	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1
12	2,8x10 ²	2,1x10 ²	2,5x10 ²	2,4
11	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1

10	$3,9 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	2,6
9	$3,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	2,5
8	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
7	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
6	$6,5 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	$6,1 \times 10^2$	2,8
5	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
0	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5

5 Como se muestra en la Tabla 7, el 15 % de MSM con una condición de oxacilina de 60 $\mu\text{g/ml}$ a las 72 hora no mostró signos de colonias. El tubo se extrajo del experimento y se ensayó para determinar el crecimiento de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus*. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 $\mu\text{g/ml}$ oxacilina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El aglomerado tenía 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina añadidos al mismo para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas seguido por la siembra en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a 10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. No se observaron colonias, indicando una destrucción total. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

15 Como se muestra en la Tabla 7, el número de ufc/ml observado en el punto temporal de 72 horas fue similar para todas las concentraciones de oxacilina. Las condiciones de MSM al 5-12 % mostraron una reducción logarítmica promedio menor en el número de ufc/ml en este punto temporal que para los puntos temporales iniciales. Esto puede demostrar una reducción en la sensibilidad del MRSA a oxacilina. Si es así, entonces, la reducción está correlacionada con la concentración de MSM (es decir, conc. de MSM menor = mayor resistencia a la oxacilina). La condición de 12 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina tiene una reducción logarítmica de 1 en el número de ufc/ml para las concentraciones de MSM de 12 %-16 %. La condición de 60 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina mantiene una reducción logarítmica promedio mayor en el número de ufc/ml entre las tres concentraciones de oxacilina que difiere en comparación con el primer periodo de 24 h. Dos puntos de interés son que el 14 % de MSM a una condición de 12 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina mostró una reducción logarítmica de 4,5 en el número de ufc/ml y el 12 % de MSM a una condición de 60 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina mostró solo una reducción logarítmica ligeramente mayor en el número de ufc/ml que el punto temporal anterior. Este podría representar un punto óptimo para el tratamiento con oxacilina. Los controles LB negativos no mostraron signos de contaminación. Los controles de 5 % 10 %, y 16 % de MSM negativos no tenían signos de contaminación. Los controles de oxacilina no mostraron signos de reducción significativa a partir de los inóculos iniciales, y los controles negativos no mostraron signos de contaminación.

30 **Tabla 8. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina durante 96 horas.**

% MSM	12 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 $\mu\text{g/ml}$ de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 96 horas
16	$1,4 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	2,2
15	$1,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	2,1
14	$6,0 \times 10^1$	$6,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$	1,8
13	$1,6 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^1$	3,2
12	$6,8 \times 10^3$	$7,0 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$	3,8
11	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
10	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
9	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
8	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
7	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
6	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5
5	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	5,5

0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
% MSM	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 96 horas
16	3,0x10 ¹	3,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,3
15	8,0x10 ¹	8,0x10 ¹	8,0x10 ¹	1,9
14	5,0x10 ¹	5,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,7
13	3,3x10 ²	3,1x10 ²	3,2x10 ²	2,5
12	6,9x10 ³	3,9x10 ³	3,9x10 ³	3,7
11	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
10	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
9	1,0x10 ¹	1,02x10 ⁴	1,01x10 ⁴	4,0
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
16	2,0x10 ¹	3,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,3
15	0	0	0	
14	0	0	0	
13	4,0x10 ¹	4,0x10 ¹	5,0x10 ¹	1,6
12	3,0x10 ³	3,5x10 ³	3,1x10 ³	3,5
11	0	0	0	
10	3,9x10 ³	4,0x10 ³	3,5x10 ³	3,6
9	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	4,4x10 ³	4,5x10 ³	4,4x10 ³	3,6
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5

5 Como se muestra en la Tabla 8, las condiciones de 11 % y 14 % de MSM con 60 µg/ml de oxacilina a las 96 horas no mostraron signos de colonias. El tubo se extrajo del experimento y se ensayó para determinar el crecimiento de la cepa ATCC 43300 de Staphylococcus. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml oxacilina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El aglomerado tenía 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 µg/ml de oxacilina añadidos al mismo para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas seguido por la siembra en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a 10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. No se observaron colonias, indicando una destrucción total. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

10 Como se muestra en la Tabla 8, las condiciones de 12 µg/ml de oxacilina con MSM al 12 y 13 % presentaron mayores recuentos de colonias en comparación con los puntos temporales iniciales. La condición de 12 µg/ml de

oxacilina con condiciones del 14-16 % presentó los mismos recuentos de colonias que el punto temporal previo de 72 horas. La condición de 30 µg/ml de oxacilina mostró una reversión mayor a la resistencia a la oxacilina que para los porcentajes de MSM inferiores del 5-13 %. La reducción logarítmica en las ufc/ml observadas fue pequeña para el 14-16 % en comparación con el punto temporal previo y parece mantenerse constante. Los 60 µg/ml de oxacilina no mostraron colonias a las concentraciones de MSM de 11 y 14 %. Para 60 µg/ml de oxacilina con concentraciones de MSM al 5-10 % y 12 %, las ufc/ml observadas fueron mayores que el límite de detección. Los datos al 11-12 % pueden mostrar posiblemente que la cantidad de adición de MSM es crucial para la reducción completa del organismo ya que las cantidades mayores (14 y 15 %) muestran signos de reducción de la destrucción total.

10 **Tabla 9. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30 o 60 µg/ml de oxacilina durante 120 horas.**

% MSM	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	3,0x10 ¹	3,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,5
15	1,1x10 ²	1,3x10 ²	1,2x10 ²	2,0
14	1,1x10 ²	1,2x10 ²	1,1x10 ²	2,0
13	6,2x10 ³	6,7x10 ³	6,2x10 ³	3,8
12	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
11	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
10	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
9	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
% MSM	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	2,0x10 ¹	3,0x10 ¹	1,0x10 ²	1,3
15	0	0	0	0
14	3,0x10 ¹	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,3
13	1,02x10 ³	1,01x10 ³	1,02x10 ³	3,0
12	6,8x10 ⁴	3,9x10 ⁴	6,9x10 ⁴	4,7
11	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
10	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
9	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5

% MSM	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de oxacilina MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	0	0	0	0
15	0	0	0	0
14	0	0	0	0
13	0	0	0	0
12	1,72x10 ⁴	1,6x10 ⁴	1,5x10 ⁴	4,2
11	0	0	0	0
10	1,6x10 ⁴	1,5x10 ⁴	1,7x10 ⁴	4,2
9	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
8	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
7	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
6	3,7x10 ⁴	3,4x10 ⁴	2,4x10 ²	4,5
5	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5
0	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	3,3X10 ⁵	5,5

Como se muestra en la Tabla 9, la condición de MSM al 15 % con 30 µg/ml de oxacilina, y la condición del MSM al 13 y 16 % con 60 µg/ml de oxacilina, a las 120 horas no mostraron signos de colonias. El tubo se extrajo del experimento y se ensayó para determinar el crecimiento de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml oxacilina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de la cepa ATCC 43300 *Staphylococcus aureus* que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El aglomerado tenía 10 ml de caldo Mueller-Hinton (Mueller & Hinton, Proc. Soc. Exp. Diol. and Med.; 48:330-333, 1941); con adición de 6 µg/ml de oxacilina añadidos al mismo para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas seguido por la siembra en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a 10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. No se observaron colonias, indicando una destrucción total. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

Las concentraciones de 12 µg/ml muestran que existe una ligera reducción o aumento para MSM al 14-16 %. Para 30µg/ml, el punto de concentración de MSM al 15 % tuvo muerte verdadera sin recuperación observada. Los puntos de concentración del 14 % y el 16 % no tuvieron cambios de valor significativos a partir del punto temporal previo. Los puntos de concentración de MSM al 13 % y 16 % de 60 µg/ml tuvieron muerte verdadera sin recuperación del organismo. El punto de concentración del 12 % muestra un aumento continuado en el log a partir del punto temporal previo.

En su conjunto, los datos presentados en las Tablas 5-9 muestran que en las primeras 24 horas no se produjo una reducción significativa en el log para las concentraciones inferiores (5-10 %) en cada uno de los tres niveles de oxacilina (las líneas de tendencia de la concentración de MSM de 16-5 % tienen una pendiente negativa). El punto temporal siguiente de 48 horas muestra que las tasas de reducción están comenzando a desplazarse desde el extremo inferior del 5-10 % al extremo superior del 11-16 %) (las líneas de tendencia de la concentración de MSM del 16-5 % tienen una pendiente positiva). El hito de 72 horas muestra una reducción logarítmica en ufc/ml para las concentraciones de MSM mayores donde las concentraciones menores de MSM muestran poca o ninguna reducción en las ufc/ml. Los puntos temporales de 96 y 120 horas muestran una supervivencia bacteriana reducida a las concentraciones de MSM más altas, pero sin efecto sobre la supervivencia bacteriana a concentraciones de MSM menores.

Los resultados de este experimento plantean algunas preguntas intrigantes. Los datos a las 24 horas muestran una reducción mayor a los porcentajes menores de MSM para las tres concentraciones de oxacilina evaluadas. Esta tendencia cambia ligeramente a las 48 horas observándose una reducción máxima en las concentraciones medias a superiores de MSM. Para las 72 horas, la tendencia ha cambiado definitivamente a una mayor reducción logarítmica a las concentraciones de MSM superiores. MSM se añadió solamente cuando el medio de crecimiento adicional (LB que contiene la misma concentración original de MSM que el vial de crecimiento) se añadió para mantener el volumen original en el vial. Por ejemplo, si se retiraba una alícuota de 1 ml de los 12 µg/ml de oxacilina con MSM al 5 % para la siembra en placas, entonces se añadía de nuevo 1 ml de LB que contenía MSM al 5 %.

