

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 090**

51 Int. Cl.:

A01N 55/00 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2006 PCT/US2006/020310**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2007 WO07008293**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2006 E 06813198 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 1898706**

54 Título: **Formulaciones biocidas basadas en selenio y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

24.05.2005 US 683847 P
23.05.2006 US 802670 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2018

73 Titular/es:

SELENIUM, LTD. (100.0%)
2508 Ashley Worth Blvd., Suite 200
Austin, TX 78738, US

72 Inventor/es:

REID, TED. W. y
SPALLHOLZ, JULIAN E.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 684 090 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

Formulaciones biocidas basadas en selenio y métodos de uso de las mismas

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere generalmente a formulaciones biocidas que utilizan la generación de radicales libres como un mecanismo de toxicidad, y más específicamente, a formulaciones basadas en selenio que utilizan la generación de radicales libres como un mecanismo de toxicidad.

2. Descripción de los antecedentes de la técnica

El selenio (Se) está entre los más tóxicos de todos los minerales conocidos. Sus síntomas de toxicidad en caballos fueron probablemente descritos por Marco Polo mientras viajaba por la ruta de la seda en China. En la década de 1920, la pérdida de ganado en partes de Estados Unidos central y occidental fue severa. Estas pérdidas de ganado fueron investigadas por la estación experimental del departamento de agricultura de los Estados Unidos de Dakota del Sur. En 1934, la estación experimental localizó la causa de la pérdida de ganado en el elemento selenio que era elevado en ciertos suelos y elevado secundariamente en plantas de varias especies de *Astragalus* (arveja), *Xylorrhiza* (aster arbolado), *Conopsis* (vara de oro) y *Stanleya* (pluma de príncipe). La ingestión de éstas y otras plantas que contienen Se por el ganado resultó a menudo ser fatal.

Durante el periodo de tiempo transcurrido entre el descubrimiento de la toxicidad del selenio en el ganado en 1934 y 1988, se establecieron muchas hipótesis para explicar el mecanismo por el que muchos pero no todos los compuestos eran tóxicos. Ninguna de estas teorías de la toxicidad del selenio resultó satisfactoria para explicar por completo por qué el selenio era tóxico. En 1989, Seko y colaboradores (In: Proceedings of the fourth international symposium on selenium and medicine (ed., Wendel, A.) pp. 70-73, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, (1989)), informaron que la selenita (SeO_3), una forma inorgánica del Se, reaccionaba con un tiol, glutatión (GSH), para producir superóxido (O_2^-). Ya que el superóxido es un tóxico conocido, esto planteó la posibilidad de que todos los compuestos de selenio que son tóxicos podrían generar superóxido. Mediante el ensayo de muchos compuestos de selenio, se encontró que los compuestos inorgánicos, SeO_3 y dióxido de selenio (SeO_2) podían generar O_2^- y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cuando se exponían a un tiol, tal como el glutatión, cisteína (CysSH), o ditiotreitól $\text{D}(\text{SH})_2$. Además, se encontró que todos los diseleniuros ensayados de la composición RSeSeR generarían igualmente O_2^- y H_2O_2 cuando se exponían a cualquiera de los tioles antes mencionados.

En 1947, Feigl y colaboradores (Analytical Chemistry, 19:351-353 (1947)), informaron que el selenio podría catalizar una reacción redox que involucra la oxidación del sulfuro. Esto pronto se convirtió en un ensayo común para el selenio utilizando azul de metileno. Esta reacción se estudió después por otros utilizando diferentes compuestos de selenio y tioles, demostrando la catálisis para algunos pero no para todos los compuestos de selenio. Véase, West y colaboradores (Analytical Chemistry, 40:966-968 (1968)); Levander y colaboradores (Biochemistry, 12:4591-4595 (1973)), Rhead y colaboradores (Biorganic Chemistry, 3:225-242 (1974)). La actividad catalítica del selenio de la selenocisteína (RSeSeR) en presencia de tioles se reportó en 1958. Ahora se cree que todas las reacciones anteriores de los compuestos de selenio producen superóxidos. Véase, Xu y colaboradores (Advances in Free Radical Biology and Medicine, 1:35-48 (1991)); Xu y colaboradores (Huzahong Longong Daxus Xuebao, 19:13-19 (1991)); Kitahara y colaboradores (Archives of toxicology, 67:497-501 (1993)); Chaudiere y colaboradores (Archives of Biochemistry and Biophysics, 296:328-336 (1992)).

Se sabe desde principios de la década de 1970 que el selenio y varios de sus compuestos poseen propiedades anticancerígenas. En general, se ha reconocido que la selenita y el dióxido de selenio son buenos agentes anticancerígenos *in vitro* y en animales de experimentación y que los compuestos son también citotóxicos tanto para células cancerígenas como normales *in vitro*. El documento de Patente U.S. Pat. No. 5,104,852 publicado por Kralick y colaboradores describe el uso de selenodiglutatión y otros selenoditioles de configuración (GSSeSG) para tratar el cáncer. El selenodiglutatión es el producto de la reacción entre selenita o dióxido de selenio con glutatión. El compuesto, selenodiglutatión, ha sido aislado. El documento de Patente U.S. Pat. No. 5,104,852, sin embargo, no describe el mecanismo de acción por el que el selenodiglutatión y compuestos similares son útiles en el tratamiento del cáncer.

En 1982, la interacción de la selenita y selenocisteína con glutatión en la citotoxicidad y lisis de las membranas de eritrocitos de ratas fue descrita por Hu y colaboradores (Biochemical Pharmacology, 32:857-961 (1983)). Esta citotoxicidad, como se reveló mediante microscopía electrónica de barrido de los eritrocitos de rata, provocó que las membranas de los eritrocitos se cubrieran con rebabas, las células se cuadruplicaran en tamaño y se lisaran de manera similar a la descrita por Kellogg y colaboradores (J. Biol. Chem., 252:6721-6728 (1977)). Esta toxicidad, sin embargo, no se expresó por la selenometionina, un compuesto que posee la configuración RSeSCH_3 . En 1991, un artículo de Yan y colaboradores (FASEB J., 5:A581 (1991)), mostró una toxicidad de dosis-respuesta de varios compuestos de selenio a una línea celular de tumor mamario humano.

Investigaciones adicionales que utilizan la quimioluminiscencia de la lucigenina y la quimioluminiscencia del luminol mostraron una dosis-respuesta en la quimioluminiscencia generada en O_2^- y H_2O_2 por la selenita, dióxido de selenio y todos los compuestos de selenio ensayados de configuración RSeSeR. Además, se encontró que los compuestos de selenio en presencia de células tumorales o glutatión producían solo superóxido y H_2O_2 . La quimioluminiscencia de las reacciones de lucigenina con O_2^- o luminol con H_2O_2 podía finalizarse mediante las enzimas nativas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CT) o glutatión peroxidasa (GSHPx). Las enzimas desnaturalizadas no finalizarían estas reacciones, confirmando la generación de los radicales libres (O_2^-) y H_2O_2 por los compuestos de selenio y tioles. Toda esta química de radicales libres de selenio ha sido revisada por Spallholz (Free Radical Biology and Medicine, 17:45-64, (1994)).

Un resumen de este gran conjunto de datos experimentales sobre la toxicidad del selenio, catálisis y actividad carcinostática es el siguiente:

1) Los compuestos de selenio, SeO_2 y SeO_3 , reaccionan con tioles para producir un selenoditiol de configuración (RSeSeSR). Este compuesto no es tóxico per se ni es carcinostático. La forma carcinostática tóxica de RSeR es el anión seleniuro reducido, RSe^- . Esta forma de selenopersulfuro del selenio es catalítica como se muestra por la inhibición tanto de la catálisis como de la generación de superóxido por el ácido iodoacético y el ácido mercaptosuccínico.

2) Los compuestos de selenio de configuración (RSeSeR) o (RSeSeR') reaccionan con tioles para producir el anión seleniuro reducido RSe^- o $R'Se^-$. Esta forma de selenopersulfuro del Se es catalítica como se muestra por la inhibición tanto de la catálisis como de la generación de superóxido por el ácido iodoacético y el ácido mercaptosuccínico.

3) Los catalizadores de selenio orgánico de configuración RSe^- , el anión selenopersulfuro, son catalíticos en presencia de tioles, y el RSe^- continúa generando ion superóxido (O_2^-) siempre que haya concentraciones suficientes de O_2^- y tiol en el medio. Los compuestos de selenio derivados de selenita y dióxido de selenio que reaccionan con glutatión (GSH) se convierten a selenio elemental (Se) como sigue; $SeO_3 (SeO_2) + 2GSH \rightarrow 2GSSeSG \rightarrow 2GSSG + Se^-$. El selenio elemental (Se^-) no es catalítico y no es tóxico.

4) Los compuestos de selenio de configuración RSe^- son tóxicos debido a la aceleración catalítica de la oxidación del tiol que produce O_2^- y H_2O_2 y el radical libre más tóxico, el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Esta química ha sido discutida por Misra (J. Biol. Chem., 249:2151-2155 (1974)) para la oxidación espontánea de tioles. La asociación de la catálisis rápida de tiol por compuestos de selenio de configuración RSe^- y la toxicidad a partir de la que se produjeron radicales libres y los productos de oxígeno reactivos tóxicos fue reconocida en 1992 por uno de los inventores.

El uso de selenio para el tratamiento del cáncer experimental en animales y el cáncer en humanos *in vivo* ha sido ampliamente descrito por muchos autores, tales como Milner y colaboradores ("Selenium and Transplantable tumors," (Spallholz, J. E., Martin, J. L., Ganther, H. E., eds) Selenium in Biology and Medicine, AVI Publishing Co. (1981)); Ip y colaboradores ("Relationship between the chemical form of selenium and anticarcinogenic activity," CRC Press, Inc., pp. 479-488 (1992)); Caffrey y colaboradores (Cancer Research, 52:4812-4816 (1992)); Schrauzer (Biol. Trace Elem. Res., 33:51-62 (1992)); y Yan y colaboradores (Biochemical Pharmacology, 45:429-437 (1993)). El uso de selenio como un agente citotóxico tanto para células normales como células cancerígenas *in vitro* para la inyección de selenodiglutatión dentro de una masa tumoral para destruir las células tumorales se ha descrito en el documento de Patente U.S. Pat. No. 5,104,852, publicado por Kralick y colaboradores. En el documento de Patente U.S. Pat. No. 4,671,958, Rodwell y colaboradores describieron muchos fármacos antibacterianos, 3 fármacos antivirales, 1 fármaco antifúngico, 7 fármacos antineoplásicos, 3 radiofármacos, 3 metales pesados y 2 antimicoplasmiales como fármacos para la administración mediada por anticuerpos. La farmacología para todos estos fármacos que se enumeran en la Tabla 1 del documento de Patente U.S. Pat. No. 4,671,958 se entiende generalmente. La Tabla 1 de la Patente de Rodwell y colaboradores no contiene selenio porque su acción farmacológica como generador de radicales libres de (O_2^-) y otras moléculas de oxígeno reactivas no se entendía o conocía en ese momento.

Los humanos y otros animales están en una constante batalla del sistema inmune con agentes de enfermedades infecciosas, tales como bacterias, virus, hongos patógenos y protozoos. Un problema particular para los profesionales de la salud que se ocupan de estos agentes infecciosos ha sido el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos, que son refractarias a muchos de los agentes antibióticos que inicialmente prometieron proporcionar una cura fiable.

Un problema particularmente crítico para la industria de la salud ha sido el desarrollo y propagación de infecciones dentro del entorno del hospital. Ya que los dispositivos médicos tales como catéteres intravasculares proporcionan un método para la administración de fluidos, medicamentos, y nutrientes a los pacientes, su uso está también frecuentemente asociado con las infecciones de propagación en el hospital; aproximadamente 50% de los pacientes del hospital requieren un acceso intravenoso, y aproximadamente 1-10% de los catéteres utilizados se contaminan finalmente. Las consecuencias de tal contaminación se extienden desde flebitis (inflamación venosa) a sepsis (una afección tóxica sistémica que resulta de la

propagación de un amplio cuerpo de bacterias y/o sus productos a través de la sangre desde el foco de infección).

5 Cintas adhesivas utilizadas junto con catéteres y otros dispositivos médicos son especialmente vulnerables a facilitar la propagación de tales infecciones en hospitales. Esto es porque generalmente no se lavan o esterilizan una vez que se han empaquetado, y, además, porque un solo rollo de cinta es utilizado generalmente por varios médicos y en muchos pacientes diferentes, y por lo tanto se expone a muchas personas diferentes. Además, dichos rollos adhesivos se manejan frecuentemente utilizando las manos sin
10 guantes y aplicadas en un estrecho contacto con el sitio de inserción intravascular durante periodos prolongados de tiempo. En efecto, un estudio encontró niveles sorprendentemente altos de bacterias infecciosas, incluyendo *Staphylococcus aureus*, en la capa exterior de los rollos de cinta médica (3M TRANSPORT™) que estaban en uso en todo un hospital en Toronto (véase Redelmeier y Livesley (1999) J. Gen. Int. Med., 14:373-5).

15 Como resultado de la preocupación pública generalizada preocupada con tales bacterias infecciosas, los materiales antimicrobianos tales como telas, fibras, polímeros e incluso juguetes de niños se han vuelto cada vez más populares. Si bien la demanda de tales artículos antimicrobianos es alta, relativamente pocos tipos de dichos artículos están disponibles, y no todos los que están disponibles son efectivos contra un amplio espectro de bacterias y son capaces de sostener la actividad antimicrobiana sin ser liberados al entorno o ser
20 químicamente inactivados gradualmente.

La investigación y desarrollo de fibras funcionales duraderas ha avanzado en los últimos años, incluyendo nuevos métodos para incorporar antibióticos como agentes bactericidas directamente en las fibras. La bibliografía química y médica describe muchos compuestos que tienen actividad antimicrobiana. Aunque el mecanismo de acción de estos microbianos varía, generalmente funcionan por una o más de las siguientes
25 maneras: inhibición de la síntesis o reparación de la pared celular; alteración de la permeabilidad de la pared celular; inhibición de la síntesis de proteínas; e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (DNA o RNA).

Al menos desde la década de 1870, se ha reconocido la plata como un agente antibacteriano, y se ha destacado especialmente por su capacidad para resistir el desarrollo de la resistencia al fármaco en bacterias
30 diana. En general, los cationes plata (Ag⁺) se piensa que poseen actividad antimicrobiana porque son estructuras químicas altamente reactivas que se unen fuertemente a grupos donadores de electrones que contienen azufre, oxígeno, o nitrógeno que están presentes en dianas microbianas. Las moléculas diana biológicas contienen generalmente todos estos componentes en forma de grupos tio, amino, imidazol, carboxilato, y fosfato. Los iones plata actúan por desplazamiento de otros iones metálicos esenciales tales como calcio o zinc. La unión directa de los iones plata al DNA bacteriano puede servir también para inhibir
35 varios procesos de transporte importante, tales como la captación de fosfato y succinato, y pueden interactuar con los procesos de oxidación celular así como con la cadena respiratoria. La velocidad de destrucción antibacteriana inducida por iones plata es directamente proporcional a las concentraciones de los iones plata, que actúan típicamente en múltiples dianas. De hecho, para que los artículos y dispositivos médicos basados en iones plata sean efectivos como vectores antimicrobianos, los iones plata con los que se impregnan se deben liberar lentamente en el entorno para que sean libres de entrar en contacto e inhibir el crecimiento de los
40 microbios destructivos en el entorno. En consecuencia, la actividad antimicrobiana de los artículos y dispositivos recubiertos con plata e impregnados con plata depende de la velocidad de liberación controlada de los iones de plata libres, no unidos que llevan, y la eficacia antimicrobiana continuada de dichos antimicrobianos basados en plata está necesariamente limitada por el suministro de iones plata libres que conservan.

Los trabajos previos del inventor, como se describe y se reivindica en los documentos de Patente US Patent Nos. 5,783,454; 5,994,151; 6,033,917; 6,040,197; 6,043,098; 6,043,099; y 6,077,714; todos publicados por Spallholz y colaboradores, describen métodos para preparar conjugados selenio-portador uniendo covalentemente (i) un compuesto de selenio orgánico seleccionado del grupo que consiste en RSeH, RSeR, RSeR', RSeSeR y RSeSeR', en donde R y R' son cada uno un resto alifático que contiene al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupos reactivos aldehído, amino, alcohólico, fosfato, sulfato, halógeno o fenólico y combinaciones de los mismos, a (ii) un vehículo que tiene un constituyente capaz de formar un enlace covalente con dichos grupos reactivos de dicho compuesto de selenio para producir un conjugado de selenio-portador que es capaz de unirse específicamente a un sitio diana. El portador puede ser una proteína, tal como un anticuerpo específico para una bacteria, virus, protozoo, o antígeno celular, que incluye sin limitación, antígenos de superficie celular, un péptido, carbohidrato, lípido, vitamina, fármaco, lectina, plásmido, liposoma, ácido nucleico o dispositivo implantable no metálico, tal como un implante
60 intraocular o una derivación vascular.

El documento de Patente '454 demuestra la citotoxicidad del selenofolato de configuración Folato-SeSeR, que produce superóxido en presencia de glutatión, según lo medido por quimioluminiscencia de lucigenina; este compuesto vitamínico modificado es citotóxico para las células tras la absorción de una manera dependiente
65

de la dosis. El documento de Patente '454 demuestra también la capacidad de la selenocistamina unida a plástico o una matriz de celulosa para inhibir el crecimiento celular.

5 Sin embargo, los conjugados de selenio-portador de la técnica anterior (como se muestra en las diversas patentes enumeradas anteriormente) requieren una unión covalente del compuesto de selenio a la molécula portadora para ser efectiva, y los grupos R y R' unidos al selenio deben ser grupos alifáticos. Además, los grupos salientes generados cuando se produce RSe⁻, como se muestra en la técnica anterior, son tóxicos. Por lo tanto, existe una necesidad de agentes biocidas sostenibles y efectivos que eviten la formación de microbios resistentes y que puedan adaptarse para su uso en soluciones, suspensiones y partículas encapsuladas, que superen las desventajas y defectos de la técnica anterior. Es a dichas composiciones biocidas mejoradas, y métodos de producción y uso de las mismas, a las que va dirigida la presente invención.

