

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-209385

(P2013-209385A)

(43) 公開日 平成25年10月10日(2013.10.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 7 6
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/197 (2006.01)	A 6 1 K 31/197	4 C 0 8 6
A 6 1 K 33/18 (2006.01)	A 6 1 K 33/18	4 C 2 0 6
A 6 1 K 33/38 (2006.01)	A 6 1 K 33/38	

審査請求 有 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-98416 (P2013-98416)	(71) 出願人	509146126 コンバテック・テクノロジーズ・インコーポレイテッド CONVATEC TECHNOLOGIES INC アメリカ合衆国89169-6754ネバダ州 ラスベガス、スウィート250、ハワード・ヒューズ・パークウェイ3993番
(22) 出願日	平成25年5月8日(2013.5.8)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恭生
(62) 分割の表示	特願2008-545092 (P2008-545092)の分割	(74) 代理人	100100158 弁理士 鮫島 睦
原出願日	平成18年12月14日(2006.12.14)	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(31) 優先権主張番号	0525504.7		
(32) 優先日	平成17年12月14日(2005.12.14)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗菌組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗生物質以外の皮膚および創傷への使用に適する殺菌組成物を提供すること。

【解決手段】 ヨウ素、イオン銀または酸化剤(例えば次亜塩素酸ナトリウムまたは二酸化塩素)からなる抗菌剤源、およびEDTA(エチレンジアミン四酢酸)からなるバイオフィルムを破壊する薬剤を含む、感染の予防または治療のために、皮膚、創傷、切り傷、擦過傷または熱傷に適応することができ、特に、創傷および皮膚の炎症、ならびに創傷治療の遅延を回避すると同時に効果的な抗菌活性を呈することができる殺菌組成物。

【選択図】 なし

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
 抗菌剤源およびバイオフィルムを破壊する薬剤を含むことを特徴とする、皮膚および創傷への使用に適する殺菌組成物。
- 【請求項 2】
 バイオフィルムを破壊する該薬剤がEDTAであることを特徴とする、請求項1に記載の殺菌組成物。
- 【請求項 3】
 該抗菌剤がヨウ素、イオン銀または酸化剤（例えば次亜塩素酸ナトリウムまたは二酸化塩素）の群から選択されることを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の皮膚および創傷への使用に適する殺菌組成物。 10
- 【請求項 4】
 pH4～8にてEDTAのジ-、トリ-およびテトラ-塩基性塩を含むことを特徴とする、創傷への使用に適する組成物。
- 【請求項 5】
 該組成物のpHが4と8の間であることを特徴とする、請求項1～3に記載の組成物。
- 【請求項 6】
 該組成物のpHが4.5と5.5の間であることを特徴とする、請求項1～4に記載の組成物。
- 【請求項 7】
 形態がゲルである、上記請求項のいずれかに記載の組成物。 20
- 【請求項 8】
 該組成物がヨウ素を含むことを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の組成物。
- 【請求項 9】
 ヨウ素源、酸化剤および緩衝液を含む組成物であって、該ヨウ素は使用時まで該酸化剤と分かれて保持されていることを特徴とする、上記請求項のいずれかに記載の組成物。
- 【請求項 10】
 該組成物がヨウ素5 μ g/組成物g/時間～ヨウ素1500 μ g/組成物g/時間を生じることができることを特徴とする、請求項9に記載の組成物。
- 【請求項 11】
 該組成物がイオン銀を含むことを特徴とする、請求項1～6に記載の組成物。 30
- 【請求項 12】
 該組成物がイオン銀を0.1～10重量%、より好ましくは0.5～1.5重量%含むことを特徴とする、請求項11に記載の組成物。
- 【請求項 13】
 水溶液に四ナトリウム塩としてEDTAを加え、ついで該組成物のpHをpH4～8に調整する工程を含むことを特徴とする、請求項4に記載の殺菌組成物の調製方法。
- 【請求項 14】
 慢性的創傷および熱傷の治療における使用のための薬物の製造における、抗菌剤およびバイオフィルムを破壊する薬剤を含む殺菌組成物の使用。 40
- 【請求項 15】
 バイオフィルムを破壊する薬剤がEDTAであることを特徴とする、請求項14に記載の殺菌組成物の使用。
- 【請求項 16】
 該抗菌剤がヨウ素、イオン銀または酸化剤（例えば次亜塩素酸ナトリウムまたは二酸化塩素）の群から選択されることを特徴とする、請求項14または請求項15に記載の殺菌組成物の使用。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
 本発明は、感染の予防または治療のために、皮膚、創傷、切り傷、擦過傷または熱傷に 50