Lo siguiente se ofrece como explicaciones hipotéticas para algunos de los efectos que se observan anteriormente;

sin embargo, no se pretende que estas explicaciones sean limitantes. Una posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que MSM sea consumido por los organismos. Otra posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que la capacidad de MSM de producir la reversión de la sensibilidad podría deberse a la capacidad de MSM de transportar la oxacilina a las células MRSA. Otra posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que un nivel demasiado alto de MSM sea menos eficaz en determinados puntos temporales. Por ejemplo, esto puede deberse a la competición de una sobreabundancia de moléculas de MSM libres que compiten con el MSM que se une con la oxacilina a concentraciones mayores. Esto haría que hubiera más MSM libre que penetra en las células que la oxacilina unida a MSM. Las concentraciones menores tienen un mayor porcentaje global de las moléculas de MSM totales en solución que se unen a la oxacilina, dejando que penetre más oxacilina unida en la célula ya que hay menos MSM libre para competir. Según esta hipótesis, para un número dado de moléculas de MSM que penetren en la célula MRSA, es importante la relación de MSM a oxacilina para obtener el efecto máximo. Si está presente una sobreabundancia de MSM, entonces la posibilidad de moléculas de MSM no unidas a la oxacilina que penetran en la célula aumenta.

15 **Ejemplo 8. Tratamiento de un patógeno bacteriano resistente a fármaco en un sujeto**

Este ejemplo describe un método representativo para tratar un sujeto con una infección bacteriana resistente a fármaco (por ejemplo, infección por MRSA) seleccionando un sujeto con una infección bacteriana resistente a fármaco y administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y un agente que inhibe la forma sensible al fármaco del patógeno bacteriano que produce la infección bacteriana resistente a fármaco. En este ejemplo, el sujeto tiene una infección por MRSA sobre su piel y el tratamiento comprende la administración tópica de una composición que comprende MSM al 12 % y 30 µg/ml de oxacilina.

En primer lugar, se selecciona un sujeto que tiene una infección por MRSA. El sujeto se selecciona obteniendo una muestra biológica del sujeto y analizando la muestra biológica para determinar la presencia de bacterias de *Staphylococcus aureus* seguido por la detección de la CIM de la bacteria para la oxacilina. Si la CIM de la oxacilina para la bacteria *Staphylococcus aureus* en la muestra biológica del sujeto es mayor de 2 µg/ml, entonces, la bacteria es una cepa de bacteria MRSA. La muestra contiene bacterias de *Staphylococcus aureus* y la CIM detectada para la oxacilina en las bacterias es de más de 2 µg/ml para la oxacilina utilizando el sistema Etest® (AB bioMérieux, SA France). Por lo tanto, se selecciona el sujeto.

Tras la selección del sujeto con MRSA, una composición que comprende 12 % de MSM y 30 µg/ml de oxacilina se administra por vía tópica a la piel del sujeto en la zona que rodea la infección por MRSA. La composición es de base acuosa, está formulada para la administración tópica y comprende NaCl al 1 %. La composición se administra dos veces al día, durante 10 días. Tras este ciclo de tratamiento, se observó que los síntomas de infección por MRSA en el sujeto habían disminuido en al menos un 50 % con respecto a los síntomas de infección por MRSA presentes antes del tratamiento con MSM y oxacilina, indicando que el sujeto se había tratado.

40 **Ejemplo 9: La absorción de MSM en la formulación tópica está comprendida en los niveles de seguridad reconocidos**

Este ejemplo muestra que la absorción del MSM en las formulaciones tópicas está comprendida en los niveles de seguridad reconocidos.

Se utilizaron conejos New Zealand White, que son un modelo animal aceptado para los estudios de absorción dérmica, para evaluar la absorción y los niveles en sangre resultantes de MSM. Se obtuvieron conejos de Charles River Canada (Saint-Constant, Quebec). Cinco conejos macho, con edades de 12-13 semanas y peso comprendido en un intervalo de 2,6 kg a 2,7 kg se utilizaron para los estudios de absorción dérmica. Se utilizaron los conejos debido a que su permeabilidad de la piel es mayor en comparación con ratas, cerdos o seres humanos. Por tanto, el ensayo en conejos es una estrategia más conservativa para la seguridad de los productos tópicos para uso humano. El tamaño del conejo se basó en las restricciones éticas de extraer más de 6 ml/kg de peso corporal de sangre en un periodo de dos semanas. El volumen total de sangre que se iba a extraer durante este estudio era de 10 ml en un único día. Se utilizó un animal por grupo para minimizar el número de animales requerido. Los animales se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. Se controló el ambiente del animalario diariamente (intervalos buscados: 18-26°C y humedad relativa 25-50 %). Se suministró aire fresco a la sala a una velocidad suficiente para proporcionar aproximadamente 15 a 17 cambios de aire en la sala por hora. Se llevaron a cabo observaciones clínicas en todos los animales para asegurar que los animales estaban en buen estado de salud antes de la dosificación. Se llevaron también a cabo observaciones de morbilidad y mortalidad durante el periodo del estudio.

Los grupos de tratamiento fueron como se muestra en la Tabla 10:

Tabla 10. Diseño del estudio

Grupo	Artículo experimental	Área superficial expuesta	Volumen Aplicado	Número de animales	Tiempos de extracción de la sangre (min)
A	10 % de MSM + 90 % de Agua	6 cm ²	0,5 ml	1	0 (dosis previa), 10, 30, 120,480 minutos
B	50 % de DMSO + 50 % de Agua	6 cm ²	0,5 ml	1	0 (dosis previa), 10, 30, 120,480 minutos
C	70 % de DMSO + 30 % de Agua	6 cm ²	0,5 ml	1	0 (dosis previa), 10, 30, 120, 480 minutos
D	10 % de MSM + 50 % de DMSO 40 % de Agua	6 cm ²	0,5 ml	1	0 (dosis previa), 10, 30, 120,480 minutos
E	10 % de MSM + 70 % de DMSO 20 % de Agua	6 cm ²	0,5 ml	1	0 (dosis previa), 10, 30, 120,480 minutos

Un día antes del estudio, la rabadilla de cada conejo se pinzó fuertemente con horquillas. Se midió un área de 6 cm² y se marcó para asegurar la equivalencia en la aplicación de las diversas composiciones. Se aplicó cada producto pipeteando 0,5 ml de cada composición en el centro de la zona de ensayo y se diseminó para cubrir toda la zona de ensayo. Después de 5 minutos de periodo de exposición, las composiciones se retiraron mediante limpieza con un paño, enjuagando y secando el área de ensayo.

Antes de la recogida de sangre, se tranquilizaron los animales con Acepromazina (1 mg/kg) mediante inyección intramuscular en el músculo de la pata trasera derecha después de lo cual se aplicó una crema EMLA (lidocaína/prilocaína) a ambas orejas a lo largo de la arteria de la oreja. Se extrajo la sangre mediante la inserción de una aguja de calibre 21G (conector retirado) en la arteria de la oreja. Se recogieron aproximadamente 2 ml de sangre completa en tubos Vacutainer de 4 ml (Becton Dickinson, Mississauga, ON) que contenían K₂EDTA. Se invirtieron los tubos para mezclar con el anticoagulante y se almacenaron refrigerados hasta que el plasma se separó mediante centrifugación. El plasma se separó de la sangre completa mediante centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos. El plasma se recogió, se transfirió y se almacenó en un criovial a -70°C hasta procesamiento posterior para el análisis de MSM.

Tras el periodo de exposición de 5 minutos a los diversos productos de ensayo (véase la Tabla 1), se extrajo sangre después de 10 minutos, 30 minutos, 2 horas y 8 horas. Antes de las extracciones de sangre de las 2 y 8 horas, se aplicó crema EMLA a las orejas (aproximadamente 30 minutos antes de cada extracción de sangre) ya que los efectos anestésicos de la crema EMLA duran aproximadamente 1 a 2 horas. Se utilizaron crema EMLA y Acepromazina por consideraciones éticas y para cuidar del bienestar de los animales utilizados en este estudio.

Las concentraciones de MSM en plasma se cuantificaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM) según métodos establecidos. En resumen, 450 µl de muestra de plasma se mezclaron con 50 µl de solución salina fisiológica y se sometieron a vortización durante 30 segundos. Tras esto, se añadió 1 ml de acetonitrilo (Fisher, calidad HPLC) a la mezcla. La solución se sometió a vortización intensamente durante 60 segundos y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos. Se introdujo un microlitro de sobrenadante transparente en el sistema de CG/EM (GC/MS QP20108 EI, Shimadzu, Kioto, Japón). Se llevó a cabo el análisis en una columna Shimadzu SHR5XLB (0,25 mm de DI X longitud 30m, película de 0,25 µm, Kioto, Japón). El tiempo de retención de MSM fue de 6,1-6,3 minutos. Se detectó MSM con EM y se usó m/z 79 (M+-15) para controlar los perfiles de los iones SIM de MSM. Se usó el gas helio como el gas transportador, la presión de cabeza fue de 0,25 kg/cm², el gas de recuperación era 30 ml/min, la temperatura de la columna era de 80°C, la temperatura del inyector era de 120°C, la temperatura del separador era de 200°C y la temperatura de la fuente de iones era de 250°C. La energía de ionización era de 70eV. Se preparó un gráfico normalizado externo con el MSM disuelto en acetonitrilo a las siguientes concentraciones: 62,5 µg/ml, 31,3 µg/ml, 15,6 µg/ml, 7,8 µg/ml, 3,9 µg/ml, 1,9 µg/ml, 0,98 µg/ml y 0,49 µg/µl. Se calculó la concentración de MSM en muestras de plasma a partir de la pendiente de la curva patrón. La gráfica mejor ajustada era lineal con un valor R² de 0,998.

Todos los animales se observaron antes del inicio del estudio y todos demostraron buena salud. Durante el ciclo del estudio y con posterioridad al estudio, todos los animales demostraron buena salud. Se evaluaron la morbilidad, la mortalidad y las lesiones dos veces al día. Los animales no demostraron ninguna morbilidad, mortalidad o lesiones.