COMPENDIO DE LA INVENCION

15 La invención está basada, en parte, sobre el hallazgo de que los compuestos de selenio inorgánicos y orgánicos, que catalizan la formación de iones superóxido de radicales libres en presencia de oxígeno y un agente reductor tal como un grupo tiol reducido u otro donador de electrones, tienen actividad biocida cuando entran en contacto con especies de interés, tal como pero no limitado a, bacterias, virus, moho, hongos, parásitos de protozoos, células vegetales, células animales, materiales biológicos y combinaciones de los mismos. Aunque no se desea estar ligado a una única teoría de su mecanismo de acción biocida, dichos compuestos que contienen selenio parecen proporcionar daños mediados por el superóxido a especies diana de interés mediante la generación de iones superóxido (O₂⁻) de vida corta pero altamente reactivos en presencia de oxígeno (O₂) y grupos tiol reducidos (grupos SH) u otros grupos donadores de electrones (es decir, Cofactores tales como pero no limitados a, NADPH en reductasa dependiente de NADPH) presentes en las especies diana de interés en sí (por ejemplo, a partir de proteínas de membrana u otras fuentes reductoras presentes o próximas a las especies diana). En consecuencia, la invención proporciona un método para prevenir el crecimiento de una célula viva y/o un organismo vivo en un sustrato sólido que comprende las etapas de:

30 Proporcionar un sustrato sólido en donde el sustrato sólido no es un cuerpo humano o animal;

35 Aplicar una matriz polimérica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de selenio a una matriz sólida en donde el compuesto de selenio se selecciona del grupo que consiste en RSeH, RSeR, RSeR', RSeSeR, RSeSeR', y RSeX en donde R y R' son cada uno un resto alifático o fenólico, en donde R comprende un grupo reactivo que une el compuesto de selenio al sustrato sólido mediante la matriz polimérica y en donde X es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en un halógeno, una imida, un cianuro, una azida, un fosfato, un sulfato, un nitrato, un carbonato, y dióxido de selenio, en donde el compuesto de selenio no está asociado covalentemente con el sustrato sólido mediante la matriz polimérica y en donde el compuesto de selenio entra en contacto con y se une a una superficie de la célula viva y/o el organismo vivo, se forman el anión selenio Se⁻ y las especies de radical libre, las especies de radical libre inhiben y/o inactivan dicha célula viva y/o organismo vivo, impidiendo así el crecimiento de la célula viva y/o organismo vivo en el sustrato sólido, y en donde el anión selenio Se⁻ permanece unido a la superficie mediante la matriz polimérica después de la generación del anión selenio Se⁻ y las especies de radical libre, tal que el anión selenio puede generar continuamente especies de radicales libres adicionales cuando entran en contacto con células y/o organismos vivos adicionales.

50 El método de la presente invención se puede utilizar en un método para prevenir el crecimiento de especies de interés en un objeto o en una composición. El método incluye aplicar una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de selenio descritas anteriormente a un objeto o composición. En tales métodos, el compuesto de selenio está disponible para una superficie de la especie de interés para permitir la formación del anión selenio Se⁻ y las especies de radicales libres. El compuesto de selenio puede estar unido a los otros componentes de la composición de selenio por cualquier medio no covalente conocido por una persona experta en la técnica, o el compuesto de selenio puede estar simplemente presente en una mezcla o composición de solución.

55 En una realización del método de la presente invención, la cantidad efectiva del compuesto de selenio está en un intervalo de aproximadamente 0,01 µg a aproximadamente 100 µg de selenio elemental por centímetro cuadrado de área de superficie.

60 Es un objetivo de la invención proporcionar un nuevo agente bactericida y viricida. Es un objetivo adicional de esta invención proporcionar una metodología para el uso de la tecnología de radical libre anteriormente mencionada como agentes bactericidas y viricidas. El método de la presente invención proporciona un medio para dirigir la producción localizada de superóxido y especies derivadas del mismo para la destrucción o modificación selectiva de las células, tejidos, membranas o fluidos extracelulares para combatir una variedad de problemas localizados, de las infecciones, al cáncer, a la coagulación postquirúrgica y a la fibrosis.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con las figuras adjuntas y las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La Figura 1 muestra la destrucción bacteriana dirigida por selenio a 4°C.
 La Figura 2 muestra la supervivencia de bacterias que expresan el antígeno F1 a 4°C utilizando seleno-péptido 10 µM.
 La Figura 3 muestra el péptido de selenio que destruye la bacteria a 25°C y una concentración de seleno-péptido 10 µM.
- 10 Las Figuras 4A-4C muestran la concentración de selenofolato y los efectos del tiempo en la detección del cáncer de mama en células MDA-231 a las 24 horas, 72 horas y 120 horas.
 La Figura 5 demuestra la dosis-respuesta de células de cáncer de mama MDA-231 a selenita.
 La Figura 6 muestra los datos de tinción con fluoresceína a las 4 y 8 semanas. Datos presentados como la media ± el error estándar (SE).
- 15 La Figura 7A muestra el espesor del epitelio corneal como se registra con un paquímetro Corneo Gauge Plus en modo LK. Datos presentados como la media ± SE. La Figura 7B muestra el espesor corneal total como se registra con un paquímetro Corneo Gauge Plus en modo RK. Datos presentados como la media ± SE.
- 20 La Figura 8 muestra las micrografías electrónicas de córneas a bajo (2000x), medio (7000x), y alto (20.000x) aumento. Las barras de aumento en las 4 micrografías de la izquierda muestran 5 µm en las 2 micrografías de la derecha. Las córneas que utilizaron lentes tratadas (Se) están en la fila superior y las córneas que utilizaron lentes de control (No Se) están en la fila inferior.
 La Figura 9 contiene cortes histológicos de la córnea (tinción H&E - 230x). La córnea que utilizó lentes de control (No Se) está en la izquierda y la córnea que utilizó lentes tratadas con Se está en el lado de la derecha (Se).
- 25 La Figura 10 contiene micrografías electrónicas de bajo y alto aumento de lentes de contacto colocadas en un caldo inoculado con *P. aeruginosa*. Las lentes tratadas (S) están en la fila superior y las lentes de control (No Se) están en la fila inferior.
 La Figura 11 muestra la deposición total de proteínas en las lentes de control y tratadas. Los datos se presentan como la media ± SE.
 La Figura 12 muestra la deposición relativa de lípidos en las lentes de control y tratadas. Los datos se presentan como la media ± SE.
- 30 La Figura 13 muestra lentes de contacto después de cuatro días en caldo de división *Staphylococcus aureus*. A: lentes recubiertas de selenio; B: lentes de control.
- 35 La Figura 14 muestra el crecimiento del fibroblasto humano en presencia de esponjas tratadas y no tratadas con selenio.
 La Figura 15 muestra la capacidad del agente de unión modificado con selenio, AAEMA, para generar radicales superóxidos.
 La Figura 16 muestra la inhibición de HIV con un péptido con y sin selenio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- A menos que se defina lo contrario aquí, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con la presente invención tendrán los significados que comúnmente comprenden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán las pluralidades y los términos plurales incluirán las singulares. Generalmente las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, y proteínas y química e hibridación de oligo- o polinucleótidos descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para el DNA recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y describen a lo largo de la presente memoria. Véase por ejemplo, Sambrook y colaboradores Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) y Coligan y colaboradores Current Protocols in Immunology (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)), que se incorporan aquí por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de pacientes.

Como se utiliza de acuerdo con la presente descripción, los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, se entenderá que tienen los siguientes significados:

- 65 Los términos "unido covalentemente", "enlace covalente" y "unión covalente" como se utiliza aquí se entenderá que se refiere a un enlace químico estable entre dos átomos producido al compartir uno o más pares de

electrones. El enlace covalente es una forma intramolecular de enlace químico caracterizado por la compartición de uno o más pares de electrones entre dos componentes, produciendo una atracción mutua que mantiene la molécula resultante junta. Los átomos tienden a compartir electrones de tal manera que sus capas exteriores de electrones están llenas. Tales enlaces son siempre más fuertes que los enlaces de hidrógeno intermoleculares y similares en fuerza a o más fuertes que los enlaces iónicos. A diferencia del enlace iónico y metálico, el enlace covalente es direccional, es decir, los ángulos de enlace tienen un gran impacto en la fuerza del enlace. Debido al carácter direccional del enlace, los materiales unidos covalentemente son más difíciles de deformar que los metales.

Los términos “unido no covalentemente”, “enlace no covalente”, “interacciones no covalentes” y “unión no covalente” como se utiliza de acuerdo con la presente invención se entenderá que se refiere a cualquier método de unión que no implique una unión covalente. Un enlace no covalente es un enlace químico en el que, a diferencia de un enlace covalente, no se comparten electrones. Los enlaces no covalentes son relativamente débiles, pero pueden sumarse para producir interacciones fuertes, altamente específicas entre las moléculas.

Los enlaces no covalentes se refieren a una variedad de interacciones que no son covalentes en naturaleza entre moléculas o partes de moléculas que proporcionan la fuerza para mantener las moléculas o partes de moléculas juntas, normalmente en una orientación o conformación específica. Ejemplos específicos de interacciones no covalentes incluyen, pero no se limitan a, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals (como fuerzas de dispersión de London), enlaces dipolo-dipolo, y similares. “Enlace no covalente”, “interacciones no covalentes” y “fuerzas no covalentes” todos se refieren a estas fuerzas como un todo sin especificar o distinguir que fuerzas específicas están involucradas debido a que las interacciones no covalentes a menudo involucran varias de estas fuerzas trabajando en concierto. Los enlaces no covalentes son débiles por naturaleza y por lo tanto deben trabajar juntos para tener un efecto significativo. Además, la fuerza de los enlaces combinados es mayor que la suma de los enlaces individuales. Esto es porque la energía libre de los enlaces múltiples entre dos moléculas es mayor que la suma de las entalpías de cada enlace debido a efectos entrópicos.

El término “biocida” como se utiliza aquí se refiere a una sustancia química capaz de destruir diferentes formas de organismos vivos. Un biocida puede ser un pesticida, tal como pero no limitado a, fungicidas, herbicidas, insecticidas, alguicidas, moluscicidas, miticidas, y rodenticidas; o el biocida puede ser un antimicrobiano, tal como pero no limitado a, germicidas, antibióticos, antibacterianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, y antiparásitos.

El término “especies de interés” como se utiliza de acuerdo con la presente invención se refiere a cualquier célula (s) u organismo vivo que muere o se suprime cuando se expone a radicales libres. El término “especies de interés” incluye, pero no se limita a, procariotas tales como bacterias y arqueobacterias; virus; eucariotas tales como moho, hongos, parásitos de protozoos, células vegetales y células animales; y materiales biológicos tales como proteínas y nucleótidos. Ejemplos de procariotas incluyen, pero no se limitan a, bacterias tales como por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, y *Bacillus subtilis*. Ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, Poxvirus, Papilomavirus, Filovirus, Bornavirus, Mimivirus, Picornavirus, Adenovirus, Retrovirus, Paramyxovirus, Flavivirus, Parvovirus, Hepadnavirus, Calcivirus, y Ortomixovirus y Bacteriófagos; ejemplos virales específicos incluyen HIV, Rinovirus, Nilo occidental, Gripe, viruela y herpes simple. Ejemplos de parásitos incluyen, pero no se limitan a, parásitos artrópodos, parásitos helmínticos, parásitos protozoarios, y parásitos hematoprotozoarios; ejemplos específicos incluyen sarna demodéica, anquilostoma, y coccidios. Ejemplos de células eucarióticas incluyen, pero no se limitan a, células de fibroblasto, percebes, células epiteliales, y células cancerígenas, incluyendo pero no limitado a, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, leucemia, y linfoma.

Los términos “nucleótido” y “segmento de ácido nucleico” como se usan aquí significarán un nucleótido de origen genómico, cDNA, o sintético o alguna combinación de los mismos, y por lo tanto incluyen nucleótidos naturales y nucleótidos modificados. El término “proteína” como se refiere aquí significa una proteína de cDNA, RNA recombinante, u origen sintético o alguna combinación de los mismos. El término “polipéptido” como se utiliza aquí es un término genérico para referirse a una proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos, y análogos son especies del género polipeptídico.

El término “agente” se utiliza aquí para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

Como se utiliza aquí, los términos “etiqueta” o “etiquetado” se refieren a la incorporación de un marcador, por ejemplo, por incorporación de un aminoácido radiomarcado o por unión a un polipéptido de restos biotinilados que se pueden detectar con avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador puede ser también terapéutico. Varios métodos para etiquetar polipéptidos y glicoproteínas se conocen en la técnica y pueden utilizarse. Ejemplos de etiquetas para

- 5 polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánidos fósforos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de un par de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de enlace de metal, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, las etiquetas se unen mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.
- 10 El término “agente farmacéutico o fármaco” como se utiliza aquí se refiere a un compuesto o composición química capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra correctamente a un paciente. Otros términos químicos se utilizan aquí de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), incorporado aquí por referencia).
- 15 El término “agente antineoplásico” se utiliza aquí para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o progresión de un neoplasma en un humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.
- 20 Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapas, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.
- 25 Una “micela” es un agregado de moléculas de tensioactivo dispersas en un coloide líquido. Las micelas son a menudo de forma globular, pero son posibles otras formas, incluyendo elipsoides, cilindros, bicapas y vesículas. La forma de una micela se controla en gran parte mediante la geometría molecular de sus moléculas de tensioactivo, pero la forma de la micela depende también de las condiciones (tales como temperatura o pH, y el tipo y concentración de cualquier sal añadida).
- 30 El “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan el tratamiento incluyen a aquellos que ya padecen el trastorno y aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.
- 35 Un “trastorno” es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con las composiciones de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.
- 40 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular irregular. Ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de la glándula salival, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 45 Los “mamíferos” para fines de tratamiento se refieren a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, primates no humanos, y animales de zoo, deportivos, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.
- 50 El elemento no metálico selenio existe en varios estados de oxidación catalítico y no catalítico, *in vitro* e *in vivo*. Si están presentes en concentraciones suficientes de compuestos de tiol, los compuestos de selenio tales como seleniuros, RSe^- , oxidan tioles, produciendo superóxido (O_2^-) y otras especies de oxígeno biológicamente reactivas. El superóxido y los otros productos reactivos producidos, peróxido de hidrógeno, radicales tiol y otros radicales libres orgánicos son tóxicos para las membranas, las moléculas y las células biológicas. Cuando está presente en una concentración suficiente como el anión selenoseleniuro, RSe^- , el selenio puede detener y destruir las células normales, las células cancerosas, las células bacterianas, las células de levadura y los virus. Cuando los compuestos orgánicos de selenio se unen covalentemente a cualquier molécula diana tal como un anticuerpo mono- o policlonal, péptido o polipéptido, hormona, vitamina, fármaco, o dispositivo, tales conjugados comprenden una nueva clase de productos farmacéuticos y dispositivos que producen radicales libres. El selenio es excepcionalmente diferente de otros elementos que producen radicales libres, es decir, hierro, cobre o cobalto, en que el selenio puede formar fácilmente pequeños aductos que sustituyen al azufre y se combina covalentemente con compuestos de carbono e hidrógeno. Dichos aductos marcados con selenio de la química apropiada permanecerán no tóxicos hasta que se activen con tiol y la farmacología de radicales libres puede ser localizada molecularmente por la molécula portadora. Esta química de radicales
- 55
- 60
- 65

libres es también útil para ensayos competitivos de unión a proteínas. La química de radicales libres generada por compuestos de selenio se puede detectar por quimioluminiscencia o reducción de colorantes mediante un espectrofotómetro que proporciona la cuantificación de un compuesto que se une al anticuerpo, hapteno o fármaco al que se une el selenio y a lo que posteriormente reacciona con tioles.

La presente invención se refiere a composiciones de selenio de configuración RSeH, RSeR, RSeR', RSeSeR, RSeSeR', y más preferiblemente RSeX, para su uso como agentes biocidas. Cada uno de R y R' es un resto alifático que contiene al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupos reactivos aldehído, amino, alcohólico, fosfato, sulfato, halógeno, o fenólico y combinaciones de los mismos. X es un grupo protector que puede ser cualquier grupo aceptor de electrones conocido en la técnica; preferiblemente, X se selecciona del grupo que consiste en un halógeno, una imida, un cianuro, una azida, un fosfato, un sulfato, un nitrato, un carbonato, dióxido de selenio, y combinaciones de los mismos. Ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, R-Se-Cl, R-Se-Br, R-Se-I, R-Se-CN, R-Se-N₃, R-Se-O-R'', R-Se-S-R'', R-Se-PO₃-R'', R-Se-SO₃-R'', y similares, en donde R'' es H o un resto alifático. El grupo protector se puede eliminar una vez que se produce la composición de selenio y/o después de que la composición de selenio se dispone en una solución, suspensión o molécula encapsulada, o se une covalentemente. El grupo protector se puede eliminar *in vitro* o *in vivo*, si se produce un grupo no tóxico.

El conjugado Se-portador así producido se administra mediante inyección, ingestión o contacto cutáneo tópico y se transporta por medios fisiológicos normales a un sitio diana o una molécula diana, o se implanta quirúrgicamente en un sitio diana, después de lo cual se genera superóxido (O₂⁻) cuando el conjugado Se-portador reacciona con tioles endógenos en la superficie del tejido local, bacteria, virus, protozoos diana u otros compuestos diana. La toxicidad del selenio producida por la composición RSe- está muy localizada ya que requiere que una superficie de una especie de interés esté disponible para la interacción con el anión RSe-. R y R' se seleccionan cada una del grupo que consiste en restos alifáticos que contienen uno o más grupos reactivos aldehído, carboxílico, amino, alcohólico, fosfato, sulfato, halógeno o fenólico, y combinaciones de los mismos, tales como -(CH₂)_nHN₂, -(CH₂)_nCOOH, -(CH₂)_n-Φ, en donde n es un número entero mayor de 1, y preferiblemente entre aproximadamente 1 y 50, y más preferiblemente entre aproximadamente de 3 a 5. R y R' pueden ser el mismo o diferente. Los propios grupos R no tienen un papel real en el método de la invención, aparte de proporcionar grupos reactivos para unirse al portador y proteger el selenio hasta que alcance los sitios diana. En consecuencia, la longitud de la cadena alifática no es importante. El peso molecular preferido del compuesto es aproximadamente 1.000 o menos, pero pesos moleculares mayores serán adecuados. Ejemplos representativos de compuestos de selenio incluyen, pero no se limitan a NH₂CH₂CH₂SeCH₃ (RSeR'), NH₂CH₂CH₂SeCH₂CH₂NH₂ (RSeR), NH₂CH₂CH₂SeSeCH₂CH₂NH₂ (RSeSeR), NH₂CH₂CH₂SeSeCH₂CH₂NH-celulosa (RSeSeR'), y NH₂CH₂CH₂SeCN (RSeX). Se prefiere la configuración RSeX. Estos compuestos de selenio, cuando entran en contacto con el tiol y oxígeno, pueden generar superóxido (O₂⁻), H₂O₂ o radical hidroxilo (OH) o cualquier otra especie de oxígeno reactivo. Los tioles pueden ser tioles exógenos añadidos por ejemplo, a un inmunoensayo competitivo, tioles endógenos encontrados en membranas, citoplasma celular o fluidos extracelulares. Si los tioles nativos son insuficientes, se pueden utilizar expresamente para la generación de superóxido glutatión suministrado exógenamente, derivados de glutatión, cisteína u otros tioles u otras moléculas o átomos donadores de electrones. Las composiciones de selenio de la presente invención se pueden utilizar para tratar, en una manera farmacológica, cáncer, tanto primario como metastásico; infecciones y enfermedades causadas por (i) todos los virus de origen vegetal, animal o humano; (ii) todas las bacterias de origen vegetal, animal o humano; (iii) todos los protozoos de origen vegetal, animal o humano; y (iv) otros patógenos. Las composiciones de selenio de la presente invención, por ejemplo, cuando esté disponible para una superficie del virus, bacteria, protozoo o células cancerosas, catalizará la producción del superóxido, H₂O₂ y otras especies de oxígeno reactivas. Los virus tienen proteínas de superficie a las que las composiciones de selenio de la presente invención pueden aproximarse. El selenio reacciona con tioles en esas proteínas de superficie para generar el superóxido en la superficie del virus. La falta de un mecanismo de absorción en el virus no es importante ya que el daño se hace en la superficie del virus.