適応することができる抗菌組成物に関する。特に、本発明は創傷および皮膚の炎症、ならびに創傷治癒の遅延を回避すると同時に効果的な抗菌活性を呈することができる組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

抗生物質の濫用および関連する菌耐性の増加が創傷感染の治療における抗生物質の効力に影響を及ぼしており、効果的な抗生物質の代替が望まれている。

【0003】

局所性抗菌物質およびそれらを含む製剤は、皮膚および創傷感染の機会を最小限にするために重要な役割を果たすことが長期にわたり認められてきた。殺菌剤は生体組織に使用するのに安全でありうる非選択的化学剤である。ヨウ素分子、イオン銀および酸化剤（例えば次亜塩素酸ナトリウムおよび二酸化塩素）は、広い範囲の微生物に対して有効な殺菌剤と認められている。しかしながら、このような薬剤に基づいて創傷に適用するための効果的な抗菌組成物を創るにはいくつかの障害がある。一つの問題は、これらの殺菌剤は対象標的微生物以外の創傷にある有機物質と反応しがちであることである。これは、効果的であるために殺菌剤は治療組成物中に高濃度で含まれる必要があることを意味し、この結果、長期使用によって望ましくない副作用（例えば細胞毒性、過敏症反応、皮膚の染色および全身作用）が引き起こされうる。このような副作用は、“*In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care*”. Poon VK, Burd A. *Burns*. 2004 Mar;30(2):140-7, “*A review of iodine toxicity reports*”. Pennington JA. *J Am Diet Assoc*. 1990 Nov;90(11):1571-81 および “*Topical antimicrobial toxicity*”. Lineaweaver W, Howard R, Soucy D, McMorris S, Freeman J, Crain C, Robertson J, Rumley T. *Arch Surg*. 1985 Mar;120(3):267-70. にさらに記載される。

10

20

【0004】

創傷はしばしば種々の微生物に侵され、感染を引き起こすことがある。バイオフィルム環境内に生きる微生物群が治癒の遅延および感染の一因となることが次第に認識されている。バイオフィルムはバクテリアが表面に付着するとそれらにより作り出されるエキソポリメリック物質から成り、これは免疫細胞および抗菌剤から微生物を保護するのに役立つ。抗菌剤（例えば抗生物質および殺菌剤）の効力はバイオフィルムマトリックスによって低下するため、バイオフィルムを破壊して内部の微生物を露出するためのストラテジーが、抗菌剤の活性レベルを増加させて、その結果、効果的な組成物を調製するために必要とされる該薬剤の濃度を減少するのに役立つ。

30

【0005】

ジ-ナトリウムまたはカルシウム ジ-ナトリウム塩として加えられたエチレンジアミン四酢酸(EDTA)は、局所性感染の治療または硬表面（カテーテルなど）の処置に使用されてきた。WO03/047341にEDTAの使用（例えば練り歯磨きの添加剤として）が記載されている。EDTAは水の硬度の影響を減らすための組成物としても使用され、また一般にキレート剤としても使用される。

【0006】

EDTAの他の抗菌剤との組み合わせが言及されている（例えばUS 5998488）。それは眼科用の溶液に抗菌性防腐剤と組み合わせて使用される。創傷の局所使用に適する製剤は提示されていない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題と課題を解決するための手段】

【0007】

従って、抗菌剤の利点を有するが副作用の可能性の低い組成物が求められている。驚くべきことに、我々はEDTAがバイオフィルムマトリックスの完全性を維持する金属イオン、カルシウムおよびマグネシウムをキレートすることによって、バイオフィルムを破壊できることを発見した。

【0008】

50

従って、本発明の第一の態様は、殺菌剤源およびバイオフィルムを破壊する薬剤（例えばEDTAなど）を含む、皮膚および創傷への使用に適する抗菌組成物を提供する。

【0009】

EDTAの存在によって、該殺菌剤の効果が高まり、殺菌剤の濃度を減らしてもなお効果的な殺菌を達成しうる。該殺菌剤の有効性が高まることで、該組成物におけるその濃度を減らすことができ、それにより、副作用の可能性も減る。