Tabla 11. Concentración de MSM en plasma tras la exposición a MSM y DMSO

Tratamiento	Punto temporal (minuto)	Concentración de MSM (µg/ml)
10 % de MSM + 90 % de agua	0	25,6
	10	17,6
	30	16,3
	120	14,0
	480	15,4
	0	4,2

	10	6,9
50 % de DMSO + 50 % de agua	30	6,9
	120	7,4
	480	12,6
	0	56,7
70 % de DMSO + 30 % de agua	10	89,0
	30	98,9
	120	128,7
	480	120,2
	0	104,2
10 % de MSM M+ 50 % de DMSO + 40 % de agua	10	116,5
	30	127,9
	120	128,4
	480	140,4
	0	26,8
10 % de MSM + 70 % de DMSO + 20 % de agua	10	37,3
	30	30,9
	120	33,9
	480	44,4
	0	26,8

Los resultados del estudio de absorción se resumen en la Tabla 11. Las concentraciones en plasma iniciales de MSM (antes de la exposición a los artículos experimentales) estuvieron comprendidas entre 4,2 µg/ml y 104,2 µg/ml. La variación en el valor inicial está comprendida en el intervalo de variación normal de las concentraciones de MSM naturales que se han establecido en estudios anteriores. Tras la exposición a los diversos artículos experimentales, las concentraciones en plasma más altas de los MSM medidos fueron menores o iguales a aproximadamente 140 µg/ml. Esta concentración máxima es el resultado de la exposición a 10 % de MSM + 70 % de DMSO + 20 % de agua. Cuando se corrigieron para la variación natural en las concentraciones de los valores iniciales de MSM, la variación más grande en MSM en plasma se detectó en el grupo de 70 % de DMSO + 30 % de agua. Estos datos sugieren que las variaciones en MSM, debidas tanto a la absorción o debidas al metabolismo de DMSO, están comprendidas en el intervalo natural de las concentraciones de MSM.

Ejemplo 10. Efecto del MSM sobre la sensibilidad de MRSA a 12, 30 o 60 µg/ml de metilicina.

Este ejemplo describe experimentos *in vitro* que estudian la supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en presencia de MSM al 5-16 % y una concentración inicial de 12, 30 o 60 µg/ml de metilicina. Esto corresponde a 2x, 5x y 10x CIM para la metilicina. Se añadió más cantidad de antibiótico cada 24 horas. Los periodos de crecimiento ensayados fueron de 24 (Figura 5), 48, 72, 96 y 120 horas. Los resultados muestran que MSM sensibilizó una cepa de MRSA a metilicina.

Métodos:

Se usó el protocolo de eficacia antimicrobiana USP<51>como la plantilla del paradigma experimental. Las concentraciones de MSM iniciales ensayadas fueron del 5-16 % en incrementos de uno. Todas las concentraciones se sembraron en placas con diluciones de 10⁻⁷ para discernir las ufc/ml. La concentración inicial de metilicina utilizada fue de 12, 30 o 60 µg/ml, que corresponde a 2x, 5x y 10x CIM para la metilicina. Se añadió más antibiótico a la concentración inicial cada 24 horas.

Los materiales utilizados fueron Flake OptiMSM® MSM (número de lote 0604751), cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus*, tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml, caldo de lactosa (LB; Alpha Biosciences; Lote: L07-03), caldo Lethen modificado (MLB, Alpha Biosciences, Lote I08-09), agar de soja Trypto con lecitina y Tween 80 (TSA; Alpha Biosciences, lote: F08-42) y metilicina de sodio calidad USP lote KOH338.

La cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* se extendió en forma de vetas desde los aislamientos. Se seleccionó una colonia aislada, se extendió en vetas de nuevo y se incubó. Se seleccionó el aislado y a continuación se diluyó hasta un patrón de McFarland de uno. Posteriormente, el valor estimado se tomó para inocular los tubos que contenían medio de crecimiento y 12, 30 o 60 µg/ml de metilicina con alrededor de 10⁵ ufc/ml. Estos tubos se incubaron y se sembraron en placas para determinar el recuento de ufc. Un clon para el que no observó reducción logarítmica de las ufc se seleccionó para el resto del experimento.

Se pesó Flake OptiMSM® MSM en una balanza Mettler Toledo AG245 SN: 1115210833 certificada y se distribuyó en alícuotas para cada concentración. Se introdujo el MSM en tubos de cultivo de vidrio de borosilicato de 30 ml. Se añadió MSM a los tubos como sigue: 5 % (0,5g), 6 % (0,6g), 7 % (0,7g), 8 % (0,8g), 9 % (0,9g), 10 % (1,0g), 11 % (1,1g), 12 % (1,2 g), 13 % (1,3g), 14 % (1,4g), 15 % (1,5 g), y 16 % (1,6 g). Se calculó el material para un volumen de 10 ml. Se añadió metilicina estéril a cada condición experimental hasta una concentración final de 12, 30 o 60 µg/ml de antibiótico. Se inocularon controles positivos de caldo de lactosa con y sin los 12 µg/ml, 30 µg/ml, 60 µg/ml

de antibiótico con MRSA. el caldo de lactosa tenía también un conjunto de controles negativos. Los controles de MSM (sin antibiótico) a las concentraciones del 5 %, 10 % y 16 % se analizaron también con y sin MRSA. Los tubos se configuraron de forma unívoca, pero se sembraron en placas por triplicado, como se describe más adelante.

5 A continuación se inocularon todos los tubos con una dilución de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* que proporcione clones a un nivel final de unidades formadoras de colonias de $1,49 \times 10^5$ /ml ($\log = 5,17$). Se incubaron los tubos a 25°C y se mezclaron periódicamente. Se reinoculó antibiótico cada 24 horas a la concentración inicial para mantener la presión sobre el organismo. Se llevó a cabo la siembra en placas a las 24, 48, 72, y 120 horas. Cada condición se sembró en placas diluyendo 1 ml de material de crecimiento en 9 ml de caldo de dilución MLB. Esto se llevó a cabo cada tiempo, Se añadió 1 ml de medio de crecimiento que contenía MSM posteriormente al tubo para mantener un volumen y una concentración constantes de MSM. Esta mezcla se diluyó en serie hasta 10^{-7} , y se colocó 1 ml en una placa petri estéril en cada punto de dilución, por triplicado. Se añadieron 20 ml de TSA a cada dilución, se centrifugaron y se dejaron solidificar. Todas las diluciones se colocaron en una estufa incubadora a 35°C durante 24 a 72 horas. Se contaron las colonias bacterianas de cada placa y el promedio tomado se transformó al formato logarítmico. Cualesquiera ufc/ml mayores que $1,49 \times 10^5$ /ml ($\log = 5,17$) se registraron como TNTC. Se registraron los gráficos como log de 5,2 para TNTC para mostrar la comparación entre los diferentes puntos de datos.

Resultados:

En este experimento los controles positivos (los inoculados con MRSA) usados para las tres concentraciones de metilicina sola (12 µg/ml, 30 µg/ml and 60 µg/ml) no mostraron disminución significativa en las unidades formadoras de colonias a partir del valor de los inóculos iniciales. En las Tablas 12 -16 se muestran los resultados de este estudio.

Tabla 12. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30 o 60 µg/ml de metilicina durante 24 horas.

Concentración como % MSM	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 24 horas
16	$1,01 \times 10^3$	$1,03 \times 10^3$	$1,04 \times 10^3$	3,0
15	$6,4 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$	3,8
14	$8,8 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3$	3,9
13	$3,3 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	3,5
12	$2,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	3,5
11	$2,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	3,3
10	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	3,1
9	$9,0 \times 10^2$	$9,4 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$	3,0
8	$9,6 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	3,0
7	$4,4 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$	2,7
6	$4,0 \times 10^2$	$4,4 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$	2,6
5	$7,8 \times 10^2$	$8,0 \times 10^2$	$8,2 \times 10^2$	2,9
0	TNTC	TNTC	TNTC	
% MSM	30 µg/ml de metilicina /	30 µg/ml de metilicina /	30 µg/ml de metilicina /	Log promedio de 24 horas
Concentración	MSM (ufc/ml)	MSM (ufc/ml)	MSM (ufc/ml)	
16	$9,6 \times 10^3$	$9,8 \times 10^3$	$9,7 \times 10^3$	4,0
15	$7,8 \times 10^3$	$7,6 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3$	3,9
14	$6,3 \times 10^3$	$6,7 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	3,8

13	6,5x10 ³	6,5x10 ³	6,4x10 ³	3,8
12	3,3x10 ³	3,3x10 ³	3,3x10 ³	3,5
11	3,3x10 ³	3,8x10 ²	3,1x10 ³	3,5
10	3,2x10 ¹	1,3x10 ³	3,1x10 ¹	3,1
9	3,1x10 ¹	1,3x10 ³	3,2x10 ¹	3,1
8	9,4x10 ²	9,6x10 ²	9,6x10 ²	3,0
7	3,4x (102)	3,5x10 ²	3,3x10 ²	2,5
6	2,2x10 ²	2,2x10 ²	2,5x10 ²	2,4
5	3,8x10 ²	4,1x10 ²	4,0x10 ²	2,6
0	TNTC	TNTC	TNTC	
% MSM	60 µg/ml de metilina /	60 µg/ml de metilina /	60 µg/ml de metilina /	Log promedio de 24 horas
Concentración	MSM (ufc/ml)	MSM (ufc/ml)	MSM (ufc/ml)	
16	8,4x10 ³	8,4x10 ³	8,5x10 ³	3,9
15	9,3x10 ³	8,5x10 ³	8,4x10 ³	3,9
14	8,3x10 ³	8,8x10 ³	8,5x10 ³	3,9
13	7,0x10 ³	6,8x10 ³	6,5x10 ³	3,8
12	4,5x10 ³	4,1x10 ³	4,7x10 ⁴	3,6
11	3,5x10 ³	3,8x10 ³	3,9x10 ³	3,6
10	2,2x10 ³	2,1x10 ³	2,0x10 ³	3,3
9	2,0x10 ³	1,6x10 ³	1,8x10 ³	3,2
8	9,4x10 ²	9,8x10 ²	9,7x10 ²	3,0
7	6,1x10 ²	6,3x10 ²	6,2x10 ²	2,8
6	4,2x10 ⁴	4,2x10 ²	4,8x10 ²	2,6
5	8,3x10 ²	8,1x10 ²	8,1x10 ²	2,9
0	TNTC	TNTC	TNTC	