Los compuestos de selenio utilizados en la presente invención se pueden unir no covalentemente a la matriz polimérica tal como una almohadilla de celulosa, almohadilla de proteína, otra almohadilla de carbohidrato, plástico u otra matriz polimérica o una matriz biocompatible para el fin de generar superóxido (O₂⁻) y sus especies reactivas de oxígeno derivadas cuando están disponibles para una superficie de una especie de interés. El dispositivo no sería metálico, pero puede ser un compuesto organometálico o un metal recubierto con un organo compuesto al que se puede unir el compuesto de selenio. El selenio unido no covalentemente a la matriz insoluble inhibe el crecimiento celular en el área localizada de la matriz debido a la generación localizada de superóxido.

En otra alternativa, los compuestos de selenio de la presente invención se pueden suspender en una composición. Ejemplos de composiciones en las que los compuestos de selenio de la presente invención se puedan suspender incluyen, pero no se limitan a, revestimientos, resina epoxídica, pegamentos, masillas, emulsiones, y similares. Ejemplos específicos incluyen revestimientos de matrices, pinturas, adhesivos, cohesivos, LOCTITE(TM), superpegamento, pegamento de uñas, crema de manos, y similares.

En otra alternativa, los compuestos de selenio de la presente invención se pueden encapsular en nanopartículas y/o sistemas de administración de fármacos. Ejemplos de composiciones en las que los compuestos de selenio de la presente invención se puedan encapsular incluyen, pero no se limitan a, SWNTs, polímeros, liposomas, vesículas, micelas, y similares.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir el crecimiento de especies de interés a través del contacto de un sujeto con una matriz polimérica que comprende una composición de selenio de fórmula R-Se-X, como se describió aquí en detalle, en donde la composición de selenio comprende un compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación de los mismos, capaz de generar radicales superóxidos en presencia de una especie de interés. Los radicales superóxidos generados por el compuesto de selenio inorgánico u orgánico inhiben o inactivan un agente de la especie de interés y de este modo tratan o previenen el crecimiento de la especie de interés en o sobre el sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir el desarrollo o transmisión de una especie de interés en o sobre un sujeto a través del uso de una matriz polimérica que comprende una composición de selenio de fórmula R-Se-X, como se describió aquí en detalle, en donde la composición de selenio comprende un compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación de los mismos, capaz de generar radicales superóxidos en presencia de una especie de interés. El método implica proporcionar la composición biocida capaz de generar radicales superóxidos en presencia de un agente infeccioso, y aplicar una cantidad efectiva de la composición biocida al sujeto. Los radicales superóxidos generados por el compuesto de selenio inorgánico u orgánico inhiben o inactivan las especies de interés y de este modo tratan o previenen el crecimiento o transmisión de las especies de interés en el sujeto.

En un aspecto adicional, la invención proporciona matrices poliméricas que tienen, en al menos una superficie de la misma, una cantidad efectiva de un compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, capaz de generar radicales superóxidos en presencia de una especie de interés o un compuesto de tiol reducido u otro grupo donador de electrones. El compuesto de selenio inorgánico u orgánico puede asociarse covalentemente o no covalentemente con la composición, y una cantidad efectiva del compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, se retiene en o está disponible para una superficie de la composición cuando la composición está en contacto con un sujeto.

En realizaciones particularmente útiles de las composiciones biocidas de la invención, la cantidad efectiva del compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, que se retiene en o está disponible para la superficie de la composición cuando dicha composición está en contacto con el sujeto es suficiente para inhibir o inactivar un agente de una enfermedad infecciosa u otra célula(s) no deseada(s).

En otras realizaciones, el compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, no comprende un grupo tiol o un compuesto que contiene tiol. En realizaciones particulares, el compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, no comprende glutatión.

En realizaciones particulares adicionales, el compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, se asocia no covalentemente con la composición biocida. En otras realizaciones, el compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, se asocia covalentemente con la composición biocida.

En realizaciones particularmente útiles, al menos aproximadamente la mitad del selenio elemental del compuesto de selenio inorgánico u orgánico, o una formulación del mismo, existe en un estado activado que es capaz de generar radicales superóxidos en la composición biocida. En realizaciones particulares adicionales, la composición biocida tiene entre aproximadamente 0,01 μg y aproximadamente 100 μg de selenio elemental por centímetro cuadrado de área de superficie. En realizaciones adicionales útiles, la composición biocida tiene entre aproximadamente 1 μg y aproximadamente 10 μg de selenio elemental por centímetro cuadrado de área de superficie. En otras realizaciones particulares adicionales, la composición biocida tiene entre aproximadamente 5 μg y aproximadamente 6 μg de selenio elemental por centímetro cuadrado de área de superficie.

En general, la invención proporciona compuestos de selenio inorgánicos u orgánicos, formulaciones de los mismos, y composiciones biocidas que llevan selenio asociado y métodos para el uso de los mismos para tratar o prevenir un agente de una enfermedad infecciosa tal como una bacteria, un virus, un hongo, o un protozoo, o tratar o prevenir el crecimiento de células no deseadas. Los detalles del mecanismo químico propuesto de la formación del superóxido por el selenio, y la participación propuesta del selenio en la toxicidad y la actividad carcinostática *in vivo*, ha sido reseñada por Spallholz ((1994) Free Radical Biology & Medicine 17:45-64), cuyo contenido se incorpora aquí por referencia en su totalidad. De acuerdo con la presente invención, un resto alifático o aromático se puede utilizar como el grupo R en el compuesto de selenio R-Se-X, siempre que el compuesto de selenio sea capaz de generar superóxido al reaccionar con los grupos sulfhidrilos.

El método de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento de varias superficies y soluciones para inhibir el crecimiento de microorganismos y otras células no deseadas al respecto. En consecuencia, como un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método para inhibir el crecimiento de microorganismos sobre una superficie, o en un líquido, comprendiendo el método tratar la superficie o el líquido con una composición biocida como se definió aquí anteriormente. Las composiciones biocidas de la presente invención se pueden utilizar en cualquier afección en la que los microorganismos u otras células no deseadas crezcan y causen problemas tales como, por ejemplo, pero no a modo de limitación, en entornos acuosos incluyendo pero no limitado a, sistemas de agua de refrigeración, licores de fábricas de papel, fluidos de trabajo de metal, lubricantes de perforación geológica, emulsiones poliméricas, pinturas de emulsión y similares. Las composiciones biocidas de la presente invención se pueden utilizar también para impregnar materiales sólidos o se pueden recubrir sobre las superficies de las mismas directamente o incorporadas en una pintura, barniz o laca que se dispone después en la superficie del material sólido. Las composiciones biocidas de la presente invención se pueden utilizar también para inhibir el crecimiento de microorganismos en entornos de agricultura y horticultura, tales como pero no limitados a, plantas vivas, semillas, y similares.

Ejemplos de aplicaciones del uso de las composiciones biocidas en la presente invención son en particular, pero no limitado a, revestimientos superficiales, pinturas protectoras, y otros revestimientos en los siguientes: techos, sótanos, paredes, fachadas, invernaderos, protección solar, vallas de jardín, protección de madera, material del techo de tienda, telas; sanitario: servicios públicos, baños, cortinas de baño, artículos de tocador, piscinas, saunas, juntas, compuestos de sellado; requisitos para la vida diaria, máquinas, cocinas, artículos de cocina, esponjas, productos recreativos para niños, envases para alimentos o bebidas, procesamiento de leche, sistemas de agua potable, cosméticos; partes de máquinas: sistemas de aire acondicionado, intercambiadores de iones, agua de proceso, unidades de energía solar, intercambiadores de calor, biorreactores, membranas; tecnología médica: lentes de contacto, vendajes, pañales, membranas, implantes; artículos de consumo: asientos de automóviles, ropa (calcetines, ropa deportiva y similares), equipos hospitalarios, tiradores de puertas, teléfonos, transportes públicos, jaulas de animales, cajas registradoras, alfombras, fondos de escritorio; cascos de barcos, muelles, boyas, plataformas de perforación, construcción de tanques de agua de lastre; y similares.

Otros usos específicos para los que las composiciones biocidas de la presente invención son adecuadas incluyen, pero no se limitan a, jabón, champú, medicamentos para el cuidado de la piel, pintura, o incorporados en o sobre plástico o fibras tejidas o no tejidas, cuando se formulan para contener el compuesto de Se requerido. Las composiciones biocidas de la presente invención son particularmente útiles en la forma de pinturas, incluyendo pero no limitado a, pinturas de interiores y exteriores para el hogar; pinturas industriales y comerciales; pinturas marinas para uso, por ejemplo, en los cascos de los barcos; y para uso como un conservante "en lata" durante el almacenamiento de cualquiera de las pinturas enumeradas anteriormente y antes del uso de dicha pintura. La composición de pintura que contiene la composición biocida de la presente invención se puede utilizar como una pintura para materiales naturales o sintéticos, por ejemplo, madera, papel, metales, textiles y plásticos.

Otro uso significativo para las composiciones biocidas de la presente invención es como un adhesivo para baldosas de látex que contienen típicamente, por ejemplo, además del componente biocida, una emulsión de látex, una emulsión de colofonia opcional, un plastificante opcional, un antioxidante opcional, y un pigmento o relleno opcional (tal como carbonato de calcio). Otro uso significativo para la composición biocida de la presente invención es como masilla de látex, que contiene típicamente, además del componente antimicrobiano, un látex acrílico, un tensioactivo no iónico, un dispersante, un plastificante opcional, y un pigmento o relleno opcional (tal como carbonato de calcio). Además, las composiciones biocidas de la presente invención se pueden utilizar también como un aditivo para recubrimientos de superficies en el sector marítimo, en particular para la eliminación de las larvas de percebes en los cascos de los barcos, y en general como un aditivo en pinturas antiincrustantes, particularmente en agua de mar en la que hay sal, y como inhibidor de bioincrustaciones en circuitos de refrigeración.

La presente invención proporciona también el uso de las composiciones biocidas de la presente invención para producir productos de higiene o artículos para tecnología médica. Ejemplos de productos de higiene de este tipo incluyen, pero no se limitan a, cepillos de dientes, asientos de inodoros, peines, vendas, materiales de embalaje, así como cualquier artículo que pueda entrar en contacto con mucha gente, por ejemplo pero no a modo de limitación, auriculares de teléfonos, barandillas, tiradores de puertas, pestillos de ventanas, y también correas de agarre y asas de agarre en transportes públicos. Ejemplos de artículos para tecnología médica incluyen, pero no se limitan a, vendas, catéteres, tubos, películas protectoras o de refuerzo, instrumentos quirúrgicos, similares.

El método de la presente invención es útil, en cualquiera de las variedades de aplicaciones descritas aquí, como desinfectantes y conservantes, en forma líquida o sólido extendible, solo o en combinación con un portador inerte tal como agua, hidrocarburos líquidos, etanol, isopropanol, o similares. Se pueden emplear utilizando procedimientos convencionales para controlar las bacterias y hongos en diversos sustratos, y se

pueden aplicar a organismos bacterianos u hongos o sus sustratos en una cantidad antimicrobiana por procedimientos convencionales tales como pulverización, inmersión, empapamiento, impregnación, y similares.

5 Los compuestos de selenio que se utilizan en la presente invención son solubles en muchos disolventes polares, aunque la solubilidad depende de la naturaleza del grupo(s) R del compuesto de selenio. Sin embargo, muchos de los compuestos de selenio son solubles en agua, alcoholes, éteres, cetonas y otros disolventes polares o mezclas de los mismos.

10 La composición biocida se puede incorporar en el medio que se va a proteger utilizando cualquier técnica de mezclado adecuada. Se apreciará que la cantidad de la composición biocida requerida dependerá de varios factores tales como el medio que se va a proteger, los microorganismos contra los que se desea la protección, y el grado de protección requerido.

15 Si la composición biocida de la presente invención se va a utilizar para conservar un sustrato sólido, la composición se debe aplicar directamente al sustrato o se debe incorporar en una composición de recubrimiento tal como pero no limitada a una pintura, barniz o laca que se aplica después al sustrato. Alternativamente, el material sólido se puede impregnar con la composición biocida de la presente invención.

20 EJEMPLOS Y TÉCNICAS

Técnica 1: Método para la micro determinación Fluorométrica de selenio

Este ejemplo describe el ensayo basado en fluorescencia utilizado para medir la cantidad total de selenio en una muestra.

25 Solución de selenio estándar: una solución madre de Se (1 mg Se/ml) se preparó disolviendo 109,5 mg de selenita de sodio (Peso Molecular: 172,9) en 50 ml de agua de grado analítico. A partir de esta solución madre, soluciones de Se estándar de 1µg Se/ml y otras se prepararon por dilución.

30 Mezcla de digestión: 225 ml de ácido sulfúrico concentrado se añadió lentamente a 225 ml de agua de grado analítico, y se añadieron 300 ml de ácido perclórico al 70-72%.

35 Solución de diaminonaftaleno: la solución de diaminonaftaleno (DAN) se preparó justo antes de su uso disolviendo 75 mg de 2,3-diaminonaftaleno en 75 ml de solución ácida de DAN (preparada añadiendo lentamente 150 ml de ácido sulfúrico a 850 ml de agua de grado analítico). La solución resultante se transfirió a un embudo de separación, y la solución de DAN se lavó con ciclohexano de grado HPLC con vigorosa agitación. Después de dejar tiempo para la separación de las fases, la fase superior se ensayó con un medidor de fluorescencia hasta que se alcanzó una lectura menor o igual a 0,2. La fase inferior se recogió después para su uso inmediato.

40 Solución EDTA de disodio: una solución de EDTA 0,008 M se preparó disolviendo 2,98 g del hidrato del ácido etilendiaminotetraacético de disodio en 1 L de agua de grado analítico.

45 Muestra de digestión: una cantidad deseada de la muestra se añadió a un tubo de ensayo de 25 x 200 mm, seguido por 3 ml de mezcla de digestión y 2-3 perlas de vidrio (4 mm). Las muestras se digirieron sobre un mechero bajo una campana de ácido perclórico. Se añadió 4 ml de EDTA a cada muestra. En este momento todas las muestras eran, y deberían ser, incoloras (de otra manera la digestión es incompleta). El pH se ajustó entonces a 2,0-2,2 utilizando hidróxido de amonio o ácido sulfúrico.

50 Ensayo de fluorescencia: 4 ml del reactivo DAN recién preparado se añadió a cada muestra. La solución resultante se mezcló bien, y se incubó en un baño de agua a 50°C durante 30 minutos. Después de la incubación, los tubos se enfriaron durante 5 minutos, y después se añadieron 4 ml de ciclohexano y el tubo se mezcló bien. La capa superior (complejo 4,5-benzopiazselenol) se cuantificó entonces con un medidor de fluorescencia con la excitación medida a 363 nm y la emisión medida a 525 nm.

55 Contenido de selenio: La solución estándar se utilizó para construir la curva de contenido de selenio frente a las lecturas de fluorescencia. Luego, basándose en la lectura de la muestra, podría extrapolarse de la curva estándar el contenido de selenio correspondiente.

Técnica 2: Ensayo de quimioluminiscencia (CL)

60 Este ejemplo describe el ensayo basado en la quimioluminiscencia utilizado para medir la cantidad de selenio reactivo disponible en una muestra para la formación del superóxido dependiente del tiol. El ensayo combinado de quimioluminiscencia (CL) de control sin sustratos o GSH se realizó utilizando un tampón fosfato de sodio 0,05 M (pH 7,0) y 20 µL de lucigenina/ml de una solución madre de 1,0 mg/ml de lucigenina en agua destilada. El ensayo combinado con tiol contenía 1,0 mg GSH/ml. A 600 µL de alícuotas del ensayo de control o del combinado de ensayo que contiene tiol se añadió L-selenometionina o L-Se-Metil-selenocisteina a 2,0 mg/ml, y otras concentraciones de sustrato se realizaron por dilución con tampón que contenía lucigenina. De igual

manera, D,L-selenoetionina se añadió a 4,0 mg/ml al combinado CL. A los combinados CL de control o que contienen sustrato en el luminómetro se añadió metioninasa que contenía 0,5 U de actividad enzimática o unidades graduadas de actividad metioninasa. La metioninasa se preparó añadiendo 1,0 o 2,0 ml de agua destilada a viales de 10 U de enzima comercial liofilizada. Los servicios técnicos de Waco informaron que la metioninasa no contenía el conservante de tiol reductor. La enzima se añadió en incrementos de 0,1 ml desde una jeringa de 1,0 cm³ hasta 30 µl de una pipeta Eppendorf directamente al tubo quimioluminiscente en un luminómetro Los Alamos Diagnostics Model 535 que contenía 600 µl del combinado de pH 7,0. El contenido del tubo de CL se mantuvo a 36,8°C mediante un baño de agua de recirculación LKB 2209 multitemperatura. Los datos de quimioluminiscencia (CL) se registraron en unidades integradas de 30 s durante un periodo de hasta 20 min. Hubo un retraso instrumental de 3 s entre integraciones. Detalles adicionales de este ensayo, incluyendo la finalización de la quimioluminiscencia generada por el metilselenol a partir del ácido metilselenínico reducido y dimetildiseleniuro por la superóxido dismutasa, han sido previamente reportados. Este ensayo (CL) es cuantitativo (coeficiente de correlación, %r 0:99; P < 0:001) en la generación de CL para pequeñas cantidades de metilselenol ciclo redox. Una curva estándar para la CL producida de metilselenol (CH₃SeH) (unidades CL relativas frente a la concentración de selenio) a partir de la reducción del dimetildiseleniuro por GSH cuando se añadió directamente al combinado CL, puede utilizarse para facilitar la cuantificación de las muestras experimentales.

Técnica 3: Contenido de selenio y análisis de la actividad de superóxido para el recubrimiento de vendas
 A 150 g de una muestra estándar de una formulación cohesiva sin látex (Andover Coated Products, Inc., Salisbury, MA), se añadieron 0,9 g del compuesto de organoselenio (Selenocianatoacetoxi) butoxietil metacrilato (SCABEM) gota a gota con mezcla, dando como resultado una solución cohesiva que tiene 0,00126 gramos Se/gramo solución (0,9g / 150 g cohesivo sin látex = 0,006 g SCABEM/g ctg; Se es un 21% en peso de SCABEM = 0,006 g x 0,21 = 0,00126 gramos Se/gramos solución). Una parte (3,43 g) de esta muestra se extendió sobre una venda elástica cohesiva compuesta (Andover Coated, Inc., Salisbury, MA), se secó al aire durante 5 minutos y después se realizó un secado flash durante 2 minutos a 100°C. A partir de este compuesto trazado, se cortó una sección de 10 cm por 30 cm y después se cortó en cuadrados de 1 cm para el ensayo. En teoría, 3,43 g de esta solución que contiene SCABEM distribuida uniformemente a través de la muestra de 300 cm² daría como resultado 0,0000144 g Se/cm² (es decir, 1,44 x 10⁻⁵ g Se/cm² = 3,43 g solución/300 cm² = 0,011 g solución/cm² (es decir, 0,011 g solución Se/1 cm² muestra) y 0,011 g solución/cm² x 0,00126 g Se/g solución = 0,0000144 g Se/cm²). Los cuadrados resultantes se ensayaron, utilizando la metodología estándar descrita anteriormente, tanto en los ensayos de fluorescencia como de quimioluminiscencia. Los ensayos de fluorescencia proporcionan una medida del selenio total depositado en el cuadrado de ensayo, mientras que el ensayo de quimioluminiscencia proporciona una medida del selenio reactivo total disponible para proporcionar la formación del superóxido catalítico dependiente del tiol. Los resultados se muestran en la Tabla I.