【0010】

本発明のこの態様は、殺菌剤を少なくとも50%少なく、より好ましくは50~60%少なく、理想的には65~85%少なく使用して、バクテリアの生体負荷（bioburden）を24時間内にホストにより制御できるレベルにまで減らすことができる組成物の調製を可能とする。10
ついで、これより該創傷は治癒が進み、該創傷が視覚的に改善することによって証明されることができる。

【0011】

我々はまた創傷で通常認められるpH条件下で効果がある、EDTAを含有する組成物を調製できることを発見した。

【0012】

従って、本発明の第2の態様は、pH4~8にてEDTAのジ-、トリ-およびテトラ-塩基性塩を含む、創傷への使用に適する組成物を提供する。

【0013】

本発明の第一の態様に従った組成物は、殺菌剤、好ましくはヨウ素分子、イオン銀、クロルヘキシジン、もしくは塩酸、または酸化剤（例えば次亜塩素酸ナトリウム、二酸化塩素、過酸化水素またはペルオキシ酸塩）を含有する。該殺菌剤は、好ましくは0.01~10重量%、より好ましくは0.1~5重量%の濃度で組成物中に含まれる。ヨウ素は、好ましくは0.01~10重量%、より好ましくは0.1~1.0重量%の濃度で組成物中に含まれる。好ましくは、該ヨウ素源はヨウ化物であり、該組成物は酸化剤および緩衝液をさらに含み、該酸化剤は使用時まで該ヨウ素と分かれて保持されている。ヨウ素が生理的に許容されかつ有効な率で生じるように、好ましくは、該緩衝液は該組成物のpHをpH4.5とpH6の間に維持することができる。ヨウ化物および該ヨウ化物と分かれて保持される酸化剤を含む組成物がEP 1158859Bにさらに言及されている。 20

【0014】

ヨウ化物が存在する場合、組成物中の酸化剤の量はヨウ化物と化学量論的に適合するよう調整される。好ましくは、該酸化剤はヨウ素酸塩であり、ヨウ化物とのモル比が1:4~1:10である。この方法において、組成物中に存在する該ヨウ化物は該酸化剤と完全に反応する。ヨウ化物およびヨウ素酸塩は、好ましくはナトリウム塩として存在するが、他の通常の対イオンで存在してもよい。 30

【0015】

殺菌剤がイオン銀である場合、それは好ましくは0.1~10重量%、より好ましくは0.5~1.5%の濃度で組成物中に含まれる。

【0016】

該組成物のpHは、通常8より下であり、好ましくは4と8の間であり、より好ましくは4と6の間であり、最も好ましくは4.5と5.5の間である。所望のpHは、緩衝剤を該組成物に組み入れることによって達成されうる。含まれる緩衝剤の例は、クエン酸/リン酸水素二ナトリウム、クエン酸/クエン酸ナトリウム、酢酸/酢酸ナトリウムである。該緩衝剤は、等張組成物となるために、好都合には、該組成物の約1~20重量%、好ましくは約4~6重量%、特に約5重量%の量で存在しうる。 40

【0017】

EDTAは、好ましくはEDTAのジ-、トリ-またはテトラ-塩基性塩として存在する。我々は、これらの塩は単独でまたは殺菌剤の存在下に、浮遊性またはプランクトン状およびバイオフィルム状の微生物を絶滅させるのに効果的であることを発見した。例えば我々は0.1~40 w/v%濃度のEDTAが様々なプランクトン状およびバイオフィルム状の両方の微生物 50

を殺すのに効果的であることを発見した。EDTAにより効果的に殺される微生物には、緑膿菌、セラチア・マルセセンス、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)およびメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が挙げられる。

【0018】

EDTAは好ましくは本発明のどちらの態様の組成物にも該組成物の0.5~10重量%、より好ましくは1~3重量%の濃度で存在する。

【0019】

本発明の組成物は、湿った創傷治癒環境を維持して治癒を促進する、水性ゲルの形態であり得る。ゲルには、創傷に流れ込んで創傷床に密着して創傷全体に抗菌効果をもたらすという利点がある。好ましくは、該ゲルは、水平でないまたは水平でなくなる体の創傷部から流れ出さないよう十分に高い粘度を有する。好ましくは、該ゲルのpHは、創傷組織周辺のpHバランス変えないで、その結果、それを保護するように、約5.5で緩衝される。

10

【0020】

下記の実施例は、本発明を例証する。

【実施例1】

【0021】

ヨウ素に対するEDTAの影響

一組の水性ゲルを調製し、これらを使用時に密に混合する、ヨウ素およびEDTAを含有する組成物を調製した。下記処方 of 適当な水溶性部の全てを含む水溶液を調製し、その後、非イオン性セルロース増粘剤(viscosifier)(ヒドロキシエチルセルロース)/プロピレングリコールのスラリーを加えて、各ゲルを調製した。