Como se muestra en la Tabla 12 y en la Figura 5, el número de ufc/ml observadas en el punto temporal de 24 horas fue similar para todas las concentraciones. El extremo inferior de las concentraciones de MSM tiende a tener una reducción logarítmica mayor en el recuento de colonias que las concentraciones de MSM superiores. La reducción logarítmica promedio en el recuento de colonias para 12 µg/ml de metilina es de 1,5 logs que se arrastra para todas las concentraciones de MSM con poco o ningún cambio. Las condiciones de 30 µg/ml de metilina tuvieron una reducción significativa en el extremo inferior de las concentraciones de MSM siendo un promedio una diferencia de 3 log. La condición de 60 µg/ml de metilina mostró una reducción logarítmica ligeramente inferior en el recuento de colonias durante el periodo de las primeras 24 horas para las tres concentraciones de antibiótico. Un punto de interés es que los 12 µg/ml con MSM al 16 % tuvieron una reducción logarítmica de 2,2, que es la más observada a las concentraciones mayores. Una posibilidad hipotética es que este sea un valor atípico o un punto óptimo para la captación de antibiótico para esta concentración. Los 30 µg/ml tuvieron la reducción logarítmica global más alta de 2.8 en el recuento de colonias para la concentración del 6 %. Los controles LB negativos no mostraron signos de contaminación. Los controles LB positivos mostraron un crecimiento turbio y se terminaron en este punto por motivos de seguridad. Los controles de 5 %, 10 % y 16 % de MSM negativos no tenían signos de contaminación. Los controles del 5 %, 10 %, y 16 % de MSM positivos tenían signos de crecimiento turbio, eran TNTC para todas las diluciones sembradas en placas y se terminaron en este punto temporal por motivos de seguridad. Los controles de antibióticos no mostraron signos de reducción significativa a partir de los inóculos iniciales, y los controles negativos no mostraron signos de contaminación.

20

Tabla 13. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 µg/ml de metilicina durante 48 horas.

Concentración como % MSM	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	8,1x10 ²	8,3x10 ²	8,4x10 ²	2,9
15	5,1x10 ²	5,3x10 ²	5,6x10 ²	2,7
14	5,1x10 ²	5,4x10 ²	5,2x10 ²	2,7
13	3,6x10 ²	3,3x10 ²	3,4x10 ²	2,5
12	6,3x10 ²	6,4x10 ²	6,2x10 ²	2,8
11	5,9x10 ²	5,7x10 ²	6,0x10 ²	2,8
10	4,1x10 ²	4,6x10 ²	2,7x10 ⁴	2,6
9	2,5x10 ²	2,8x10 ²	3,2x10 ²	2,4
8	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,1x10 ²	2,0
7	4,0x10 ¹	3,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,6
6	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,0x10 ²	1,1
5	2,0x10 ²	1,8x10 ²	2,1x10 ²	2,3
0	TNTC	TNTC	TNTC	
Concentración como % MSM	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	4,5x10 ²	2,7x10 ⁴	4,6x10 ²	2,7
15	5,3x10 ²	5,2x10 ²	5,6x10 ²	2,7
14	7,0x10 ²	6,8x10 ²	7,4x10 ²	2,8
13	4,0x10 ²	4,0x10 ²	4,0x10 ²	2,6
12	4,8x10 ²	5,0x10 ²	5,1x10 ²	2,7
11	1,9x10 ²	1,8x10 ²	2,1x10 ²	2,3
10	1,2x10 ²	1,8x10 ²	1,6x10 ²	2,2
9	2,1x10 ²	2,3x10 ²	2,4x10 ²	2,3
8	4,1x10 ²	4,0x10 ²	3,4x10 ²	2,6
7	1,8x10 ²	1,5x10 ²	1,6x10 ²	2,2
6	2,9x10 ²	2,2x10 ²	2,5x10 ²	2,4
5	4,6x10 ²	4,8x10 ²	4,4x10 ²	2,7
0	TNTC	TNTC	TNTC	
Concentración como % MSM	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 48 horas
16	2,1x10 ²	2,2x10 ²	1,8x10 ²	2,3
15	3,5x10 ²	3,8x10 ²	3,8x10 ²	2,6
14	2,9x10 ²	2,9x10 ²	3,1x10 ²	2,5
13	4,0x10 ²	3,7x10 ²	3,6x10 ²	2,6

12	3,3x10 ²	3,8x10 ²	3,7x10 ²	2,6
11	5,0x10 ¹	5,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,7
10	2,1x10 ²	2,4x10 ²	2,5x10 ²	2,4
9	1,3x10 ²	1,2x10 ²	1,3x10 ²	2,1
8	8,0x10 ¹	6,0x10 ¹	7,0x10 ¹	1,8
7	2,4x10 ²	2,1x10 ²	2,3x10 ²	2,4
6	2,0x10 ²	2,0x10 ²	3,0x10 ²	2,4
5	1,0x10 ¹	1,0x10 ²	1,0x10 ¹	1,1
0	TNTC	TNTC	TNTC	

Como se muestra en la Tabla 13, la reducción logarítmica en el recuento de colonias está empezando a ser más similar entre todas las concentraciones. La tendencia comienza a mostrar el extremo superior de las condiciones del porcentaje de MSM que empiezan a ser similares en la reducción logarítmica que el extremo inferior de las condiciones del porcentaje de MSM. Las condiciones de 12 µg/ml de metilicina con MSM al 6 %-7 % muestran una reducción logarítmica superior en el recuento de colonias global excepto para MSM al 5 % y la condición de 60 µg/ml y MSM al 6 % y la condición de 12 µg/ml de metilicina, que tienen la reducción logarítmica más alta en el recuento de colonias. Una explicación hipotética de este resultado es que estos posiblemente podría mostrar una concentración óptima para este periodo de tiempo.

Los 30 y 60 µg/ml de metilicina tuvieron una reducción global mejor que los resultados de 24 horas en las condiciones de MSM al 8 %-12 %. Los 60 µg/ml mantienen una reducción logarítmica promedio mayor en el recuento de colonias en comparación con el periodo de las primeras 24 horas para las tres concentraciones de antibiótico. Dos puntos de interés son (1) la condición de MSM al 6 % a 12 µg/ml de metilicina que tiene una reducción logarítmica de 4,1 en el recuento de colonias y (2) la condición de MSM al 5 % y 60 µg/ml de metilicina que tiene una reducción logarítmica de 4,1 en el recuento de colonias. Una explicación meramente hipotética para esto es que la metilicina tiene sitios de unión polares adicionales para MSM proporcionando por tanto una concentración óptima para la posible captación en las células. El gráfico general muestra una reducción incluso mayor para las concentraciones de MSM de 8 % a 16 %. Los controles LB negativos no mostraron signos de contaminación. Los controles LB positivos mostraron un crecimiento turbio que tenía un TNTC en la siembra en placas a 10⁵. Los controles de 5 %, 10 % y 16 % de MSM negativos no tenían signos de contaminación. Los controles de antibióticos no mostraron signos de reducción significativa a partir de los inóculos iniciales, y los controles negativos no mostraron signos de contaminación.

Tabla 14. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 µg/ml de metilicina durante 72 horas.

Concentración como % MSM	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 72 horas
16	3,3x10 ²	3,1x10 ²	3,4x10 ²	2,5
15	1,6x10 ²	2,1x10 ²	2,2x10 ²	2,3
14	2,2x10 ²	2,5x10 ²	2,0x10 ²	2,3
13	1,4x10 ²	1,7x10 ²	1,6x10 ²	2,2
12	2,3x10 ²	2,5x10 ²	2,6x10 ²	2,4
11	5,1x10 ²	4,9x10 ²	5,0x10 ²	2,7
10	2,1x10 ²	1,9x10 ²	1,8x10 ²	2,3
9	1,1x10 ²	1,3x10 ²	1,4x10 ²	2,1
8	4x10 ¹	5x10 ¹	5x10 ¹	1,7
7	0	0	0	0
6	0	0	0	0
5	2,4x10 ²	2,7x10 ²	2,6x10 ²	2,4

0	TNTC	TNTC	TNTC	
Concentración como % MSM	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 72 horas
16	1,0x10 ²	1,2x10 ²	1,1x10 ²	2,0
15	2,7x10 ²	2,7x10 ²	2,9x10 ²	2,4
14	1,9x10 ²	2,0x10 ²	2,2x10 ²	2,3
13	1,7x10 ²	1,8x10 ²	1,7x10 ²	2,2
12	1,6x10 ²	1,9x10 ²	1,9x10 ²	2,3
11	1,1x10 ²	1,3x10 ²	1,1x10 ²	2,1
10	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²	2,0
9	1,2x10 ²	1,1x10 ²	1,0x10 ²	2,0
8	2,2x10 ²	2,5x10 ²	2,4x10 ²	2,4
7	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,3
6	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
5	6x10 ¹	8x10 ¹	7x10 ¹	1,8
0	TNTC	TNTC	TNTC	
Concentración como % MSM	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 72 horas
16	2,0x10 ¹	4,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,4
15	1,3x10 ²	1,3x10 ²	1,3x10 ²	2,1
14	1,1x10 ²	1,4x10 ²	1,4x10 ²	2,1
13	1,7x10 ²	1,5x10 ²	1,8x10 ²	2,2
12	1,2x10 ²	1,3x10 ²	1,2x10 ²	2,1
11	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,1x10 ²	2,0
10	8,0x10 ¹	9,0x10 ¹	8,0x10 ¹	1,9
9	8,0x10 ¹	8,0x10 ¹	8,0x10 ¹	1,9
8	1,0x10 ²	1,1x10 ²	1,1x10 ²	2,0
7	5,0x10 ¹	4,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,7
6	0	0	0	0
5	0	0	0	0
0	TNTC	TNTC	TNTC	

5 Como se muestra en la Tabla 14, las condiciones de 6 % y 7 % de MSM con 12 µg/ml de metilicina a las 72 horas no mostraron signos de colonias en todas las siembras en placa. Los tubos del 6 % y 7 % de MSM se sacaron después del experimento y se analizaron para determinar el MRSA. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml de metilicina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El aglomerado tenía 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 µg/ml de metilicina añadidos al mismo para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas y se sembraron en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a