Tabla I: Análisis de la actividad y contenido de selenio para recubrimientos de vendas

Muestra #	Peso (mg)	Ensayo de quimioluminiscencia			Ensayo de fluorescencia			
		Cuentas después de 5 min.	Cuentas/peso	Lectura después de la dilución	Contenido Se (µg) después de la dilución	Veces de dilución	Se total (µg)	Contenido Se (µg)/ peso (mg)
1	40	567	14,18	12,5	6,93	8	55,4	1,39
3	33	989	29,97	15,1	8,65	8	69,2	2,09
4	37	922	24,92	14,4	8,19	8	65,52	1,77
5	46	605	13,15	17	9,9	8	79,2	1,72
6	44	005	22,84	15,8	9,11	8	72,9	1,66
7	45	782	17,38	10,4	5,6	8	44,8	0,99
8	44	825	18,75	16,9	9,84	8	78,7	1,79
9	40	819	20,48	12,1	6,67	8	53,36	1,33
10	42	869	20,69	14,3	8,12	8	64,96	1,55

Nota: El ensayo de quimioluminiscencia es para probar la actividad del selenio, mientras que el ensayo de fluorescencia es para adquirir el contenido total de selenio. Todas estas muestras se cortaron como 1 centímetro cuadrado de la venda.

La cantidad total de Se en las 12 muestras aleatorias fue de 2117,24 µg a partir de los datos de fluorescencia mostrados en la Tabla I (columna etiquetada como "Se total (µg)"). Esta se dividió entre 12 muestras = 176,44 µg Se/muestra, y ya que cada muestra contiene aproximadamente 11 mg de recubrimiento de solución SCABEM, esto equivale a 16,04 µg Se/mg de recubrimiento de solución SCABEM.

La cantidad total de luminiscencia (cuentas) proporcionada por las 12 muestras aleatorias destacada en la columna etiquetada arriba como "cuentas después de 5 minutos" es 12,323 (cuentas). Esto se dividió entre 12 muestras, albergando cada una aproximadamente 11 mg de recubrimiento para dar 93,4 cuentas/mg de recubrimiento. Este ensayo se ha estandarizado de tal manera que 10 cuentas son las equivalentes a 1 µg de Se, de este modo se ha detectado el equivalente de 9,34 µg de Se/mg de recubrimiento. Ya que la formulación blanca elástica cohesiva sin látex tiene una medida de abrillantador óptico, y se detectó un promedio de 20 cuentas a partir del análisis de quimioluminiscencia del blanco, la cantidad real de luminiscencia detectada que resulta de la formación del superóxido es la equivalente a $9,34 \mu\text{g O}_2^- - 2 \mu\text{g O}_2^- = 7,34 \mu\text{g O}_2^-$. Estos datos han demostrado que $7,34 \mu\text{g O}_2^-/\text{mg}$ de recubrimiento del total de los $16,0 \mu\text{g Se}/\text{cm}^2$ detectados en la muestra son los responsables de la formación del superóxido. $16,0 \mu\text{g Se Total} \times 100\% = 45,76\%$ de selenio están presentes en una forma reactiva capaz de generar superóxido en presencia de un compuesto de tiol.

Esto significa que la mezcla de un compuesto de organoselenio elegido específicamente proporciona □ 46% del compuesto antimicrobiano en la interfase venda/piel donde se produce el superóxido en cantidad suficiente para destruir las bacterias y/o otros microbios.

También se probó la capacidad de las bacterias para migrar desde una cinta inferior no tratada a una cinta superior cuando las cintas se apilan unas encima de otras y se deja reposar sobre un césped bacteriano durante 24 horas.

Tabla II: Migración bacteriana en cintas apiladas

No tratadas	Tratadas
13,334	10.100.000

La Tabla II demuestra la diferencia en las colonias bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* entre las encontradas en la cinta inferior menos las encontradas en la cinta superior. Por lo tanto, el número mayor indica que la cinta superior se resiste a la migración de la bacteria. En el experimento no tratado, ninguna cinta contenía un recubrimiento de selenio, mientras que en el experimento tratado, solo la cinta superior contenía un recubrimiento de selenio. Cada número en la Tabla II es el promedio de tres experimentos.

De este modo, los resultados en la Tabla II demuestran que un recubrimiento de selenio inhibe marcadamente la capacidad de la bacteria para migrar a una cinta recubierta de selenio.

Técnica 4: Ensayo basado en soluciones para la actividad antimicrobiana

A diferencia de otros antibióticos que requieren el metabolismo de la bacteria para la actividad, el mecanismo único de acción de la tecnología de selenio permite la destrucción efectiva de las bacterias incluso a 4°C. Esto significa que una superficie recubierta de selenio refrigerada o un producto que contiene selenio sería eficaz para destruir las bacterias que entran en contacto con la superficie. Se llevaron a cabo ensayos que demuestran esta capacidad utilizando *E. coli* en medio líquido (LB). Estos ensayos utilizaron *E. coli* que expresaba un antígeno específico (antígeno F1 de *Yersinia pestis*) al que se uniría un péptido recubierto de selenio. La finalidad del antígeno F1 y el péptido correspondiente era proporcionar un medio de localización del selenopéptido covalente a la bacteria. Una localización similar existiría para la bacteria que entra en contacto con la superficie o producto recubierto de selenio.

Las bacterias se cultivaron durante la noche a 37°C a una densidad óptica de 600 nm (OD_{600}) de 1. Esta solución se diluyó después a una densidad óptica de 0,3 (10^8 bacterias por ml) a 600 nm (OD_{600}), y las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS. Las células se volvieron a suspender en H_2O , y alícuotas equivalentes de 1 ml de cultivo a $0,3 A_{600}$ (□ 10^8 células) se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. Los tubos se colocaron en hielo durante al menos 15 minutos antes de comenzar los experimentos, y se mantuvieron en hielo durante el transcurso de los experimentos. El seleno-péptido y el péptido sin selenio se añadieron a la suspensión bacteriana a una concentración de 10 µM con y sin glutatión a una concentración final de 300 µM, y las mezclas de péptidos se incubaron junto con las soluciones de control (también con y sin glutatión a una concentración final de 300 µM) en hielo y se mantuvieron mezcladas mediante el burbujeo del aire. A diferentes intervalos de tiempo, se separó una alícuota de cada mezcla y se hizo una dilución en serie 1:100; las alícuotas diluidas se colocaron en placas LB (10 g/L de Bacto-Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de Agar bacteriano, 5 g/L de NaCl, y 100 µL de NaOH 10N) para la cepa madre XLI-Blue de *E. coli*, y LB (10 g/L de Bacto-Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de Agar bacteriano, 5 g/L de NaCl, y 100 µL de NaOH 10N) suplementado con Carbenicilina (10 µg/ml) para enumerar las bacterias viables. La misma dilución de cultivo se utiliza para todas las placas de modo que se pueda hacer una comparación entre las cuentas de las colonias. Las placas se incubaron a 37°C durante al menos 24 horas, y se contaron las unidades que forman colonias. Las Figuras 1-3 muestran los resultados de estos experimentos. Con el péptido conjugado con selenio, se registró la destrucción completa de las bacterias en casi 4 horas, mientras que los tratamientos de control dieron como resultado la viabilidad completa de *E. coli*. Ensayos idénticos se realizaron con *E. coli* que no expresa el antígeno F1. En tales casos ninguno de los

péptidos conjugados con selenio causó la destrucción, confirmando la necesidad de la unión del seleno-péptido a *E. coli* para lograr la éxtasis antibacteriana.

5 Las Figuras 1-3 demuestran que una baja concentración de un selenopéptido específico (10 µM) puede destruir sobre 8 registros de bacterias en 60 minutos a 25°C y sobre 8 registros de bacterias en 250 minutos a 4°C.

10 Esta rápida respuesta es muy específica: solo se destruyeron las bacterias que expresan el antígeno, mientras que las bacterias sin este sitio de unión no se destruyeron. Además, la capacidad de destrucción a 4°C demuestra la capacidad de las composiciones biocidas de la presente invención para ser efectivas a una temperatura refrigerada. Tal capacidad sería ventajosa en áreas tales como pero no limitadas a, la conservación de tejidos y bancos de sangre.

Técnica 5: Dosis-respuesta de concentraciones conocidas de selenofolato y la cantidad de quimioluminiscencia generada

15 Se realizaron dos ensayos de quimioluminiscencia (CL) a diferentes concentraciones de selenofolato. El primer ensayo se muestra en la Tabla IHA. La r de Pearson para estos valores de CL frente a la concentración (volúmenes) fue 0,926. El segundo ensayo fue una dilución 2:1 de las concentraciones utilizadas en el primer ensayo y se muestran en la Tabla HIB. Otra vez, CL frente a la concentración de SE tuvo una r de Pearson = 0,982, que es ligeramente mejor que la del primer ensayo debido a los menores recuentos y una mejor extensión de la concentración. Si estas muestras se analizaran para el Se mediante fluorometría, la concentración de Se se podría correlacionar con el CL, y el perfil de destrucción para el selenofolato (Figuras 4A-4C). Por lo tanto, la destrucción celular, CL y concentración de selenio están intrincadamente entrelazadas debido a la generación de superóxido y otras especies de oxígeno reactivas (ROS).

25 En comparación, la Figuras 4A-4C muestran tanto la concentración del selenofolato como los efectos del tiempo en la detención del cáncer de mama en células MDA-231 a 24 horas, 72 horas y 120 horas. Este resultado se puede comparar también con la Figura 5, que muestra una dosis-respuesta de las células de cáncer de mama MDA-231 a selenita; cuando se compara con el selenofolato, las células expuestas a selenita son algo resistentes a estas particulares ROS.

30 La Figura 4 muestra un estudio dosis-respuesta para el tratamiento de las células de cáncer de mama (MDA-231) en cultivos en suero de ternera fetal al 10% con selenofolato. Estas células se trataron durante 24 horas después de sembrar las células. El tratamiento se permitió continuar después durante 24 horas (4A); 72 horas (4B); o 120 horas (4C).

35 La Figura 5 muestra el estudio dosis-respuesta para el tratamiento de células de cáncer de mama (MDA-231) en cultivos en suero de ternera fetal al 10% con selenita de sodio. Estas células se trataron durante 24 horas después de sembrar las células. El tratamiento se permitió continuar después durante 24 horas.

40 Tabla IIIA. Quimioluminiscencia a diferentes concentraciones de selenofolato

Cantidad de adición de solución madre (µl) añadida a 1 µl de selenofolato	Cuentas totales
0,0	0
1,25	3,023
2,5	5,434
5,0	13,039
10,0	14,459

Tabla IIIB. Quimioluminiscencia a diferentes concentraciones de selenofolato

Cantidad de adición de solución madre (µl) añadida a 1 µl de selenofolato	Cuentas totales
0,0	0
2,5	3,023
5,0	3,206
20,0	8,142
40,0	12,836

45 Ejemplo 1: Prevención de la colonización bacteriana de lentes de contacto
 Las lentes de contacto son utilizadas por aproximadamente 90 millones de personas en todo el mundo. Las primeras lentes de contacto era necesario retirarlas del ojo diariamente para eliminar las proteínas y lípidos acumulados descargados por el ojo y para la esterilización. Además, la pobre oxigenación de la córnea, causada por la transmisibilidad relativamente baja de oxígeno de las primeras lentes de hidrogel convencionales, también limita el tiempo de uso. Mientras que la gran mayoría de usuarios de lentes de
 50

5 contacto todavía se quitan sus lentes a diario, la reciente llegada de lentes de hidrogel de silicona, que proporcionan mayor transferencia de oxígeno a la córnea, permite el uso prolongado de 30 días que ahora permite la FDA. Sin embargo, a pesar de la fisiología corneal mejorada proporcionada por las nuevas lentes de 30 días altamente permeables al oxígeno, las bacterias que causan el ojo rojo agudo o incluso ulceración corneal siguen siendo una preocupación clínica.

10 Cuando unas lentes de contacto se colocan en el ojo, la superficie de las lentes de contacto es colonizada por las bacterias más del 50% del tiempo. El papel que desempeña esta colonización en el éxito del uso de lentes de contacto ha sido un tema de interés durante décadas. Los estudios que analizan este tema generalmente se clasifican en 2 categorías: estudios que tienen un interés en las características de la colonización bacteriana en
15 pacientes asintomáticos y estudios que analizaron la colonización bacteriana en pacientes con ojo rojo o infección aguda. Varios estudios anteriores utilizaron técnicas de cultivo o microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar las bacterias que están débilmente y/o estrechamente unidas a las lentes de contacto tomadas de pacientes asintomáticos. Parece que hay un acuerdo general entre los estudios hasta la fecha de que la composición y la densidad de la colonización bacteriana no varía con los cambios en el material de las lentes de contacto. Cómo varía el número de bacterias con el tiempo y el calendario de uso permanece menos claro.

20 Se ha reportado que las reacciones inflamatorias o infecciones están asociadas con la colonización bacteriana de la superficie de las lentes de contacto blandas, particularmente cuando las lentes se utilizan durante períodos prolongados de tiempo. Mientras que la queratitis microbiana no parece estar asociada exclusivamente con bacterias de una tinción de gram particular, las bacterias gram negativas parecen estar asociadas con el ojo rojo agudo inducido por las lentes de contacto, y las bacterias gram positivas están asociadas con las úlceras periféricas inducidas por las lentes de contacto. Baleriola-Lucas y colaboradores
25 (1991) encontraron una clara asociación entre las respuestas de los ojos rojos agudos en el uso prolongado y la contaminación bacteriana gram negativa, con *Serratia marcescens* y *S. liquefaciens* dominantes. Consideraron que sus resultados sugieren que puede haber una asociación entre la colonización bacteriana de las lentes de contacto de hidrogel y la respuesta adversa aguda.

30 Dada la evidencia directa e indirecta de que la colonización bacteriana de las lentes de contacto está estrechamente relacionada con el ojo rojo agudo y las infecciones corneales, un material o recubrimiento que inhiba la colonización bacteriana debería mejorar sustancialmente la seguridad del uso de las lentes de contacto. Un candidato para cumplir este papel es un recubrimiento covalente de selenio (Se). Para aumentar la seguridad de las lentes de contacto de uso prolongado, los investigadores han buscado biomateriales que
35 reduzcan las consecuencias adversas causadas por la colonización bacteriana. Hasta la fecha no se ha reportado ningún material que evite la colonización bacteriana en lentes de uso prolongado, y al mismo tiempo, sea compatible con la córnea. La presente invención muestra, por primera vez, la unión covalente del Se a la superficie de las lentes de hidrogel de silicona de uso prolongado, la eficacia bactericida del Se frente a la colonización bacteriana, y su compatibilidad con la córnea del conejo. Se demuestra que la superficie de las lentes modificada con Se es catalíticamente activa *in vitro*, produciendo superóxido como se detectó por quimioluminiscencia de lucigenina. Las lentes de hidrogel modificadas con Se también se muestran por SEM para evitar la colonización *in vitro* por *Pseudomonas aeruginosa*, que de otro modo se producía en lentes no recubiertas (control). Además, las lentes recubiertas de Se no provocaron cambios detectables en la córnea de los conejos blancos de Nueva Zelanda equipados con lentes de Se y de control por períodos de hasta 60 días.
45 Los resultados son indicativos de una amplia aplicación de las superficies recubiertas de Se activas para la prevención de la colonización bacteriana en lentes de contacto de hidrogel de silicona y catéteres, stents, válvulas de glaucoma, válvulas cardíacas, y similares.

Materiales y métodos:

50 Unión del Se a las lentes de contacto: Se utilizaron lentes de contacto PureVision (balafilcon A) (Bausch & Lomb, Inc, Rochester, NY), y las lentes de contacto se recubrieron covalentemente con Se como se describió aquí anteriormente. El proceso de recubrimiento da como resultado la unión covalente de una molécula organo-Se directamente a la superficie de la lente de contacto. Cada lente viene con un certificado, suministrado por Selenium Technologies Inc. (Lubbock, TX), indicando la cantidad de Se activo en cada lente.
55 La cantidad de Se covalentemente unido a las lentes de contacto se determinó mediante el método fluorométrico descrito en el Ejemplo 1. Brevemente, una lente de contacto del mismo lote se colocó en una solución de ácido perclórico/ácido sulfúrico en un tubo de ensayo Pyrex y se digirió sobre un mechero Fisher en una campana de ácido perclórico. La solución se neutralizó y se añadió EDTA seguido de la adición de diaminonaftaleno. El complejo selenodiaminonaftaleno resultante se extrajo con ciclohexano. El ciclohexano que contiene el complejo selenodiaminonaftaleno se cuantificó mediante un fluorómetro Perkin-Elmer Modelo
60 650 Y 40 (Wellesley, MA) a una excitación de 363 nm por emisión a 525 nm (véase Ejemplo 1). A partir de este método, era evidente que cada lente tratada estaba recubierta con 8 µg de Se por lente. La cantidad de Se activo determina la cantidad de superóxido que puede generar la lente recubierta con Se en un periodo de tiempo específico. Las lentes recubiertas con selenio se marcaron con un pequeño punto colocado en la superficie anterior utilizando un marcador permanente Sharpie (Sanford, Inc, Bellwood, IL).
65

Las lentes se evaluaron para la actividad del Se después de hasta 2 meses de uso en el ojo del conejo. Esto se hizo para determinar si el Se estaba todavía unido a las lentes y si la actividad del Se disminuía por la deposición de proteínas o lípidos. La actividad del selenio se midió mediante luminiscencia (Spallholz y colaboradores (2001) Nutr. Cancer, 40:34-41). La quimioluminiscencia se midió, utilizando lucigenina como el detector del superóxido, añadiendo la lente de contacto a un tubo que contiene 1 mL de tampón de borato de sodio (0,05M), lucigenina (20 µg/mL), y una solución de glutatión reducido (4 mg/mL) (Sigma Chemical). La luminiscencia de la solución se midió después contando los fotones que se liberan en la interacción entre los radicales superóxidos y la lucigenina. Los fotones se contaron durante quince intervalos de 30 segundos utilizando un quimioluminómetro Los Alamos Diagnostics (Modelo 535) mantenido a 36°C. Además, se evaluó una pequeña muestra de lentes de contacto recubiertas con Se que no se utilizaron en experimentos adicionales para medir la actividad poco después de aplicar el recubrimiento de Se.