20

【表1】

ゲルA

成分	w/w%
水	100とする
プロパン-1,2-ジオール	10
ヒドロキシエチルセルロース	3.86
ヨウ素酸ナトリウム	0.16
クエン酸	3.99
リン酸ナトリウム	15.06

30

【表2】

ゲルB

成分	w/w%
水	100とする
プロパン-1,2-ジオール	10
ヒドロキシエチルセルロース	4.14
ヨウ化ナトリウム	0.59
エチレンジアミン四酢酸 四ナトリウム塩四水和物	0.1~4.0
リン酸	必要に応じて水相をpH 5.5に調整する

40

【0022】

市販のカデキソマーヨウ素軟膏は0.9%ヨウ素を含有し、ポジティブコントロールとした。イントラサイトは無定形のヒドロゲルであり、0%ヨウ素を含有するためネガティブコントロールとした。

【0023】

50

方法

模擬創傷液 (simulated wound fluid) (9ml) を17ml容セルウェルに加えた。黄色ブドウ球菌の培養液 (1ml) を各ウェルに加え、 10^6 cfu/mlの最終培養液濃度を得た。本試験のコントロールは、カデキソマーヨウ素軟膏 (2g) (ポジティブコントロール) およびヒドロゲル (ネガティブコントロール) を別々に各々3個のセルウェルに加えることを含んだ。ついで種々の濃度のEDTAを含むゲルAおよびB (1g) を別々のセルウェルに(3通に)加えた。ついで培養液とゲルを含む該セルウェルを35℃にて600 rpmで振盪した。4、24、48、72および96時間の時間間隔の後、試験サンプル (0.1ml) を各ウェルから取り、1% チオ硫酸ナトリウム含有MRD (マキシマムリカパリー希釈液) (9.9ml) に入れた。ついでサンプル (1ml) をトリプトンソイ寒天プレートに移し、48時間インキュベートした。ついで、バクテリア計数を記録した。

10

【 0 0 2 4 】

結果

【表 3 - 1】

試験組成物	4時間	24時間	48時間	72時間	96時間
イオドソープ (ポジティブコントロール)	10	10	10	10	10
イントラサイト (ネガティブコントロール)	7600000	310000000	530000000	1000000000	14000000
0%I ₂ 0%EDTA データを確認?	7600000	310000000	530000000	1000000000	14000000

20

【表 3 - 2】

0.3%I ₂ 0%EDTA	1240000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0%EDTA	1010000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0%EDTA	1670000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	1500000	1000000	1000000	1000000	1000000
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	92000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	58000	10	10	10	10
試験組成物	4 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間
0.3%I ₂ 1%EDTA	8100	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1%EDTA	130000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1%EDTA	110000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	710	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	4400	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	31000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	8500	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	10600	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	6200	16000	10	10	10

10

20

30

40

【表 3 - 3】

0.3%I ₂ 4%EDTA	93000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 4%EDTA	8500	10	10	10	10
0.3%I ₂ 4%EDTA		1400	10	10	10

【 0 0 2 5 】

これらの結果を図1のグラフに示した。

10

これらの結果は、わずか0.5%EDTA(二ナトリウム塩として計算した)をヨウ素に添加することによって、ヨウ素(0.3%にて)の効力が、0.3%ヨウ素・EDTAなしのコントロールと比較して増強されることを示す。該結果から明らかに、EDTAはヨウ素の効果を24時間内に、0.9%ヨウ素(ポジティブコントロール)の効力と同一にまで増強する。