10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. Como todos los recipientes estaban a una dilución 1/10 en la solución de enriquecimiento, la siembra en placas de cada recipiente de esta manera proporcionó a los inventores un límite de detección de 1 ufc/ml. Se consideró que esto era una verdadera muerte total ya que no pudo conseguirse la recuperación del organismo. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

Como se muestra en la Tabla 14, las condiciones de 5 % y 6 % de MSM con 60 µg/ml de metilicina a las 72 horas no mostraron signos de colonias en todas las siembras en placa. Los tubos del 5 % y 6 % de MSM se sacaron después del experimento y se analizaron para determinar el MRSA. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml de metilicina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El aglomerado tenía 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 µg/ml de metilicina añadidos al mismo para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas y se sembraron en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a 10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. Como todos los recipientes estaban a una dilución 1/10 en la solución de enriquecimiento, la siembra en placas de cada recipiente de esta manera proporcionó a los inventores un límite de detección de 1 ufc/ml. Se consideró que esto era una verdadera muerte total ya que no pudo conseguirse la recuperación del organismo. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

Cuando se compara con el experimento de la oxacilina que se muestra en el Ejemplo 6, los resultados en el punto temporal de las 72 horas muestran una reducción logarítmica mayor en el recuento de colonias excepto para la condición de MSM al 6 % en 30 µg/ml de metilicina. Una explicación meramente hipotética para esto es que la metilicina tiene más sitios de unión para MSM y tiende a ser más uniforme en la reducción entre todas las concentraciones. La tendencia del hito de 72 horas está comenzando a mostrar que la concentración inferior y superior tiene una reducción más uniforme, teniendo el extremo inferior un impacto más grande en la no recuperación de organismos viables a las concentraciones de MSM al 5-7 %. El ensayo de la metilicina muestra una tasa inferior de reversión de resistencia al antibiótico que el ensayo de oxacilina en el experimento anterior. Una explicación meramente hipotética para esto es que MSM se introduce en las células más eficazmente debido al aumento de los posibles sitios de unión de la metilicina. El punto temporal de las 72 horas de metilicina muestra más muertes verdaderas de MRSA que las que se han observado anteriormente. Una cosa a tener en cuenta es que MSM se sustituyó con la misma concentración y no se sustituyó a una concentración fija como se lleva a cabo en los experimentos anteriores.

Tabla 15. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 µg/ml de metilicina durante 96 horas.

Concentración como % MSM	12 g/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 96 horas
16	1,1x10 ²	1,3x10 ²	1,2x10 ²	2,1
15	1,4x10 ²	1,3x10 ²	1,6x10 ²	2,2
14	1,2x10 ²	1,2x10 ²	1,3x10 ²	2,1
13	1,1x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²	2,0
12	1,6x10 ²	1,8x10 ²	1,8x10 ²	2,2
11	1,0x10 ²	1,1x10 ²	1,2x10 ²	2,0
10	1,1x10 ²	1,2x10 ²	1,2x10 ²	2,1
9	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
8	0	0	0	0
7	0	0	0	0
6	0	0	0	0
5	1,33x10 ³	1,40x10 ³	1,47x10 ³	3,1
0	TNTC	TNTC	TNTC	

ES 2 674 019 T3

Concentración como % MSM	30 µg/ml de metilicina/ MSM M(ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 96 horas
16	2,0x10 ¹	1,8x10 ¹	1,6x10 ¹	2,3
15	1,1x10 ²	1,1x10 ²	1,3x10 ²	2,1
14	1,2x10 ²	1,3x10 ²	1,1x10 ²	2,1
13	1,0x10 ²	1,5x10 ²	1,0x10 ²	2,1
12	4,0x10 ¹	4,0x10 ¹	4,0x10 ¹	1,6
11	3,0x10 ¹	4,0x10 ¹	3,0x10 ¹	1,5
10	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,2
9	2,5x10 ²	2,7x10 ²	2,8x10 ⁻²	2,4
8	4,5x10 ²	4,5x10 ²	4,0x10 ²	2,6
7	1,1x10 ²	13x10 ²	1,5x10 ²	2,1
6	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
5	4,2x10 ²	4,1x10 ²	4,5x10 ²	2,6
0	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
16	4,0x10 ¹	7,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,75
15	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1
14	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1
13	6,0x10 ¹	3,0x10 ¹	3,0x10 ¹	1,6
12	3,0x10 ¹	2,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,4
11	1,0x10 ¹	2,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,1
10	6,0x10 ¹	6,0x10 ¹	6,0x10 ¹	1,8
9	2,0x10 ¹	3,0x10 ¹	1,0x10 ¹	1,3
8	1,39x10 ⁴	1,41x10 ⁴	1,36x10 ⁴	4,1
7	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁴	1,5x10 ⁴	4,1
6	0	0	0	0
5	0	0	0	0
0	TNTC	TNTC	TNTC	5,2

Como se muestra en la Tabla 15, a las 96 horas y a 12 µg/ml de metilicina, la concentración de MSM al 9 % mostró mayor supervivencia de bacterias. Una explicación meramente hipotética para esto que las bacterias han revertido la resistencia al antibiótico. La condición de MSM al 5 % de MSM muestra también mayor supervivencia de bacterias.

- 5 La concentración de MSM al 8 % no mostró signos de colonias en todas las siembras en placas. El tubo del 8 % se extrajo del experimento y se ensayó para determinar el MRSA. El tubo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml de metilicina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. El tubo de ensayo restante tenía 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 µg/ml de metilicina para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 10 48 horas y se sembraron en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas a 10 diluciones para obtener un límite de detección de 1 ufc. Como todos los recipientes estaban a una dilución 1/10 en la solución de enriquecimiento, la siembra en placas de cada recipiente de esta manera proporcionó a los inventores un límite de detección de 1 ufc/ml. Se consideró que esto era una verdadera muerte total ya que no pudo conseguirse la 15 recuperación del organismo. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

Como se muestra en la Tabla 15, a las 96 horas y a 30 µg/ml de metilicina, las concentraciones de MSM superiores muestran una reducción logarítmica mayor en ufc/ml. Las concentraciones de 5 % al 9 % de MSM (excepto para el 6 % de MSM), muestran menos reducción en ufc/ml. A las 96 horas y 60 µg/ml de metilicina, las concentraciones del 9 % al 16 % de MSM mostraron una reducción logarítmica mayor en el recuento de colonias que en el punto temporal de las 72 horas. Las condiciones del 7 % y el 8 % de MSM muestran menos reducción en las ufc/ml.

la condición de MSM al 8 % y 12 µg/ml no muestra supervivencia de organismos viables. Se observó TNTC en las condiciones del 7 % y 8 % de MSM y 60 µg/ml de metilicina y MSM al 5 % y 12 µg/ml de metilicina. En su conjunto, a las 96 horas, las condiciones de MSM al 10-16 % mostraron recuentos de colonias inferiores o similares en comparación con el punto temporal previo de 72 horas.

Los 30 µg/ml mostraron mayores recuentos de colonias para las condiciones de 5 al 9 % de MSM. La reducción logarítmica en los recuentos de colonias es ligeramente menor o permanece igual para el 10-16 % en comparación con el punto temporal previo y parece mantenerse constante.

Tabla 16. Supervivencia de la cepa ATCC 43300 de *Staphylococcus aureus* en MSM 5-16 % y 12, 30, o 60 µg/ml de metilicina durante 120 horas.

Concentración como % MSM	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	12 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	2,0x10 ²	2,3 x10 ²	2,4 x10 ²	2,3
15	2,9 x10 ²	3,4 x10 ²	3,1 x10 ²	2,5
14	3,5 x10 ²	4,0 x10 ²	3,8 x10 ²	2,6
13	2,0 x10 ²	1,8 x10 ²	2,1 x10 ²	2,3
12	1,21 x10 ³	1,21 x10 ³	1,21 x10 ³	4,1
11	1,24 x10 ⁴	1,22 x10 ⁴	1,23 x10 ⁴	4,1
10	1,10 x10 ⁴	1,10 x10 ⁴	1,13 x10 ⁴	4,0
9	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
8	0	0	0	0
7	0	0	0	0
6	0	0	0	0
5	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
0	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
Concentración como % MSM	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	30 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	0	0	0	0
15	3,0 x10 ¹	4,0 x10 ¹	3,0 x10 ¹	1,5
14	5,0 x10 ¹	7,0 x10 ¹	6,0 x10 ¹	1,8
13	5,0 x10 ¹	4,0 x10 ¹	4,0 x10 ¹	1,6
12	0	0	0	0
11	0	0	0	0
10	0	0	0	0
9	1,3 x10 ³	1,1 x10 ³	1,2 x10 ³	3,1
8	9,0 x10 ²	9,1 x10 ²	9,5 x10 ²	3,0
7	TNTC	TNTC	TNTC	5,2

6	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
5	1,21 x10 ³	1,21 x10 ³	1,21 x10 ³	3,0
0	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
Concentración como % MSM	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	60 µg/ml de metilicina/ MSM (ufc/ml)	Log promedio de 120 horas
16	1,0 x10 ¹	2,0 x10 ¹	2,0 x10 ¹	1,2
15	0	0	0	0
14	0	0	0	0
13	3,0 x10 ¹	3,0 x10 ¹	3,0 x 10 ¹	1,5
12	0	0	0	0
11	0	0	0	0
10	1,0 x10 ¹	1,0 x10 ¹	1,0 x10 ¹	1
9	1,0 x10 ¹	1,0 x10 ¹	1,0 x10 ¹	1
8	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
7	TNTC	TNTC	TNTC	5,2
6	0	0	0	0
5	0	0	0	0
0	TNTC	TNTC	TNTC	5,2

Como se muestra en la Tabla 16, a las 120 horas y 30 µg/ml de metilicina, las concentraciones del 10 %, 11 %, 12 % y 16 % de MSM no mostraron signos de colonias; y a las 120 horas y 60 µg/ml de metilicina, las concentraciones del 11 %, 12 %, 14 % y 15 % de MSM no mostraron signos de colonias. Los tubos que corresponden a estas condiciones se extrajeron del experimento y se ensayaron para determinar MRSA. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. A continuación se decantó el sobrenadante en 90 ml de caldo de Mueller-Hinton con 6 µg/ml de metilicina. Esto es para el enriquecimiento y la recuperación de cualesquiera células de MRSA que puedan estar presentes tanto sanas como estresadas. Los tubos de ensayo restantes tenían 10 ml de caldo de Mueller-Hinton con adición de 6 µg/ml de metilicina para recuperar cualquier célula que pueda estar presente. Ambos recipientes se incubaron a 35°C durante 48 horas y se sembraron en placas cada 24 horas. Cada recipiente se sembró en placas en 10 veces para obtener un límite de detección de 1 ufc. Como ambos recipientes estaban a una dilución 1/10 en la solución de enriquecimiento, la siembra en placas de cada recipiente de esta manera proporcionó a los inventores un límite de detección de 1 ufc. Se consideró que esto era una verdadera muerte total ya que no pudo conseguirse la recuperación del organismo. Este punto temporal para los fines de representación gráfica se notificó como 0 logs.