Ensayos de las lentes de contacto recubiertas con Se en un ojo de conejo: Se utilizaron en este estudio conejos blancos de Nueva Zelanda (peso corporal 3,5-4,5 kg; macho) para proporcionar ojos más grandes. Todos los conejos se trataron de acuerdo con la resolución de ARVO sobre el uso humano de animales en oftalmología y la investigación de la visión. Todos los animales estaban sanos y libres de enfermedades oculares observables. Las membranas nictitantes se dejaron intactas. Todos los animales se utilizaron después de una recuperación mínima de 2 semanas y se mantuvieron en jaulas individuales a una temperatura ambiente constante (25°C) con una humedad relativa del 30-70%. Se mantuvo un ciclo estándar de luz y oscuridad de 12 horas. Se utilizaron 15 conejos para el experimento. Se hicieron intentos para mantener el par de lentes de contacto (1 recubierta con Se, 1 de control) en un mínimo de 10 ojos de conejos continuamente durante 2 semanas. Las lentes se quitaron después y se reemplazaron con un par nuevo (1 recubierta con Se, 1 de control) durante 2 semanas adicionales. Los conejos se examinaron dos veces al día para controlar la reacción ocular a las lentes de contacto y para asegurarse de que las lentes estaban en los ojos. Cualquier lente que se cayera se lavó y se desinfectó con solución multiusos Opti-Free (Alcon Laboratories, Inc, FortWorth, TX) y se devolvieron al ojo del conejo. Tres conejos que perdieron continuamente sus lentes de contacto se retiraron del estudio. Las lentes de contacto tomadas de los conejos que utilizaron con éxito las lentes se dividieron en los experimentos del estudio.

Monitorización de la toxicidad corneal de conejos:
Examen con lámpara de hendidura: las observaciones con lámpara de hendidura se realizaron antes de que las lentes de contacto se colocasen en los ojos y a intervalos semanales después de la inserción. Las recomendaciones de la lámpara de hendidura incluyeron tinción, hiperemia, neovascularización, edema, infiltrados, e iritis. Después de las pautas de la FDA 510(K), las recomendaciones de la lámpara de hendidura se recogieron en una escala de 0 a 4 donde 0 indica ninguno; 1, trazas; 2, leve; 3, moderado; y 4, severo. A la persona que realizó las observaciones con lámpara de hendidura no se la ocultó que el ojo contenía la lente tratada.

Paquimetría: la paquimetría se llevó a cabo antes de la inserción de la lente y después de 2 semanas con un paquímetro Corneo Gauge Plus (Sonogage, Inc, Cleveland, OH) para buscar hinchazón en la córnea o pérdida de tejido. Las córneas se midieron utilizando 2 de los modos de medición disponibles en este paquímetro: Rk produce datos completos del espesor corneal y LK produce datos del espesor epitelial. Con ambos modos, se realizó la paquimetría 3 veces en cada una de las 5 localizaciones en las córneas de conejo. Las 5 localizaciones incluyeron una localización central y 4 localizaciones que eran 3 mm superiores, inferiores, laterales, y nasales desde el centro de la córnea. La distancia de 3 mm se estimó tomando una medición de paquimetría a medio camino entre el centro de la córnea y el limbo, ya que la córnea del conejo tiene aproximadamente 12 mm de diámetro (Brem (1975) J Exp Med, 141:427-439).

SEM: Al completar 2 meses, los animales se sacrificaron y la mitad de la córnea se fijó en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,2 seguido por un fijador posterior de OsO₄ al 1% para estudios por SEM después del método de Hazlett (Prog Histochem Cytochem (1993) 25:1-60).

Las muestras se examinaron para los cambios en la morfología de la córnea. Las córneas se valoraron en una escala de 0-4 donde 0 indica que no hubo cambios; 1, ligera ondulación de las células; 2, huecos entre células; 3, toxicidad celular leve; 4, toxicidad celular extensa.

Histopatología: La histopatología se llevó a cabo en la otra mitad de cada córnea. Esta parte del estudio se realizó en el Departamento de Patología, University of Wisconsin, Madison, School of Veterinary Medicine. Las córneas se evaluaron por los signos de la posible toxicidad debido a la unión del Se a la lente de contacto. Las córneas se valoraron en una escala de 0-4, donde 0 indica normal; 1, células anormales presentes; 2, áreas intermitentes de muerte celular; 3, grandes secciones de muerte celular; y 4 muerte extendida a total de las células epiteliales.

Monitorización de la superficie de la lente de contacto

65

SEM de la colonización bacteriana: En un experimento separado del experimento de conejos, las lentes de contacto tratadas y de control se incubaron *in vitro* a 37°C durante 4 días en caldo L inoculado con *P. aeruginosa* en crecimiento de fase logarítmica. Las lentes se enjuagaron con agua destilada y después se fijaron en glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1M pH 7,2 seguido por un post-fijador de OsO₄ al 1% y se enviaron para SEM. Las superficies de la lente de contacto tratada y de control se examinaron para la deposición y la adhesión bacteriana. Se eligieron seis sitios con un giro aleatorio de la rueda que controlaba la posición de la lente de contacto en el microscopio. Las imágenes elegidas para este documento fueron representativas del promedio de estas 6 localizaciones.

Recubrimiento de proteínas de las lentes de contacto recubiertas con Se: Se analizó un subconjunto de lentes de contacto utilizadas por los conejos para la cantidad de proteína adherida a la superficie de la lente. Las lentes se quitaron con fórceps de lentes de contacto estériles y se enjuagaron vigorosamente con solución salina no conservada antes del procedimiento de extracción. La extracción de la proteína para lentes de contacto individuales siguió el procedimiento utilizado por Minarik y Rapp (J CLAO (1989) 15:185-188) de la siguiente manera:

- 1.La lente se colocó en 1,5 mL de agua destilada que contiene 1 gota de solución de urea (2g/mL). La solución se agitó durante 30 minutos.
- 2.La solución se eliminó.
- 3.La lente se colocó en 1,5 mL de NaOH 1 N y se centrifugó durante 30 minutos; la solución se combinó con la solución de la etapa 2.
- 4.La lente se colocó en 1,5 mL de agua destilada y se añadió una gota de DMSO; se centrifugó durante 30 minutos; la solución se combinó con la solución de la etapa 3.
- 5.La lente se colocó en 1,5 mL de alcohol isopropílico al 25%; se centrifugó durante 30 minutos; la solución se combinó con la solución de la etapa 4.
- 6.La lente se colocó en 1,5 mL de agua destilada y se añadió una gota de urea (2g/mL); se centrifugó durante 30 minutos; la solución se combinó con la solución de la etapa 5.
- 7.La lente se colocó en 1,5 mL de ácido acético al 20%; se centrifugó durante 30 minutos; la solución se combinó con la solución de la etapa 6.

El extracto combinado se analizó para las proteínas totales utilizando un ensayo de proteínas de Bio-Rad, un ensayo de unión de colorante basado en el cambio de color diferencial de un colorante en respuesta a diferentes concentraciones de proteína.

Deposición de lípidos en lentes de contacto recubiertas de Se: Otro subconjunto de lentes utilizadas por los conejos se analizaron para la cantidad de lípidos que se adhieren a la superficie de la lente. Las lentes se quitaron con fórceps de lentes de contacto estériles y se enjuagaron vigorosamente con solución salina no conservada antes del procedimiento de extracción. La extracción de lípidos para lentes de contacto individuales siguió una modificación del procedimiento de Bontempo y Rapp (Curr Eye Res. (1997) 16:1258-1262) de la siguiente manera: las lentes se incubaron en un tubo de vidrio grande, cerrado con 150 µL de hexano con continua agitación durante una noche. Después cinco microlitros del extracto se colocaron en una placa de TLC. La placa se desarrolló después con acetato de etilo/hexano (1:4). La densidad de las manchas de lípidos se determinó después con un densitómetro.

Resultados:

Actividad del Se antes y después del uso: La actividad del selenio se determinó mediante quimioluminiscencia antes y después de 2 meses de uso en un ojo de conejo. Se encontró que las lentes tenían $2,14 \pm 0,2$ unidades de quimioluminiscencia antes del uso y $1,90 \pm 0,2$ después del uso. Por lo tanto, hubo poca pérdida de actividad de Se con 2 meses de uso y deposición de la lente de contacto.

Toxicidad corneal

Datos de la lámpara de hendidura: Mientras que las evaluaciones semanales con la lámpara de hendidura buscaron la tinción con fluoresceína, hiperemia, neovascularización, edema, infiltrados, e iritis, la única señal clínica para mostrar datos distintos de cero fue la tinción con fluoresceína tanto para el ojo de control como el experimental. De este modo, la Figura 6 muestra los datos de tinción con fluoresceína de las observaciones de 11 conejos a las 4 y 8 semanas. La tinción con fluoresceína consistió en manchas punteadas ocasionales aisladas y, más frecuentemente, manchas ligeramente arqueadas o casi lineales colocadas aleatoriamente. Mientras no se realizó un análisis formal, estas manchas arqueadas y lineales parecían ocurrir más frecuentemente en los conejos más agresivos y, por lo tanto, se podía atribuir a un trauma al quitarles la lente de contacto. Como se muestra en la Figura 6, ni las lentes tratadas ni las de control produjeron una tinción corneal significante sin diferencia significativa entre los ojos de control y los experimentales.

Datos de paquimetría: Los datos de paquimetría de las 5 localizaciones medidas en ambas córneas de 10 conejos se cotejaron y promediaron por separado. Cuando no se encontraron tendencias específicas del sitio, los datos se volvieron a cotejar y promediar con los datos de las 5 localizaciones de medición agrupadas. Las Figuras 7A y B muestran los datos de paquimetría corneal epitelial y total a tiempo 0 y después de 2 semanas

de uso de la lente de contacto. Ni los datos del espesor corneal epitelial ni total mostraron cambios significativos en el espesor. Por lo tanto, se encontraron pocas indicaciones de que las córneas que utilizaban lentes tratadas o de control sufrieran cualquier pérdida de tejido o edema.

5 Datos SEM: Todas las micrografías electrónicas de la superficie corneal anterior se valoraron con la escala descrita anteriormente. Todas las córneas de control y experimentales recibieron una puntuación de 0 (sin cambios). La Figura 8 muestra las micrografías electrónicas de una muestra representativa que muestra la apariencia similar de las córneas que usaron la lente recubierta con Se frente a una lente sin recubrimiento durante 2 meses. Las micrografías electrónicas muestran que las uniones entre las células siguen siendo estrechas en ambas córneas. Además, las microvellosidades no se alteran en ambas córneas.

10 Datos de histología corneal: Todas las muestras de córnea enviadas para examen histológico recibieron también una puntuación de 0 (normal) en la escala de histología descrita anteriormente. La Figura 9 muestra diapositivas de histología corneal representativas que no muestran diferencias entre las córneas que usaron una lente recubierta con Se frente a una lente no recubierta durante 2 meses.

Superficie de la lente

20 SEM: Las micrografías electrónicas (Figura 10) muestran poca o ninguna colonización bacteriana en las lentes recubiertas con Se y una extensa colonización en las lentes no recubiertas con *P. aeruginosa*. Se tuvo que buscar en las lentes de contacto con tratamiento de Se para encontrar las bacterias y desechos mínimos mostrados en esta figura, mientras que las lentes no tratadas tenían una densa colonización sobre una mayoría de la superficie de la lente de contacto.

25 Deposición de proteínas: No hubo una diferencia significativa en la deposición de proteínas totales (Figura 11) entre 9 lentes de control recubiertas con Se y 9 no recubiertas después de 14 días en ojos de conejos. Mientras que las lentes tratadas (Se) tenían un nivel de proteína total medio ligeramente más bajo, las SEs del medio excedían fácilmente la diferencia en los promedios.

30 Deposición de lípidos: No hubo una diferencia significativa en la deposición de lípidos (Figura 12) entre 9 lentes de control recubiertas con Se y 9 no recubiertas. Además, hubo una considerable variabilidad en la cantidad de lípido encontrado tanto en las lentes tratadas como en las de control dando como resultado grandes intervalos de confianza. Mientras las lentes tratadas (Se) tuvieron un nivel de lípidos relativo medio ligeramente más bajo, las SEs de la media excedía fácilmente la diferencia en los medios.

35 En la Figura 13, dos lentes de contacto (una recubierta con Se y la otra sin selenio) se usaron en un ojo humano durante una semana sin quitarlas. Las lentes de contacto se colocaron después en un medio de caldo L y se inocularon con *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria se dejó crecer durante 4 días. Al final de este tiempo se quitaron las lentes, se enjuagaron suavemente con agua y se procesaron por microscopía electrónica de barrido. La Figura 13A muestra la lente recubierta con selenio. Se encontró que solo unas pocas bacterias estaban presentes. La Figura 13B es la lente de control sin selenio. Como puede verse, una biopelícula gruesa estaba presente en la lente de control.

Discusión:

45 Históricamente, tres de los principales problemas que limitan la seguridad y la duración del uso prolongado de lentes de contacto han sido la transmisibilidad del oxígeno, la colonización bacteriana y la deposición de proteínas/lípidos. La relativamente reciente introducción de los materiales de hidrogel de silicona ha recorrido un largo camino para aliviar las preocupaciones sobre la transmisibilidad del oxígeno. El presente estudio sugiere que un recubrimiento monomolecular de Se podría resolver el segundo problema. Las lentes recubiertas con Se mostraron una marcada tendencia a resistir la colonización bacteriana *in vitro* como se observó mediante microscopía electrónica. Por otro lado, los datos no mostraron reducción (o expansión) de la deposición de proteínas o lípidos en las lentes tratadas. Finalmente, múltiples ensayos *in vivo* sugieren que las lentes recubiertas de Se son seguras para la córnea de conejo.

55 Las micrografías electrónicas de las superficies de las lentes recubiertas de Se y de control muestran que las lentes recubiertas de Se colocadas en un caldo inoculado con bacterias resistieron la colonización bacteriana. Mientras que las lentes de cultivo quitadas de los ojos de conejo podrían estar más cerca del uso de lentes de contacto en el mundo real, se decidió probar la eficacia del recubrimiento de Se exponiendo las lentes a una alta carga bacteriana. La carga bacteriana en los experimentos *in vitro* es mucho mayor que en un ojo normal. Además, no existen sistemas inmunitarios pasivos o activos *in vitro* para ayudar al Se a prevenir la unión bacteriana como existen en un ojo normal. Los dos sistemas inmunitarios han contribuido probablemente a la marcada variabilidad observada en experimentos previos que cultivaron lentes de contacto tomadas de pacientes. Por supuesto, existe la posibilidad de que la deposición de proteínas y lípidos encontrada en el ojo de conejo o en el ojo humano pudiese "apagar" el recubrimiento de Se y, por lo tanto, reducir o eliminar su efecto bactericida. Esto no parecía ser el caso en el subconjunto de lentes usadas por los conejos durante 2 semanas y colocadas en un caldo bacteriano. Aunque los estudios de recuento celular se iniciaron también, la microscopía electrónica se considera que es el método óptimo para investigar la colonización bacteriana.

Los datos no mostraron un efecto significativo en la deposición de proteínas o lípidos en las lentes recubiertas de Se frente a las de control después de usarse en conejos durante 14 días. La expectativa de una diferencia en la deposición de proteína se basó en el hecho de que las bacterias se adhieren por ellas mismas a una superficie al secretar una matriz proteica en la superficie. Se anticipó que hacer que una superficie de una lente de contacto resista a las bacterias podría disminuir también las proteínas totales y, posiblemente, los lípidos unidos a la superficie de la lente. Esto parece no ser el caso. Por otro lado, el recubrimiento de Se tampoco afectó negativamente a las características de la deposición del material de hidrogel de silicona en las lentes de estudio. Senchyna y colaboradores (Curr. Eye. Res, (2004) 28:25-36) han mostrado recientemente que las lentes de contacto fabricadas con material de hidrogel de silicona muestran mucha menos deposición de proteínas que el material convencional. Como mínimo, uno esperaría que un recubrimiento antimicrobiano no aumentaría la deposición de proteínas y lípidos en el material subyacente. Para el Se, esto parece ser el caso. Sin embargo, las lágrimas de conejo son marcadamente diferentes de las lágrimas humanas; las lágrimas de conejos son mucho más altas en contenido de lípidos que las lágrimas humanas. Esta diferencia en la composición química de las lágrimas de conejo frente a las lágrimas humanas deja abierta la posibilidad de que los ensayos de deposición realizados en lentes recubiertas de Se retiradas de los ojos humanos podrían mostrar un efecto beneficioso (o posiblemente perjudicial). Finalmente, algunos estudios sugieren que alguna deposición de los componentes de la película lagrimal en la superficie de la lente de contacto podría tener en la actualidad un efecto beneficioso. Por ejemplo, Cheng y colaboradores (Curr Eye Res. (2004) 28:93-108) han demostrado que la adsorción de alguna proteína en la superficie del material de hidrogel de silicona mejora la humectabilidad de la lente de contacto.

Seguridad: Cuando se evalúa un fármaco o dispositivo para uso en humanos, determinar su perfil de seguridad es tan importante como investigar si se logró el efecto deseado. Una combinación de observaciones clínicas y técnicas de laboratorio se utilizó para evaluar la seguridad del recubrimiento de Se propuesto en el ojo de conejo.

La primera técnica clínica fue la observación de una lámpara de hendidura estándar con y sin fluoresceína después de que las lentes de contacto se hubiesen retirado. Se evaluaron la tinción con fluoresceína, hiperemia, neovascularización, edema, infiltrados, e iritis. De estos signos, solo se encontró tinción con fluoresceína punteada y/o arqueada en el ojo tratado o de control. Cuando apareció la tinción punteada, las discretas manchas punteadas ascendieron siempre a menos de 4 por ojo y por tanto se clasificaron como trazas. No hubo diferencia en la frecuencia de tinción con puntos entre los ojos que se usaron lentes recubiertas de Se y los ojos que usaron lentes de control. Aparecieron manchas ocasionales arqueadas que eran algo aleatorias en cuanto a localización y orientación. Estas cubrieron un área mucho más grande que una mancha punteada única, pero la recepción de fluoresceína no fue densa. El radio de las manchas arqueadas fue similar al radio de una punta de humano o una uña humana, y por lo tanto, esta tinción podía deberse simplemente a un trauma menor por la separación de la lente de contacto en el conejo ocasionalmente enérgico. Mientras que la frecuencia de las manchas arqueadas ocasionales fue más baja, su gravedad se clasificó como leve. Por lo tanto, incluyendo estas manchas arqueadas en los datos aumentó tanto la media como la varianza en los datos de tinción.

La paquimetría se utilizó como un ensayo clínico objetivo que midió la pérdida de tejido o hinchazón debido a un edema. Si la cantidad de Se que recubre las lentes de contacto es tóxica para las células corneales, podría aumentar la incidencia de muerte celular o desprendimiento y causar adelgazamiento. Por otro lado, si las bombas metabólicas que depuran la córnea se ven afectadas adversamente de alguna manera, las córneas podrían hincharse debido al edema. No hubo evidencia para ningún escenario en los datos de nuestro espesor epitelial o espesor corneal total. Los datos de espesor epitelial y total no fueron significativamente diferentes entre los ojos experimentales y de control después de 14 días de uso continuo de las lentes de contacto. Sin embargo, tanto los datos del espesor epitelial como del espesor total mostraron el ligero adelgazamiento anteriormente reportado provocado por el uso prologado de lentes de contacto (Holden y colaboradores (1985) Invest Ophthalmol Vis Sci, 26:1489-1501; y Ren y colaboradores (1999) J CLAO, 25:80-100). Esta última información sugiere que el instrumento y la técnica descritos aquí produjeron la resolución adecuada para detectar una diferencia entre las córneas experimentales y de control si hubiera estado presente.