En su conjunto, a las 120 horas y a 12 µg/ml de metilicina, existe un ligero aumento en las ufc/ml en 13-16 % de MSM y un mayor aumento a concentraciones del 10 %-12 % de MSM en comparación con el punto temporal previo. La condición de MSM al 5 % y 12 µg/ml de metilicina mostró TNTC ufc/ml. Las concentraciones superiores de MSM al 13-16 % mostraron solo un ligero aumento en las ufc/ml. Una explicación meramente hipotética para esto que las bacterias revierten a resistencia al antibiótico, pero que las mayores concentraciones de MSM tuvieron un impacto significativo sobre la ralentización del proceso de reversión ya que los inventores observaron un ligero aumento en las ufc/ml a mayores concentraciones de MSM mientras que las concentraciones menores tuvieron un aumento significativo de las ufc/ml.

A 30 µg/ml de metilicina, las condiciones del 16 %, 12 %, 11 % y 10 % de MSM mostraron verdadera muerte sin recuperación observada. Las condiciones del 15 %, 14 % y 13 % de MSM mostraron una ligera reducción en las ufc/ml a partir del punto temporal previo. Las condiciones del 5 %, 8 % y 9 % de MSM mostraron ufc/ml ligeramente mayores que el punto temporal previo.

A 60 µg/ml de metilicina, las condiciones del 15 %, 14 %, 12 % y 11 % de MSM mostraron verdadera muerte sin recuperación del organismo. Los puntos de concentración del 10 % y 9 % muestran una disminución continuada en

las ufc/ml a partir del punto temporal previo. Una posibilidad es que estas concentraciones de MSM y antibiótico tengan un mayor impacto sobre MRSA.

5 En su conjunto, la combinación de MSM y metilina demostró capacidad para disminuir significativamente las unidades formadoras de colonias de MRSA en todos los puntos temporales evaluados. Basándose en los resultados de este experimento, MSM parece tener la capacidad de restaurar la sensibilidad de MRSA a la metilina *in vitro*. Cuando se compara con oxacilina en los experimentos previos, el índice de reducción en el valor logarítmico era incluso mayor a través de las concentraciones. Una explicación hipotética para esto es que la metilina tiene más sitios de unión cuando se compara en la estructura con oxacilina que la que se muestra en los experimentos
10 generales. Existen más muertes verdaderas significativas y la reducción sobre todas las concentraciones es mayor con metilina que con oxacilina.

15 En su conjunto, los datos presentados en las Tablas 12-16 muestran que en las primeras 24 horas hubo una reducción mayor en los porcentajes inferiores de MSM para las tres concentraciones de metilina evaluadas. Esta tendencia cambia ligeramente a las 48 horas observándose una reducción máxima en las concentraciones medias a superiores de MSM. Para las 72 horas, la tendencia ha cambiado definitivamente a una mayor reducción logarítmica a las concentraciones de MSM superiores. MSM se añadió solamente cuando el medio de crecimiento adicional (LB que contiene la misma concentración original de MSM que el vial de crecimiento) se añadió para mantener el volumen original en el vial. Por ejemplo, si se retiraba una alícuota de 1 ml de los 12 µg/ml de metilina con MSM al
20 5 % para la siembra en placas, entonces se añadía de nuevo 1 ml de LB que contenía MSM al 5 %. Se añadieron los antibióticos a las concentraciones adecuadas cada 24 horas como se ha descrito anteriormente.

25 Lo siguiente se ofrece como explicaciones hipotéticas para algunos de los efectos que se observan anteriormente; sin embargo, no se pretende que estas explicaciones sean limitantes. Una posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que MSM sea consumido por los organismos. Otra posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que la capacidad de MSM de producir la reversión de la sensibilidad podría deberse a la capacidad de MSM de transportar la metilina a las células MRSA. Otra posibilidad hipotética y no limitante para los resultados observados es que un nivel demasiado alto de MSM sea menos eficaz en determinados puntos temporales. Por ejemplo, esto puede deberse a la competición de una sobreabundancia de moléculas de
30 MSM libres que compiten con el MSM que se une con la metilina a concentraciones mayores. Esto haría que hubiera más MSM libre que penetra en las células que la metilina unida a MSM. Las concentraciones menores tienen un mayor porcentaje global de las moléculas de MSM totales en solución que se unen a la metilina, dejando que penetre más metilina unida en la célula ya que hay menos MSM libre para competir. Según esta hipótesis, para un número dado de moléculas de MSM que penetren en la célula MRSA, es importante la relación de MSM a metilina para obtener el efecto máximo. Si está presente una sobreabundancia de MSM, entonces la posibilidad de
35 moléculas de MSM no unidas a la metilina que penetran en la célula aumenta.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende metilsulfonilmetano (MSM) para su uso en un método de tratamiento de un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM al sujeto, en donde el tratamiento comprende:
- 5
- (a) inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármacos diferente de *Mycobacterium tuberculosis* en o sobre el sujeto en presencia de un fármaco al cual el patógeno es resistente, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama, o
- 10 (b) sensibilizar un patógeno bacteriano diferente de *Mycobacterium tuberculosis* en o sobre el sujeto a un fármaco al cual el patógeno es resistente, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama, o
- (c) inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármacos diferente de *Mycobacterium tuberculosis* en o sobre el sujeto desarrolle resistencia al fármaco, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama y en donde la composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico de beta-lactama.
- 15
2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para administración tópica.
3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición es para administración con un dispositivo inhalador.
- 20
4. Uso de metilsulfonilmetano (MSM) para:
- (a) inhibir un patógeno bacteriano resistente a fármacos diferente de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la superficie de un objeto físico, en presencia de un fármaco al cual el patógeno es resistente, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama, o
- 25 (b) sensibilizar un patógeno bacteriano diferente de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la superficie de un objeto físico a un fármaco al cual el patógeno es resistente, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama o
- (c) inhibir que un patógeno bacteriano sensible a fármaco diferente de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la superficie de un objeto físico desarrolle resistencia al fármaco, en donde el fármaco es un antibiótico de beta-lactama y en donde la composición comprende además una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico de beta-lactama.
- 30
5. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el uso comprende:
- 35
- seleccionar un patógeno bacteriano resistente a un antibiótico de beta-lactama; y
- poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico de beta-lactama que inhibe la forma sensible al antibiótico de beta-lactama del patógeno bacteriano resistente al antibiótico de beta-lactama, inhibiendo por tanto un patógeno bacteriano resistente al antibiótico de beta-lactama.
- 40
6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el uso comprende:
- 45
- seleccionar un patógeno bacteriano resistente a un antibiótico de beta-lactama; y
- poner en contacto el patógeno bacteriano con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM, sensibilizando por tanto el patógeno bacteriano resistente al antibiótico de beta-lactama al antibiótico de beta-lactama al cual el patógeno bacteriano es resistente.
- 50
7. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el patógeno bacteriano es *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.
8. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el uso comprende:
- 55
- seleccionar un patógeno bacteriano sensible a un antibiótico de beta-lactama; y
- poner en contacto el patógeno bacteriano sensible al antibiótico de beta-lactama con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de MSM y una cantidad terapéuticamente eficaz de un antibiótico de beta-lactama que inhibe el patógeno bacteriano sensible al antibiótico de beta-lactama, inhibiendo por tanto que el patógeno bacteriano sensible al antibiótico de beta-lactama desarrolle resistencia al antibiótico de beta-lactama.
- 60
9. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el patógeno bacteriano es *Staphylococcus aureus*.
- 65

10. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con cualesquiera reivindicaciones anteriores, en donde el antibiótico de beta-lactama es amoxicilina, ampicilina, epicilina, carbenicilina, ticarcilina, temocilina, azlocilina, piperacilina, mezlocilina, mecilinamo, sulbenicilina, penicilina benzatínica, penicilina G (bencilpenicilina), penicilina V (fenoximetilpenicilina), penicilina O (alilmercaptometilpenicilina), penicilina procaínica, oxacilina, meticilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, pivampicilina, hetacilina, becampicilina, metampicilina, talampicilina, co-amoxiclav (amoxicilina más ácido clavulánico) y piperacilina, una cefalosporina, un penemo, una monobactama, un carbapenemo, un inhibidor de la beta-lactamasa o una combinación de dos o más de los mismos.
- 5
11. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el antibiótico de beta-lactama comprende meticilina u oxacilina.
- 10
12. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad eficaz de MSM es de 5-20 % de MSM, 5-16 % de MSM, 5-10 % de MSM, 5-8 % de MSM, 9-16 % de MSM o 10-15 % de MSM, o es del 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 % de MSM, en donde el porcentaje es porcentaje en peso de la composición que comprende MSM.
- 15
13. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cantidad eficaz de MSM es del 5-10 % en peso de MSM.
- 20
14. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con cualesquiera reivindicaciones anteriores, en donde el patógeno bacteriano se pone en contacto con la composición durante 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 o 120 horas.
15. Una composición para su uso o el uso de acuerdo con cualesquiera reivindicaciones anteriores, en donde la composición comprende el 0-5 % de cloruro sódico.
- 25

FIG. 1

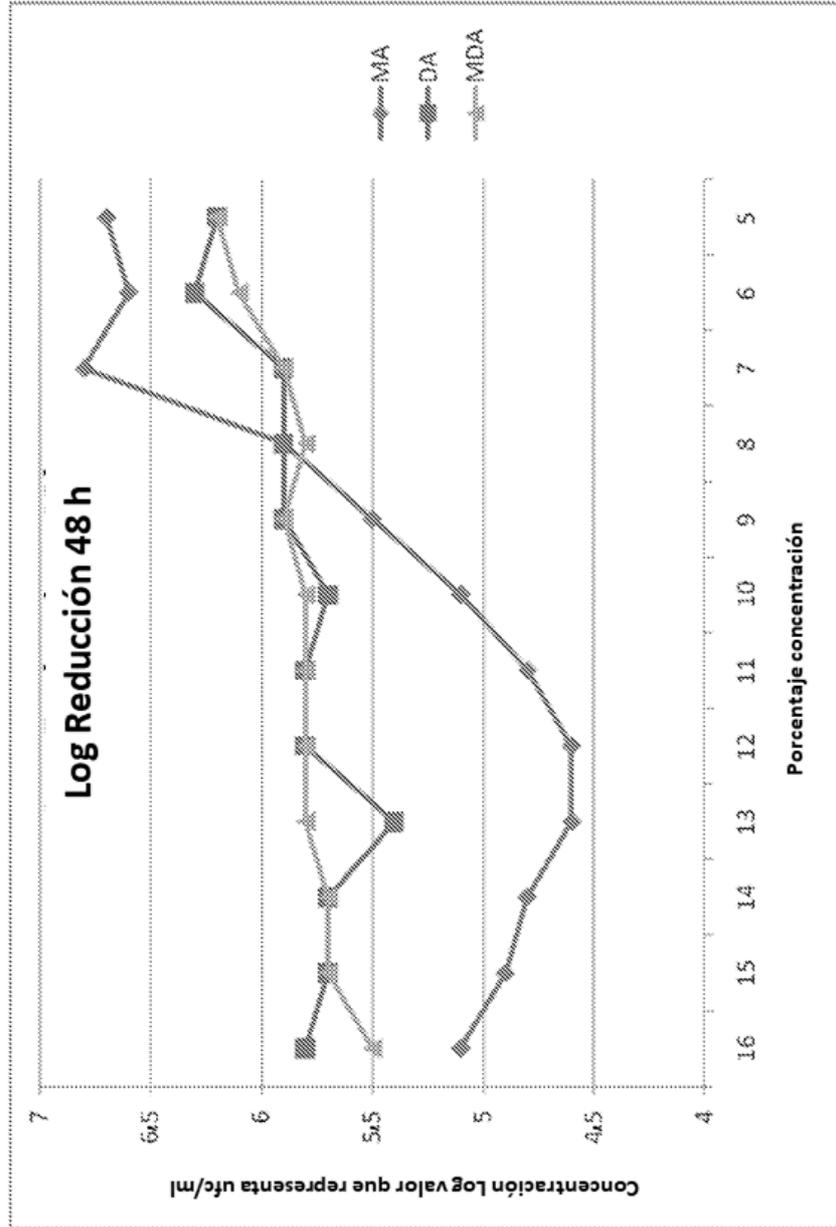


FIG. 2

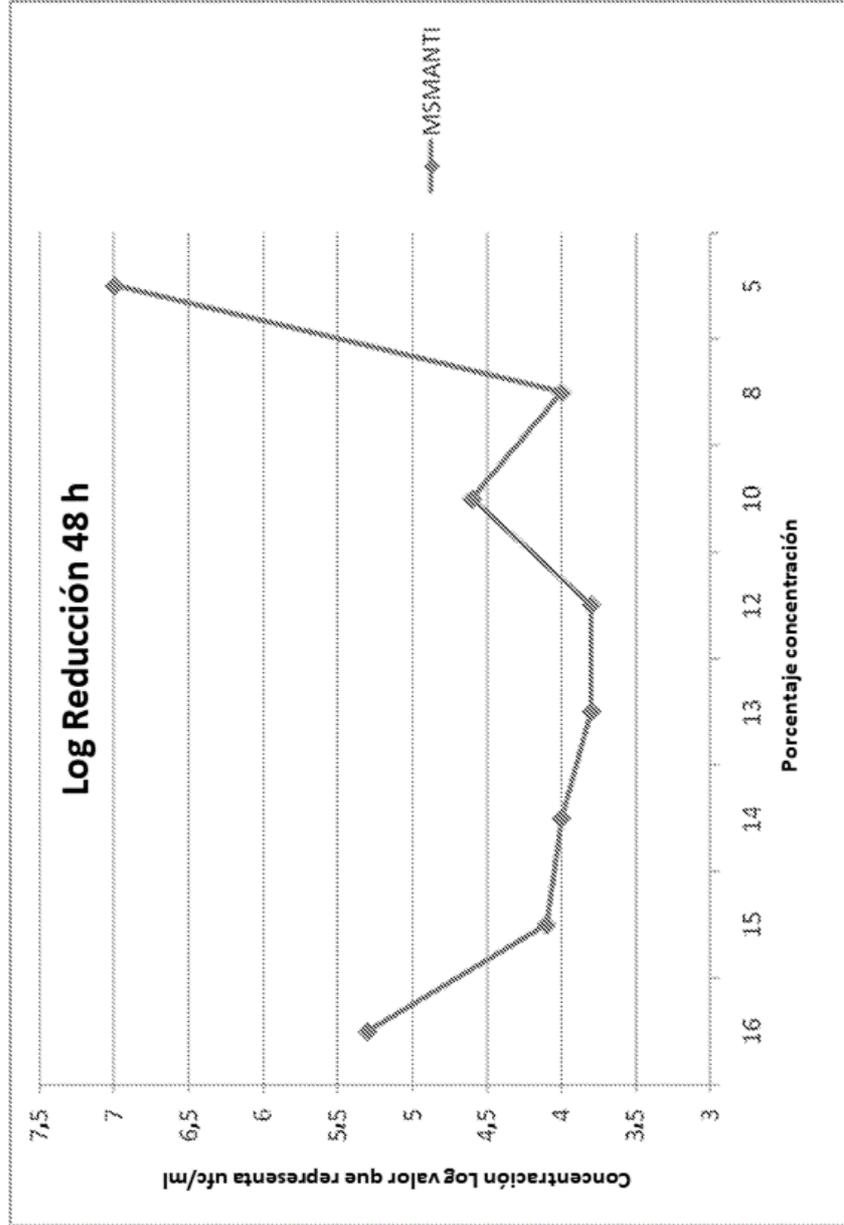


FIG. 3A

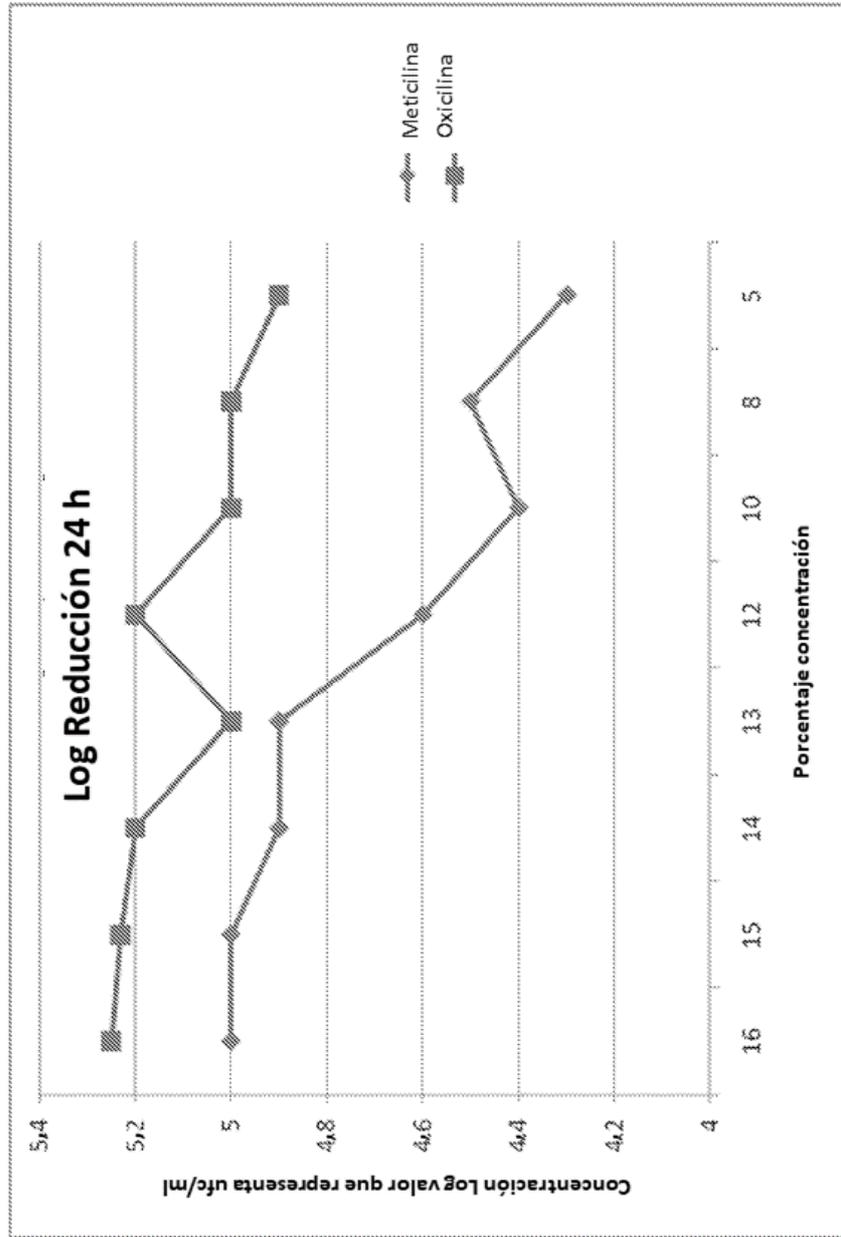