La microscopía electrónica de barrido tampoco reveló diferencias entre las córneas que utilizaron lentes de contacto recubiertas de Se y una córnea que utilizó lentes de contacto no recubiertas. Las diferentes uniones entre las células se ajustaron en todas las micrografías tomadas tanto de córneas experimentales como de control. Además, las microvellosidades no se vieron afectadas en todas las micrografías de ambos grupos. No hubo evidencia de un aumento en el desprendimiento en las córneas experimentales según lo evaluado por la frecuencia de las células más jóvenes frente a las células más viejas. Se piensa que las células más pequeñas y más claras son las células más jóvenes recién surgidas, mientras que las células más viejas son más oscuras y más grandes. Por lo tanto, la superficie del epitelio corneal de conejo parecía no afectarse por el recubrimiento de Se, incluso bajo un aumento muy elevado.

Finalmente, las córneas se evaluaron histológicamente al final de 2 meses de uso continuo. Ninguna de las córneas experimentales y de control mostraron un efecto por el uso de lentes de contacto. En particular, el epitelio y endotelio corneales parecían completamente normales. Esto también presenta una fuerte evidencia de que el recubrimiento de Se no creó ningún daño a las córneas de conejo.

Los datos de este estudio piloto indican que un recubrimiento de Se sobre las lentes de contacto debería hacer que el uso de las lentes de contacto más libre del ojo rojo agudo y la ulceración bacteriana debido a una inhibición de la colonización bacteriana. Además, los ensayos de seguridad sugieren que este efecto positivo podría producirse sin un efecto adverso sobre la salud corneal. Finalmente, los resultados positivos de este estudio sugieren que puede haber muchos otros usos de esta tecnología. Por ejemplo, informes recientes de queratitis y úlceras bacterianas en ortoqueratología o pacientes con terapia de refracción corneal sugieren que los recubrimientos de Se podían ser también de valor con lentes rígidas de uso prolongado permeables al gas.

Ejemplo 2: Esponjas de celulosa – inhibición del crecimiento celular

La capacidad de las esponjas tratadas con selenio para modular el crecimiento de fibroblastos humanos se realizó utilizando un compuesto de selenio protegido, covalentemente unido a una esponja Week de celulosa. La quimioluminiscencia dependiente de la lucigenina se utilizó para semi cuantificar el contenido de selenio y la producción de superóxido generado por el ácido selenocianatopropiónico unido covalentemente (-CN es el grupo protector).

El selenio covalente y las esponjas de control se ensayaron para su capacidad para inhibir el crecimiento celular *in vitro*. La actividad de las esponjas recubiertas de selenio se ensayó midiendo la incorporación de un radiomarcador, timidina tritiada, en el DNA de células que crecen adyacentes a la esponja. Las células de fibroblastos humano se cultivaron hasta aproximadamente el 75% de confluencia en cultivo y después se desprovieron de suero (suero de ternero fetal al 0%) durante 4 días. Al final de los 4 días, las esponjas con y sin selenio unido covalentemente se suspendieron encima de los fibroblastos humanos en cultivo de tejido por medio de un elemento filtrante colocado en el pocillo de cultivo de tejido. Estas células de fibroblastos son altamente proliferativas y un buen modelo para la proliferación e invasividad celular agresiva. Las células se trataron después con suero de ternero fetal al 10% durante 24 horas, y timidina-³H se añadió al final de las 24 horas; 24 horas después, las células se detuvieron y se contaron para la incorporación de timidina en el DNA.

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos con fibroblastos variando las concentraciones de suero de ternera en presencia de esponjas que contienen selenio protegido, unido covalentemente, donde el crecimiento celular se controla mediante la incorporación de la timidina tritiada en el DNA celular. Como puede verse, las esponjas son muy efectivas para bloquear el crecimiento de los fibroblastos en presencia de suero al 10%, que contenía varios factores de crecimiento diferentes.

Ejemplo 3: Fijación de selenio a las lentes intraoculares (IOLs)

La capacidad de unir un compuesto de selenio de la presente invención no covalentemente a un plástico se demostró utilizando una lente intraocular (IOLs). Una lente intraocular (o IOL) es una lente implantada en el ojo, normalmente reemplazando la lente cristalina existente porque ha sido nublada por una catarata, o como una alternativa a la cirugía refractiva cuando este procedimiento está contraindicado. Las IOLs están formadas típicamente de un plástico tal como pero no limitado a, acrílico, silicona o polimetil metacrilato (PMMA).

En este estudio, 6 mg/ml de diseleniuro de difenil (DPDS) se añadieron a la IOL, y la mezcla se calentó a 50-52,5°C durante 30 minutos. Las IOLs tratadas se separaron después de la solución y se dejaron secar. La Tabla IV muestra que este procedimiento dio como resultado una lente que producía quimioluminiscencia sin lixiviación significativa del compuesto de selenio, y por lo tanto la temperatura y la mezcla lograron el marcaje de selenio mediante inclusión hidrofóbica.

Esto demostró que la solución sin DTT (la solución no reducida) provocó más absorción del DPDS no covalente, y que ninguna de las DPDS unidas de forma no covalente estaban lixivando.

Tabla IV

Concentración final de DPDS	DDT presente?*	Quimioluminiscencia (cuentas/10s)**
6 mg/ml	Si	28
3 mg/ml	Si	33
1,5 mg/ml	Si	26
6 mg/ml	No	48
3 mg/ml	No	37
1,5 mg/ml	No	92

*Presencia de DDT reducido

**El nivel base de quimioluminiscencia fue 20 cuentas/10s.

Además, el tratamiento con oxígeno de las IOLs utilizando un tratamiento de plasma permitió la unión del selenio a un plástico con IOL utilizando un compuesto de selenio protegido. La IOL de silicona se colocó en una cámara de plasma y se trató después con plasma en presencia de gas oxígeno. La lente se colocó después en una solución tampón a pH 5,8 con EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) y sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida), y los restos carboxilo creados en la superficie de la lente se unieron con el grupo succinimida. Esta lente activada se hizo reaccionar después con selenocianatopropil amina.

El diseño experimental para este procedimiento fue el siguiente:

La IOL se activó lavando en agua de grado analítico, colocándola en un pocillo de una placa de cultivo tisular, y añadiendo 1 ml de una solución preparada disolviendo 540 mg de sulfo-NHS y 480 mg de EDC en 100 ml de tampón MES 0,25M, pH 6,0. La placa se colocó en un agitador y se dejó agitar constantemente durante 2 horas, y después cada IOL se lavó con agua de grado analítico 3 veces.

Una solución de selenocistamina se preparó disolviendo 400 mg de selenocistamina·2HCl en 40 ml de agua y 40 ml de etanol, y una solución de 210 mg de NaHCO₃ en 20 ml de agua se añadió después en la solución anterior.

El acoplamiento del compuesto de selenio a la IOL se llevó a cabo transfiriendo 1 ml de la solución de selenocistamina anterior a los pocillos de la placa de cultivo tisular. Las placas se mantuvieron en la oscuridad mediante el uso de papel de aluminio, y se dejaron agitar constantemente durante la noche (12 horas como mínimo). La solución se eliminó después y las lentes se trataron con 2 ml de glutatión 0,15 mM (4,6 mg/100 ml de solución salina normal) durante una hora. Las IOLs se lavaron después dos veces con etanol y dos veces con agua. Las IOLs se pusieron después en dos botellas que contenían 2 ml de solución salina normal y se esterilizaron en autoclave.

Los resultados de quimioluminiscencia para este experimento se muestran en la Tabla V.

Tabla V. Resultados de quimioluminiscencia del tratamiento en plasma de IOL con compuestos de selenio protegidos

	Cuentas	Base
Oxígeno-cátodo	468	35
Oxígeno-anodo	122	15

Ejemplo 4: Inclusión hidrofóbica de los compuestos de selenio en silicio y compuestos acrílicos.

Además de los experimentos de inclusión hidrofóbica descritos anteriormente, también se demostró la inclusión hidrofóbica de un compuesto de selenio protegido en un agente de unión. En este experimento de mezcla hidrofóbica, un compuesto de selenio que comprende un grupo protector CN [2-(selenocianatoacetoxi)butoxietil metacrilato] se mezcló con el agente de unión 2-(acetoacetoxi)etilmetacrilato (AAEMA) hasta una concentración final de selenio del 5%. La composición de selenio se aplicó después a una superficie, tal como, un plástico de PMMA o una uña de pie humano (los resultados con ambas superficies fueron los mismos), preferiblemente a una concentración de aproximadamente 100 mg/cm². La capacidad del agente de unión modificado con selenio para generar los radicales superóxidos se midió después mediante luminiscencia, como se muestra en la Figura 15. En la Figura 15, "crudo1" y "crudo 2" se refieren a una mezcla del material marcado con selenio con AAEMA; "puro" se refiere al compuesto marcado con selenio puro (no AAEMA); "blanco" se refiere al AAEMA sin selenio; para "plástico separado", el plástico recubierto de mezcla se empapó en agua, y luego después de separar del plástico, la solución acuosa se ensayó para cualquier selenio que pudiera haberse desprendido. Este experimento demuestra que el compuesto de selenio protegido puede mezclarse con un agente de unión y recubrirse sobre una superficie y dejarse secar y aun así demostrar quimioluminiscencia sin lixiviación significativa. El hecho de que hubiese muy poco conteo presente en la muestra de "plástico separado" indica que el compuesto de selenio permaneció asociado con el plástico tratado con AAEMA.

Técnica 6: Inhibición de HIV con un compuesto de péptido-selenio protegido

Para este experimento, HIV se incubó con un selenopéptido protegido que comprende ácido selenocianatopropiónico unido al grupo amino en la treonina amino terminal del siguiente péptido: T-Y-I-CbzI-EbzI-V-E-D-Q-K-E-E; donde T = treonina; Y = tirosina; I = isoleucina; C = cisteína; E = ácido glutámico; V = valina; D = ácido aspártico; Q = glutamina; K = lisina; bzI es un grupo protector de benzilo (en la cisteína es un grupo S-bencilo). HIV se incubó con el selenopéptido protegido durante 2 horas a 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 10µg/ml y 100 µg/ml. El glutatión se añadió a la solución para activar el virus, y al final de ese tiempo el virus se diluyó y después se permitió infectar las células apropiadas que crecían en el cultivo. El número de células infectadas

se determinó por la formación de sincitios. Esto proporcionó una medida del número de partículas virales infecciosas.

Los datos resultantes se muestran en la Figura 16. Estos datos muestran que una baja concentración de selenopéptido (10 μ M) puede inactivar el HIV en un corto periodo de tiempo.

Ejemplo 5: Compuestos de selenio con diferentes grupos protectores

Es importante que los grupos protectores unidos a los compuestos de selenio de la presente invención se eliminen fácilmente mediante compuestos tales como tioles, porque los grupos protectores permiten la síntesis de fármacos de selenio, dispositivos de selenio o recubrimientos de selenio, que no son di-seleniuros. Los diseleniuros pueden producir enlaces cruzados y liberar un compuesto de selenio tóxico a partir del fármaco, dispositivo o recubrimiento. En contraste, la eliminación de los grupos protectores descritos y reivindicados aquí no da como resultado la producción de un compuesto tóxico, demostrando así una de las ventajas de los compuestos de selenio de la presente invención.

Se han llevado a cabo diversos ensayos con cianato como grupo protector y se han descrito aquí anteriormente en Ejemplos previos. Ensayos adicionales se llevaron a cabo con otros grupos protectores potenciales tales como haluros (es decir, cloruro, bromuro, yoduro), compuestos que contienen nitrógeno tales como N-(fenilseleno)ftalimida (NPPD), y los anhídridos mixtos tales como uno entre el ácido fenil selenínico y ácido acético (PSAA). La Tabla VI contiene los datos que demuestran que los compuestos de selenio que contienen estos grupos protectores son capaces de activarse por la presencia de tioles similares a aquellos que se encuentran en entornos *in vivo* y así generar radicales superóxidos.

La Tabla VI muestra la capacidad de estas clases adicionales de compuestos de selenio protegidos para generar radicales superóxidos en solución acuosa incluso a pesar de que no son muy solubles en agua por encima de una base de 1-2 cpm.

Tabla VI. Actividad de los compuestos de selenio con diferentes grupos protectores

Compuesto	Cuentas/min Formación de superóxido
Selenocloruro de fenilo	724
Selenobromuro de fenilo	830
Selenioduro de fenilo	1.130
NPPD	84
PSAA	93
Ácido selenocianatopropiónico	2.924

Otra clase de grupos protectores que entran dentro del alcance de la presente invención son grupos protectores solubles en agua. Ejemplos de grupos protectores solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, sulfato, nitrato, fosfato y carbonato unidos al selenio de la molécula de organo selenio de la presente invención. Estos grupos protectores solubles en agua son importantes debido a su capacidad para conferir la solubilidad en agua a los compuestos de organo selenio de la presente invención. La Tabla VII muestra que un compuesto de organo selenio que contiene sulfato como grupo protector puede activarse con glutatión. Para este experimento, sulfoselenoetil amina ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-SO}_3\text{H}_2$) se disolvió en tampón que contiene glutatión (100 μ M) y Lucigenina a pH 7,4, y estos datos demuestran que este compuesto se puede activar con glutatión. Otros grupos protectores solubles en agua funcionarían de una manera similar, y por lo tanto están incluidos dentro del alcance de la presente invención.

Tabla VII

Compuesto	Quimioluminiscencia (cpm)
Sulfo selenoetil amina	562
Blanco	36

Además, un compuesto de selenio que contiene un grupo protector CN se unió covalentemente al silicio para formar trimetilsililselenocianato. La quimioluminiscencia (CL) de este compuesto se midió a intervalos de 30 segundos, pH 7,3 y 36°C. La actividad de este compuesto se muestra en la Tabla VIII.

Tabla VIII

Tiempo transcurrido (minutos)	Quimioluminiscencia
0,5	99
1,5	474

2,0	431
2,5	408
3,0	382
3,5	343
4,0	290
4,5	268
5,0	262
5,5	228

La actividad de este compuesto demuestra la capacidad de unir una forma protegida de selenio a la silicona y mantener la actividad para generar radicales superóxidos. Por lo tanto, estos resultados demuestran una nueva clase de compuestos que se podrían utilizar para biomateriales y fármacos.

- 5 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se ha proporcionado un método para producir formulaciones biocidas basadas en selenio que satisfacen completamente los objetivos y ventajas expuestas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir el crecimiento de una célula viva y/o un organismo vivo en un sustrato sólido, que comprende las etapas de:
- 5 proporcionar un sustrato sólido, en donde el sustrato sólido no es un cuerpo humano o animal;
 aplicar una matriz polimérica que comprende una cantidad efectiva de un compuesto de selenio al sustrato sólido, en donde el compuesto de selenio se selecciona del grupo que consiste en RSeH, RSeR', RSeSeR, RSeSeR', y RSeX, en donde R y R' son cada uno un resto alifático o fenólico, en donde R comprende un grupo reactivo que une el compuesto de selenio al sustrato sólido mediante la matriz polimérica, y en donde X es un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en -O-R, -S-R, un halógeno, una imida, un cianuro, una azida, un fosfato, un sulfato, un nitrato, un carbonato, y dióxido de selenio, y en donde el compuesto de selenio se asocia de manera no covalente con el sustrato sólido mediante la matriz polimérica; y
- 10 en donde cuando el compuesto de selenio se llega a poner en contacto con y se une a una superficie de la célula viva y/o organismo vivo, se forman el anión de selenio Se- y las especies de radicales libres, y las especies de radicales libres inhiben y/o inactivan dichas células vivas y/o organismos vivos, evitando de este modo el crecimiento de la célula viva y/o organismo vivo en el sustrato sólido, y en donde el anión de selenio Se- permanece unido a la superficie del sustrato sólido mediante la matriz polimérica después de generar el anión de selenio Se- y las especies de radicales libres, tal que el anión de selenio puede generar continuamente especies de radicales libres adicionales cuando entran en contacto con células vivas y/o organismos vivos adicionales.
2. El método de la reivindicación 1 en donde la célula viva y/o un organismo vivo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, moho, hongos, parásitos de protozoos, células vegetales, células animales, materiales biológicos y combinaciones de los mismos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la composición de selenio comprende una fórmula seleccionada del grupo que consiste en R-Se-CN, R-Se-Cl, R-Se-Br, R-Se-I, R-Se-N₃, R-Se-S-R, y R-Se-O-R.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad efectiva del compuesto de selenio está en un intervalo de 0,01 µg a 100 µg de selenio elemental por centímetro cuadrado de área de superficie del sustrato sólido.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de aplicar una cantidad efectiva de un compuesto de selenio a un sustrato sólido se define además como la incorporación de un compuesto de selenio en una composición de recubrimiento que se aplica al sustrato sólido.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz polimérica comprende 2-(acetoacetoxi)etil metacrilato.
7. El método de la reivindicación 1, en donde cada uno de R y R' es un resto alifático que contiene al menos un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en grupos reactivos aldehído, carboxílico, amino, alcohólico, fosfato, sulfato, halógeno, fenólico y combinaciones de los mismos.
8. El método de la reivindicación 1, en donde R se selecciona del grupo que consiste en -(CH₂)_nHN₂, --(CH₂)_nCOOH, y -(CH₂)_n-Φ, en donde n es un número entero mayor de 1.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el compuesto de selenio se selecciona del grupo que consiste en NH₂CH₂CH₂SeCH₃ (RSeR'), NH₂CH₂CH₂SeCH₂CH₂NH₂ (RSeR), NH₂CH₂CH₂SeSeCH₂CH₂NH₂ (RSeSeR), NH₂CH₂CH₂SeSeCH₂CH₂NH₂-celulosa (RSeSeR'), y NH₂CH₂CH₂SeCN (RSeX).
10. El método de la reivindicación 1, en donde la prevención del crecimiento ocurre a 4°C.
11. El método de la reivindicación 1, en donde la célula y/o organismo vivo comprende un agente infeccioso.
12. El método de la reivindicación 1, en donde la matriz polimérica comprende una cantidad efectiva del compuesto de selenio selenocianatoacetoxi butoxietil metacrilato.