FIG. 3B

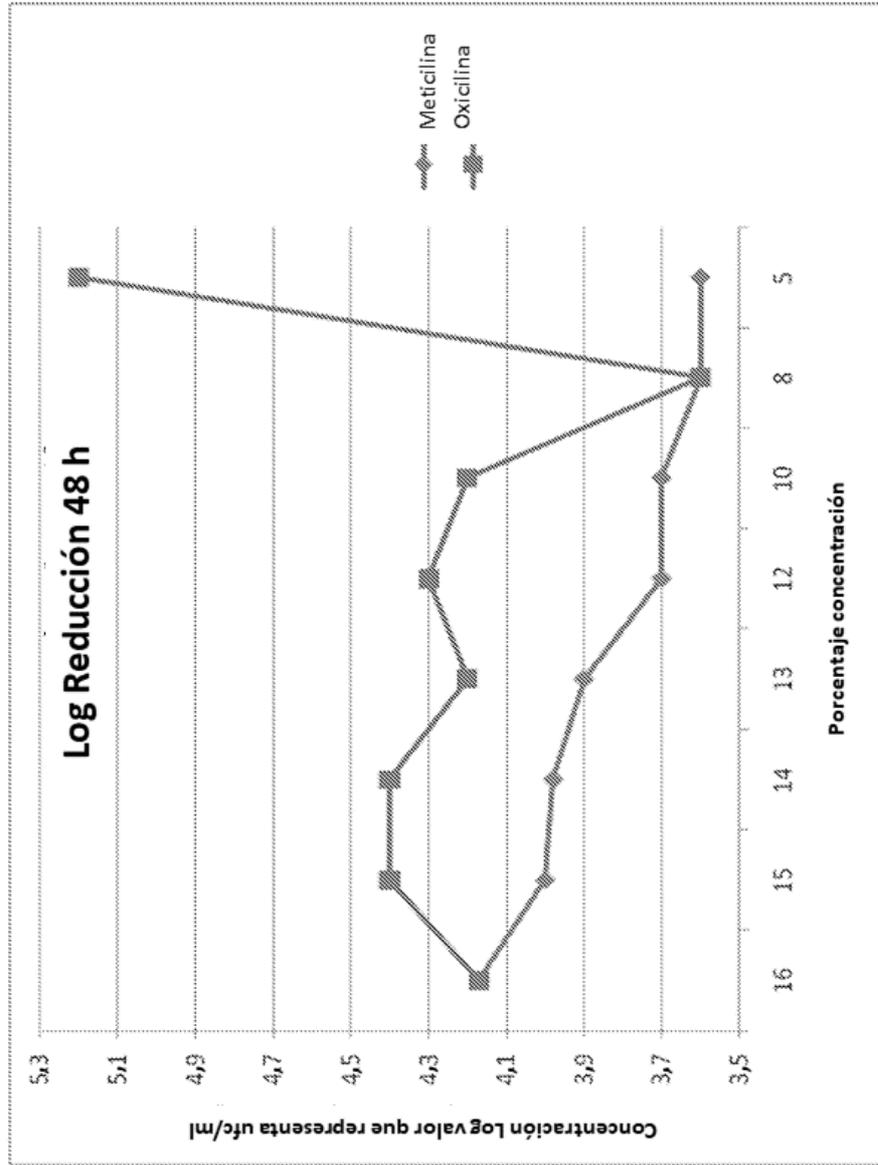


FIG. 3C

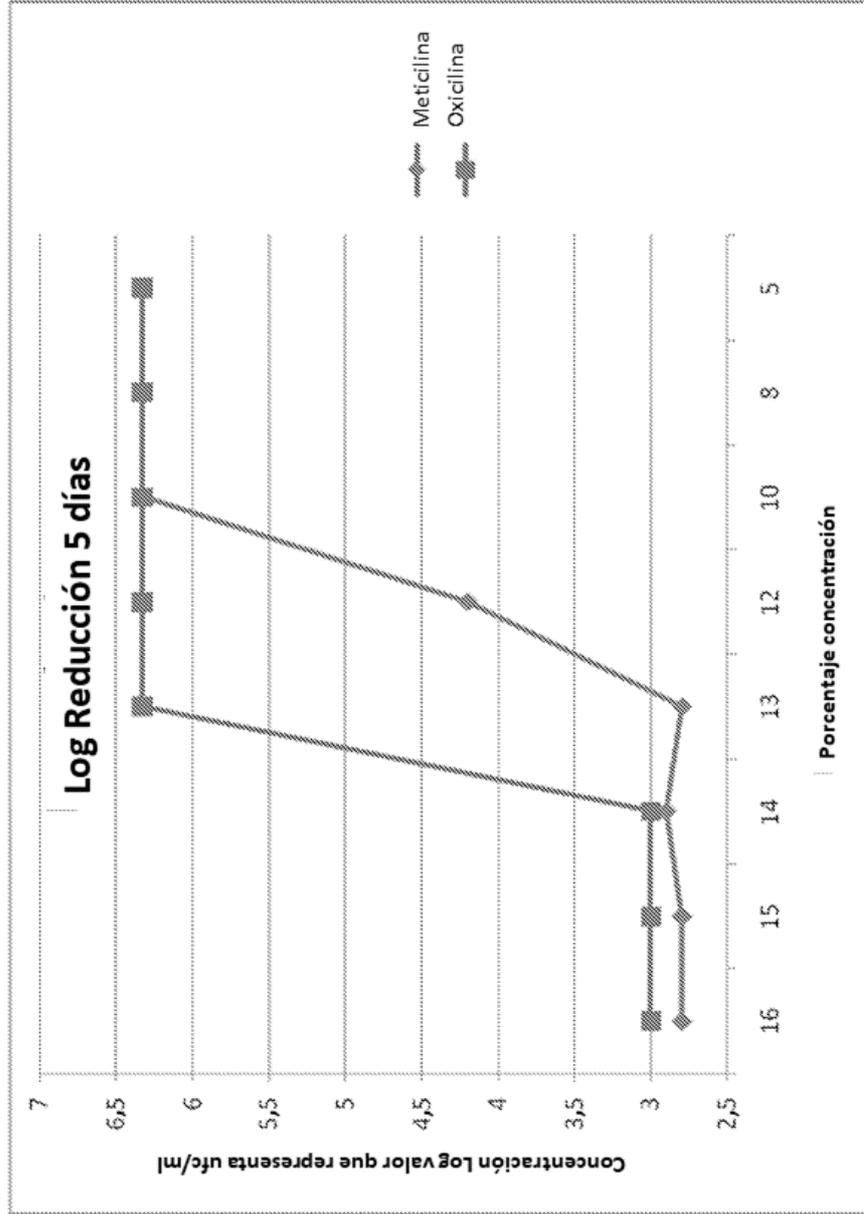


FIG. 4

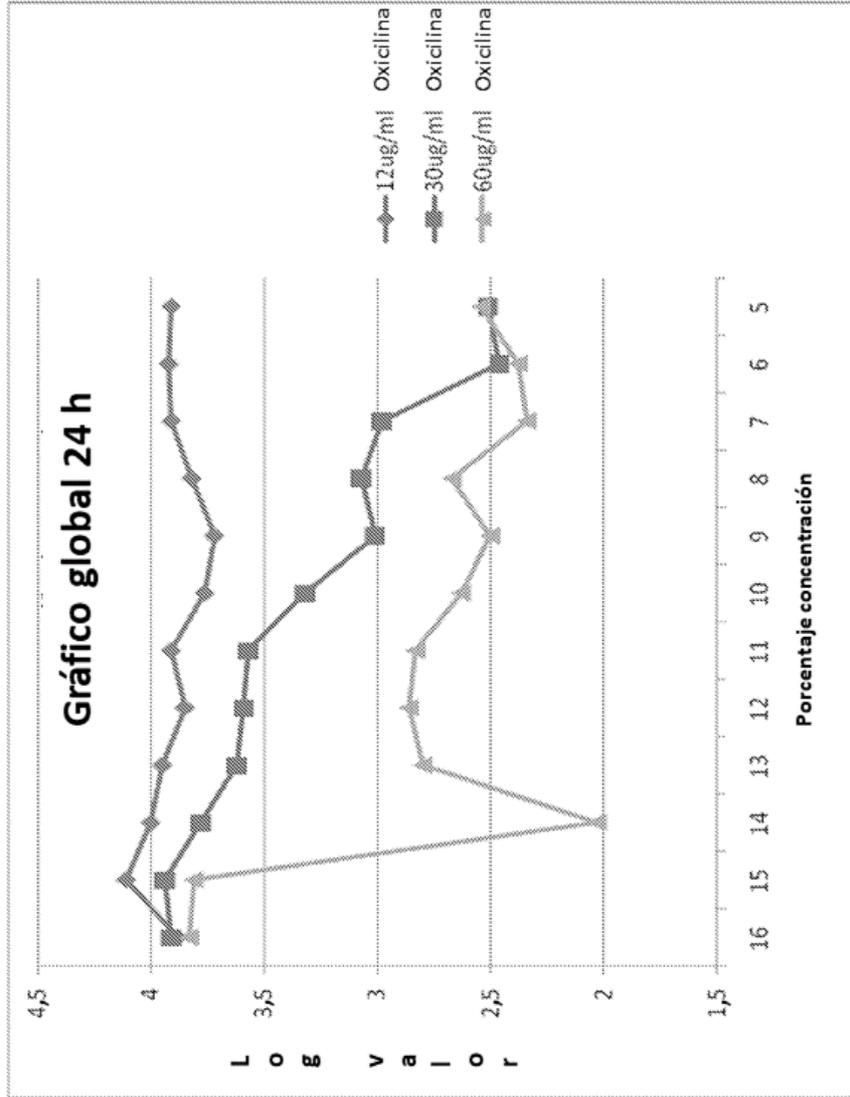


FIG. 5