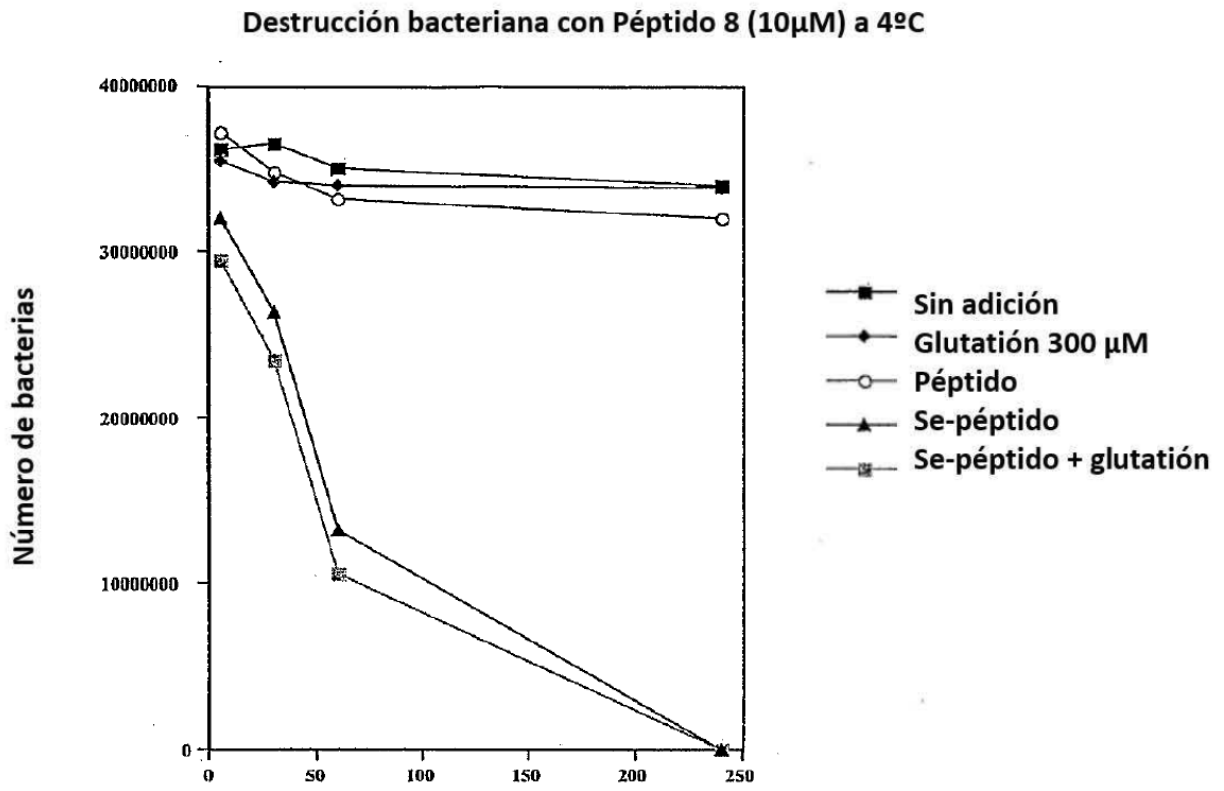


Figura 2: Supervivencia de bacterias que expresan el antígeno F1 a 4°C utilizando un seleno-péptido 10 µM

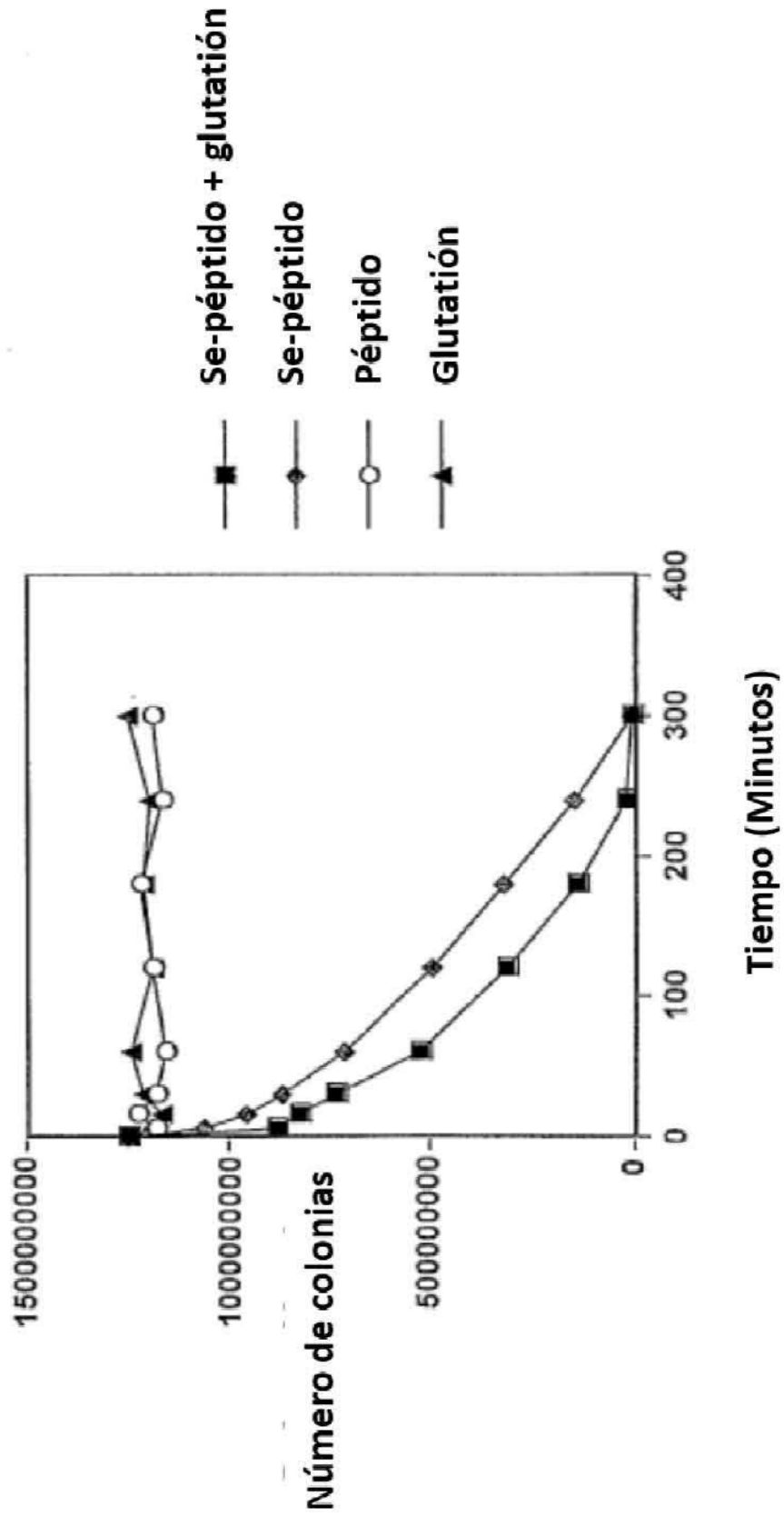


Figura 3
Destrucción de bacterias por el péptido de selenio a 25°C y 10 µM

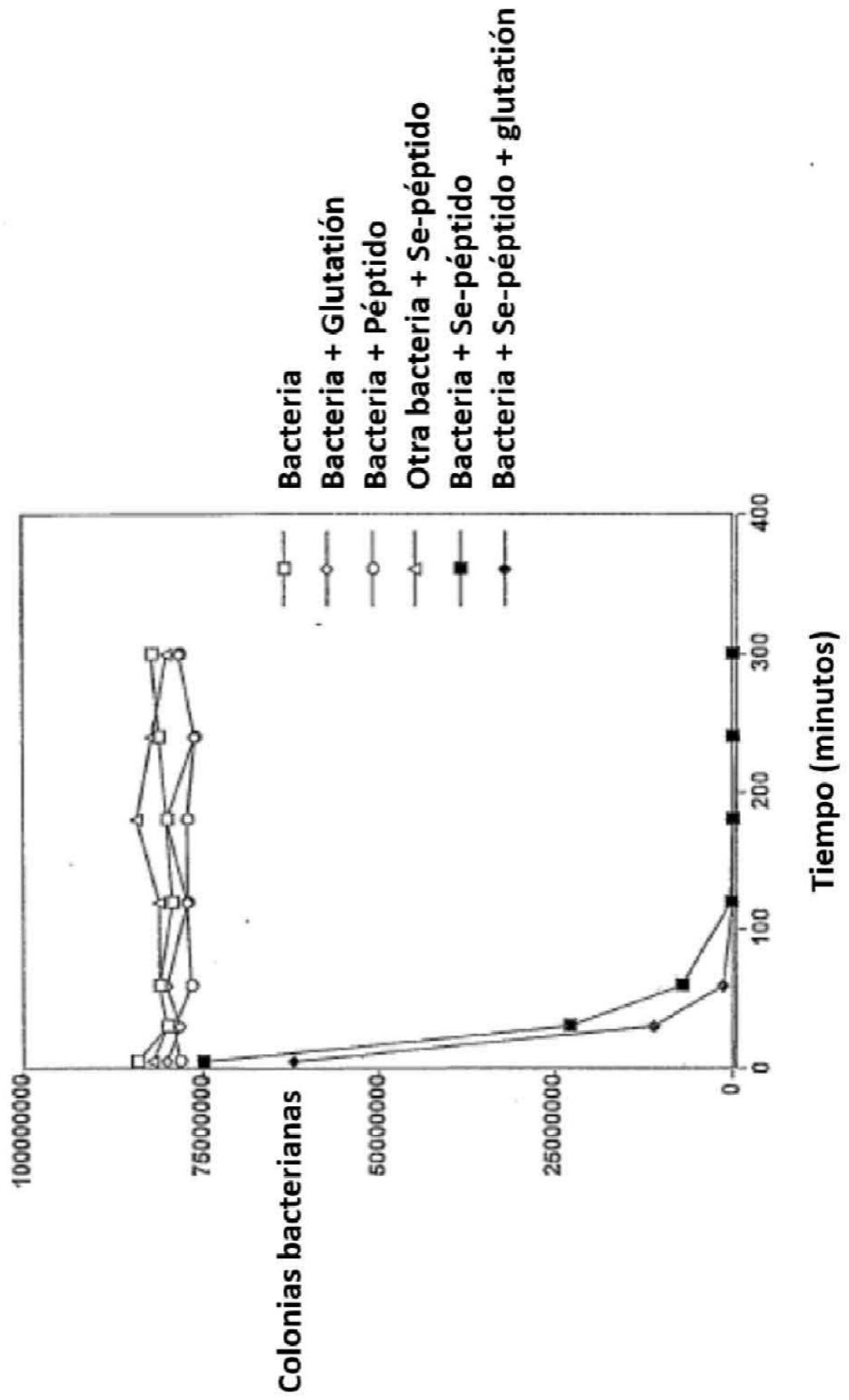
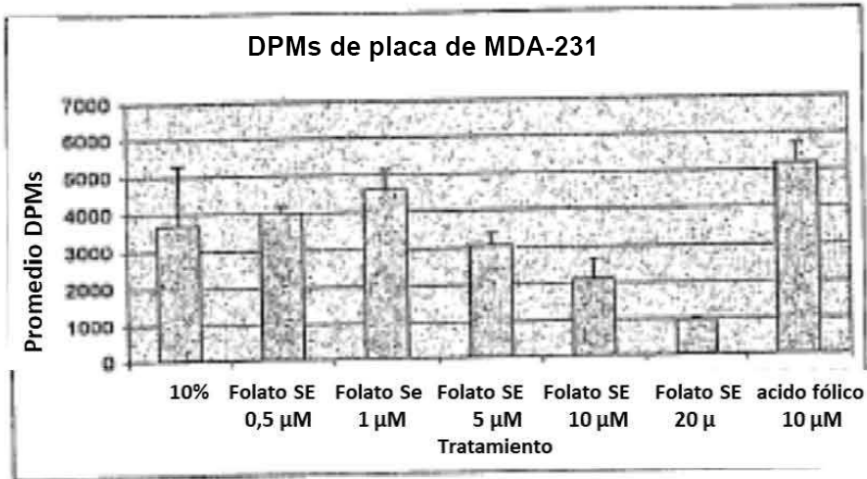


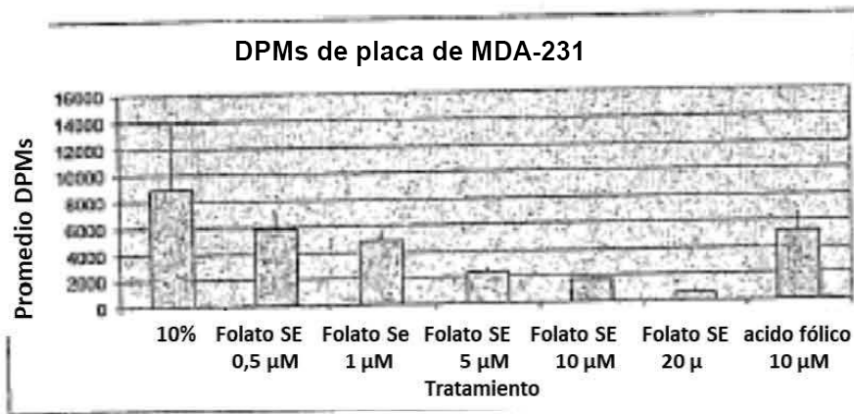
Figura 4

Figura 4A



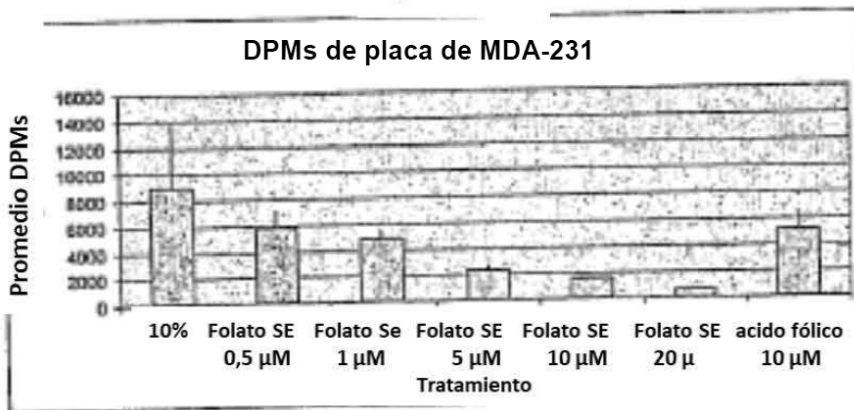
24 horas

Figura 4B



72 horas

Figura 4C



120 horas

Figura 5

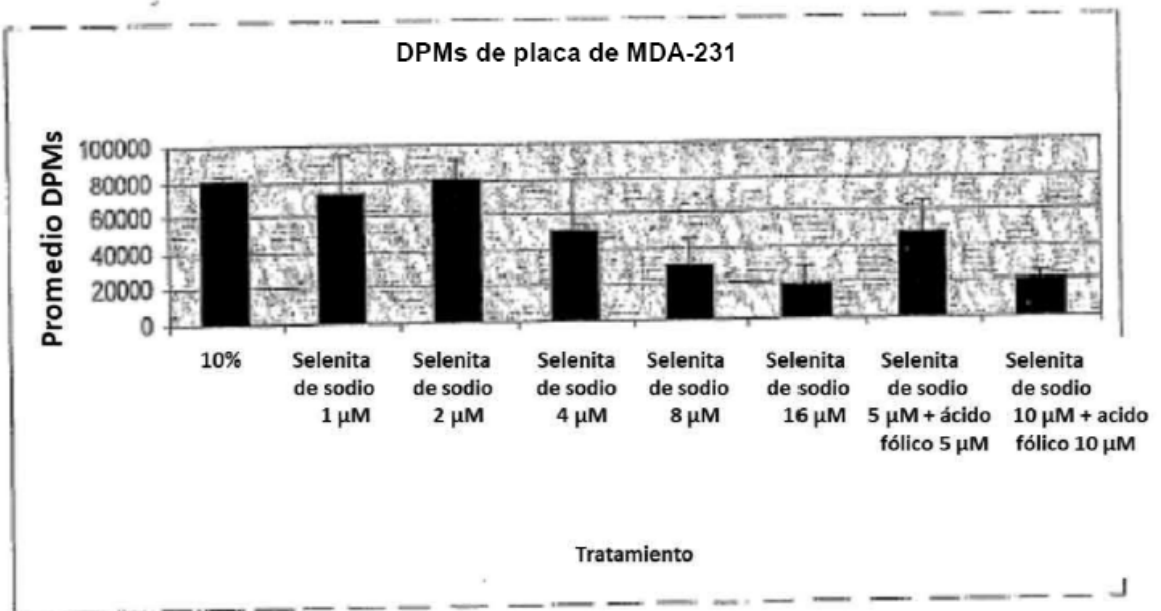


Figura 6

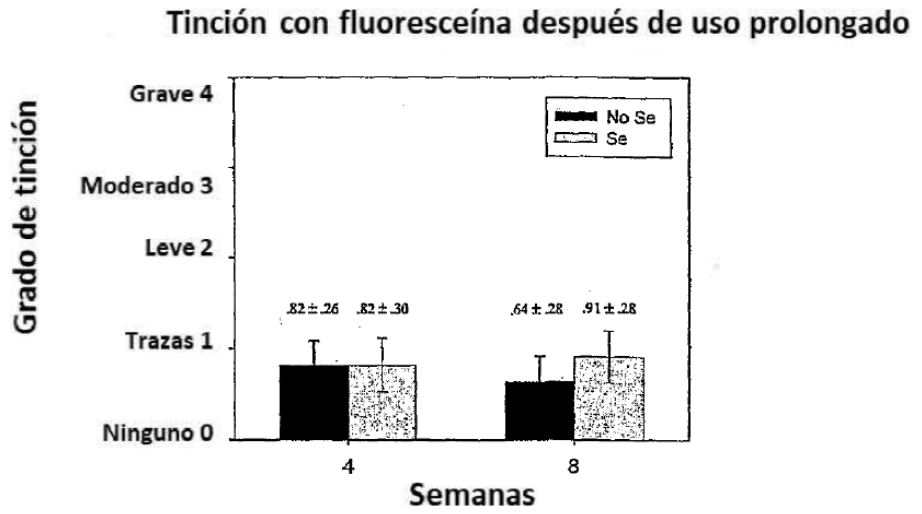


Figura 7

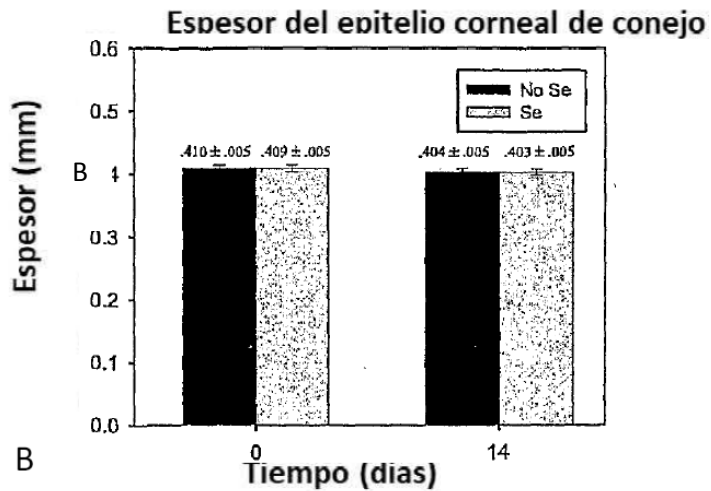
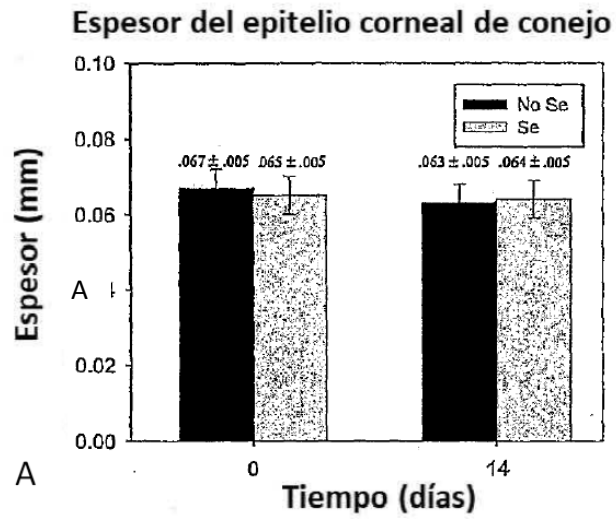
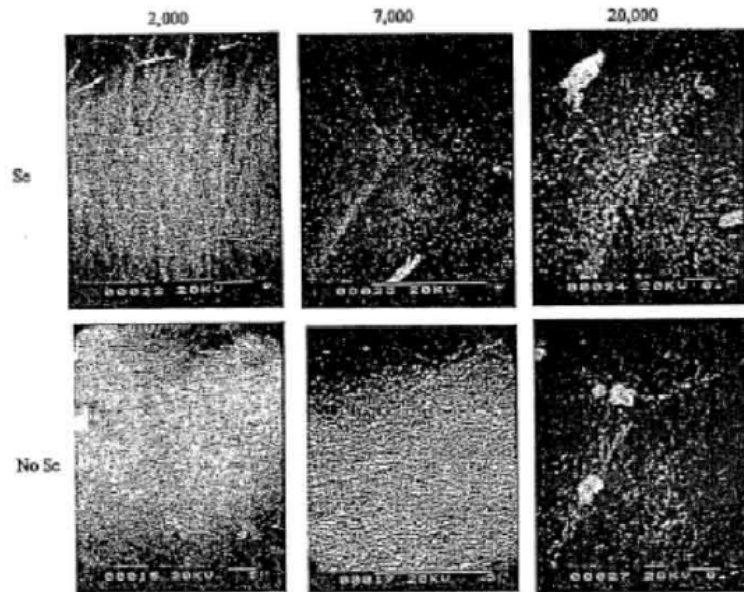
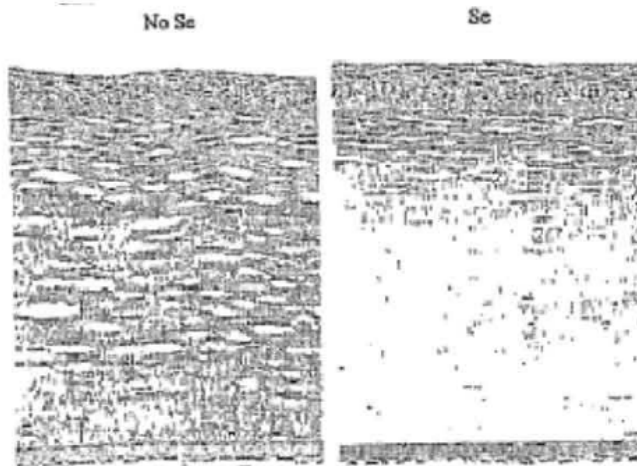


Figura 8



Córnea de conejo después de dos meses de uso de lentes de contacto

Figura 9



Pseudomonas Aeuroginosa en lentes de contacto *in vitro*

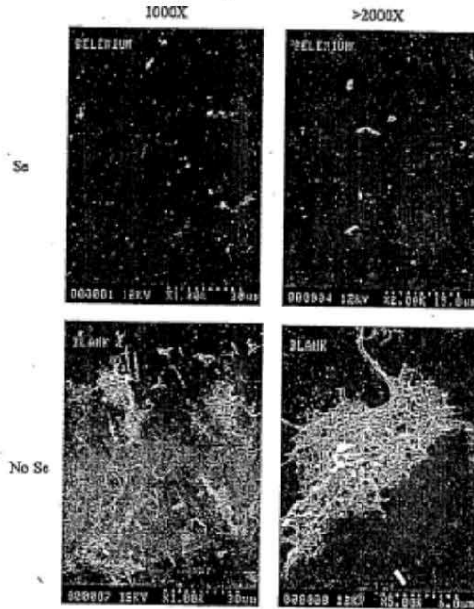


Figura 10

Promedio de deposición de Proteínas después de 2 semanas

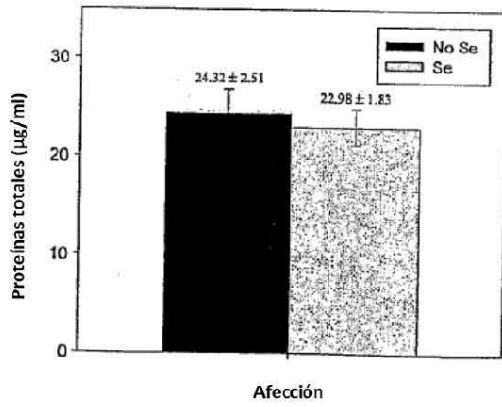


Figura 11

Promedio de deposición de Proteínas después de 2 semanas

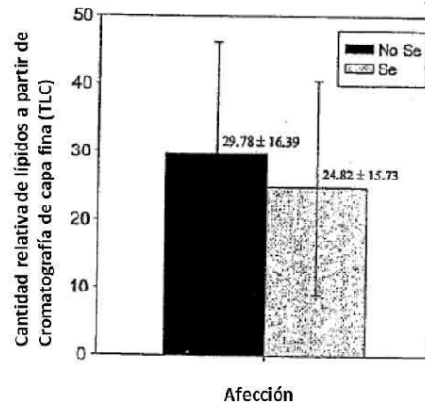


Figura 12

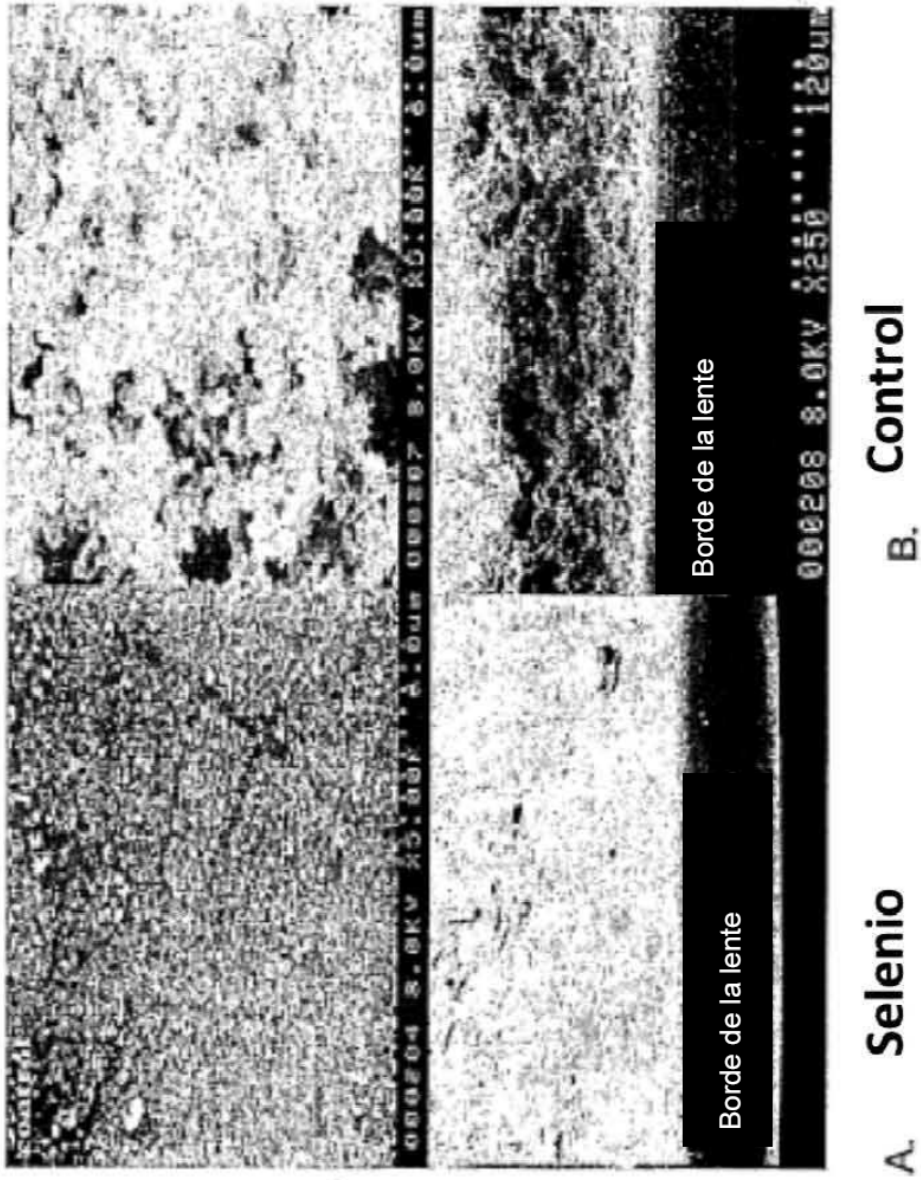


Figura 13

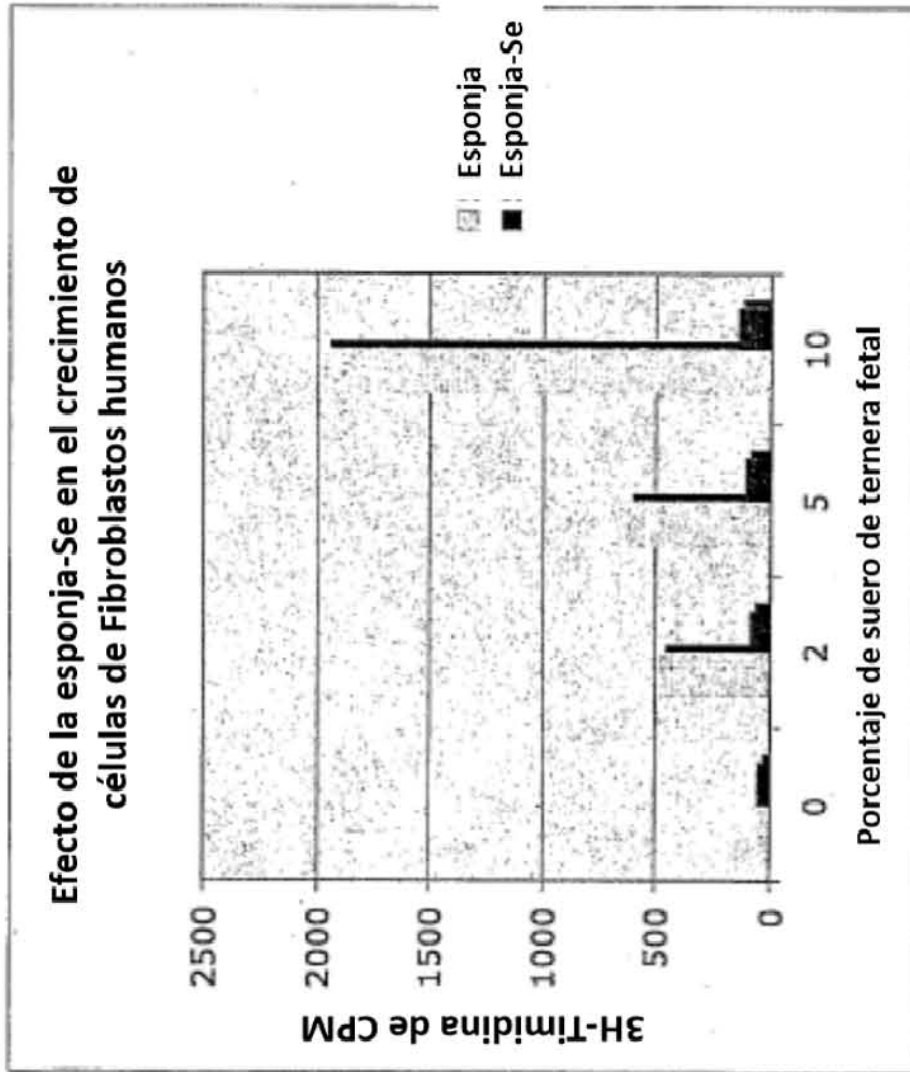
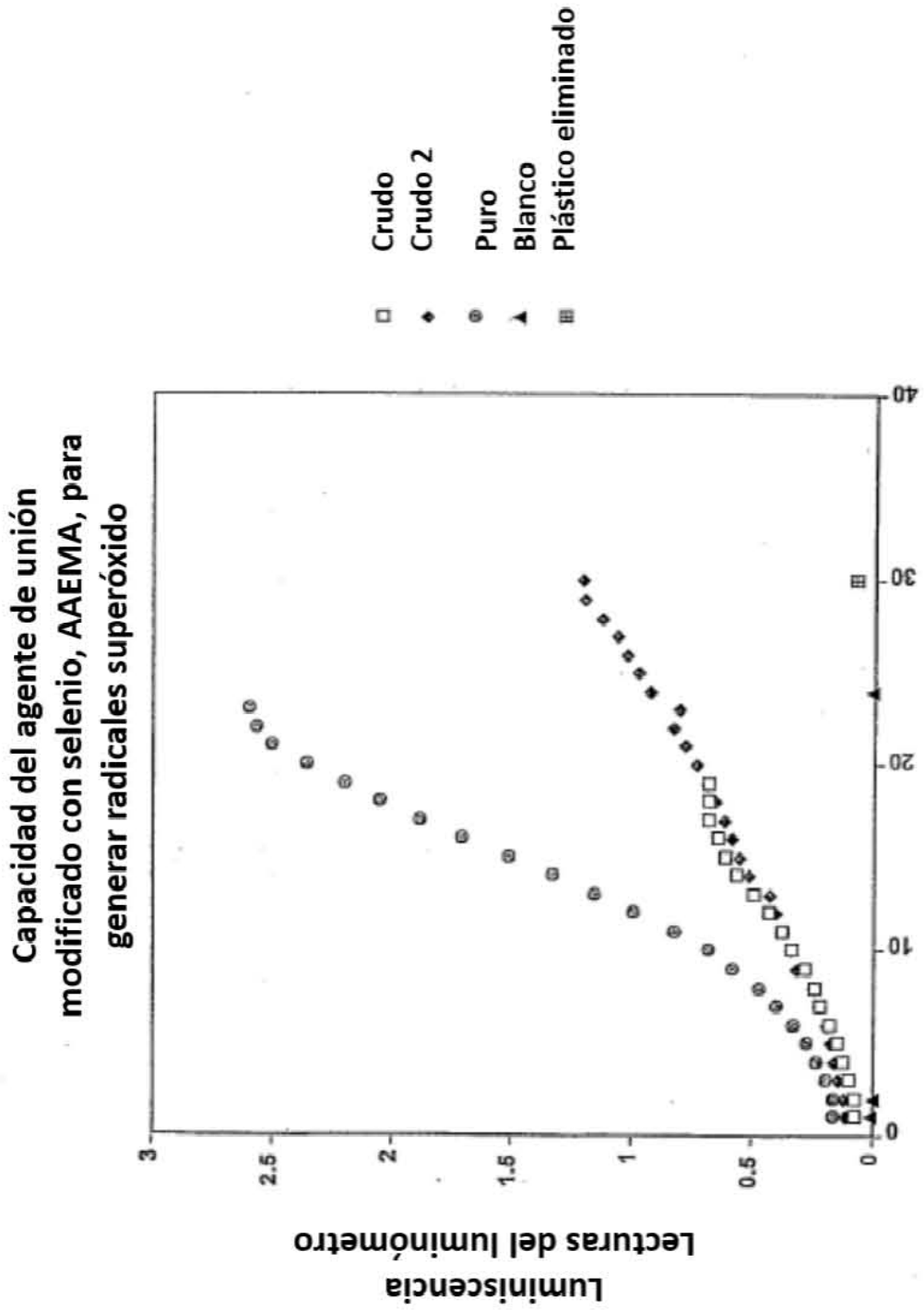


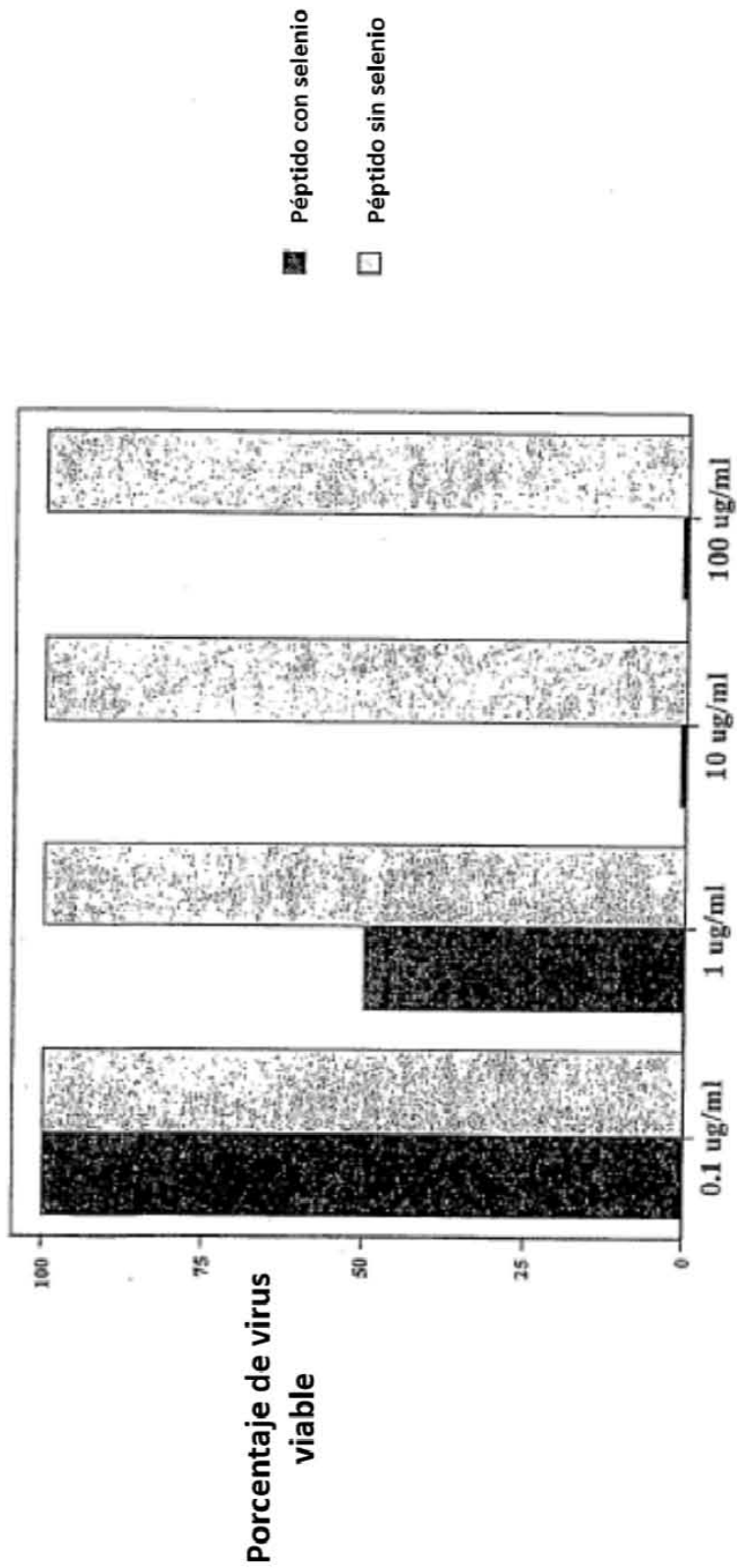
Figura 14



Número de lectura (aprox. Cada 30 segundos)

Figura 15

Inhibición de HIV con un péptido
con o sin selenio



Concentración de Péptido
Figura 16