【実施例 2】

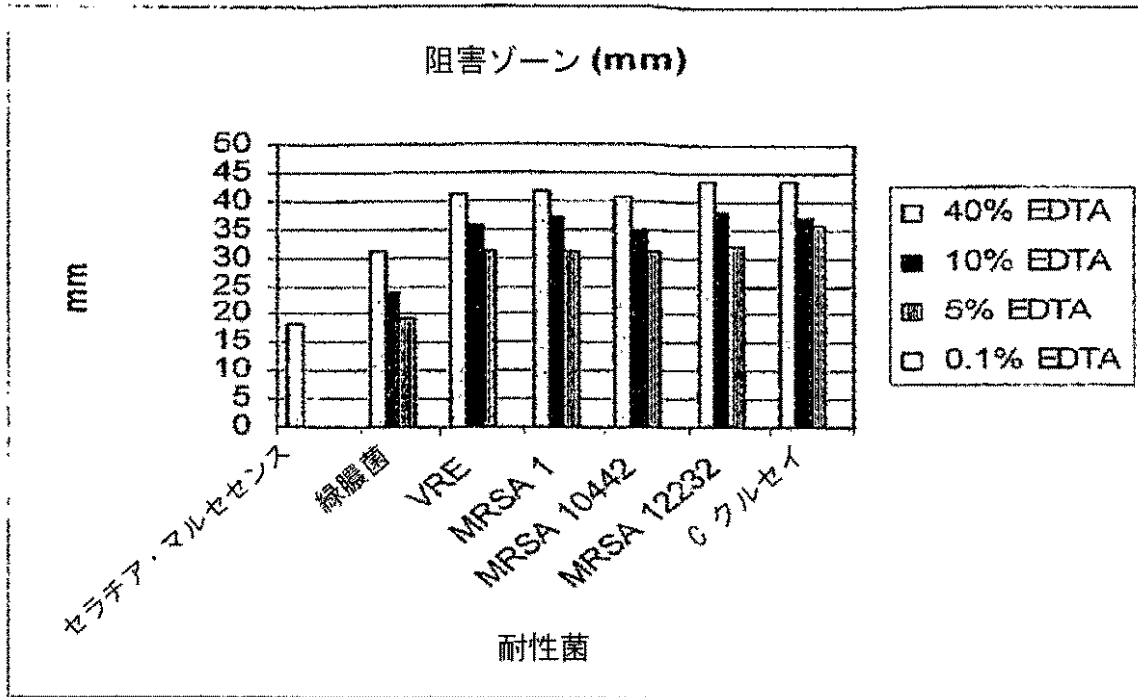
【 0 0 2 6 】

EDTA四ナトリウムによる阻害ゾーン

7つの抗生物質耐性微生物を使用して、寒天で生育するバクテリアおよび酵母を殺すEDTAの効力を評価した。この試験のために、ろ紙ディスクを0.1~40%濃度範囲のEDTAに浸漬した。EDTAは、それを適当量の滅菌再蒸留水に溶解して調製した。ついで該フィルターを、微生物を播種したMuller Hinton寒天上に、35℃での24時間の試験の下に加えた。全微生物を2回試験した。

20

【表 4】



30

40

【 0 0 2 7 】

これらの結果から、「阻害ゾーン」は20~43mm(ディスクの13mmを含む)の範囲であることが示される。ゾーンはEDTAの濃度の増加に伴ってより高くなり、EDTA単独で効果的な殺菌剤であることを示した。

【実施例 3】

【 0 0 2 8 】

EDTAによる阻害ゾーン

ポロキサマー F127 ヒドロゲル(Univar、Basildon、Essex、UK)は、ポリオキシエチレ

50

ンおよびポリオキシプロピレンのジ-ブロックコポリマーで、熱可逆ゲル化性を示す。15より下でポロキサマーは液体であり、水と完全に混ざるが、15を超えた温度では堅いゲルに変化する。ポロキサマーはバクテリアがより臨床的に関係するバイオフィーム表現型を示すのを促進する。Gilbertらは、ポロキサマーヒドロゲル上で生育した緑膿菌細胞(バイオフィーム形態)が78と87kDa間の外膜タンパク質を発現することを特定し、これは標準栄養寒天で生育した細胞(‘プランクトン’)では明らかでない(Gilbert et al., 1998)。従って、ポロキサマーゲル培養は、バイオフィーム-増殖緑膿菌の特性の多くを模倣する(Gilbert et al., 1998)。これはポロキサマーヒドロゲルで生育した場合と栄養寒天で生育した場合とでは緑膿菌細胞の表現型に違いがあり、ポロキサマー生育細胞だけがバイオフィーム細胞に類似していること示す。Wirtanenの研究(1998)から、ポロキサマー中で生育したバクテリアは、バイオフィーム特性を有し、殺生物剤耐性の増進に關与することが認められた。Gilbertらはポロキサマーヒドロゲルで生育したバクテリアを殺生物剤に曝露して、バイオフィームバクテリアに対する殺生物剤の抗菌効力を試験するための再現性ある方法を提供しうること示唆した(Gilbert et al., 1998)。

10

20

30

40

50

【0029】

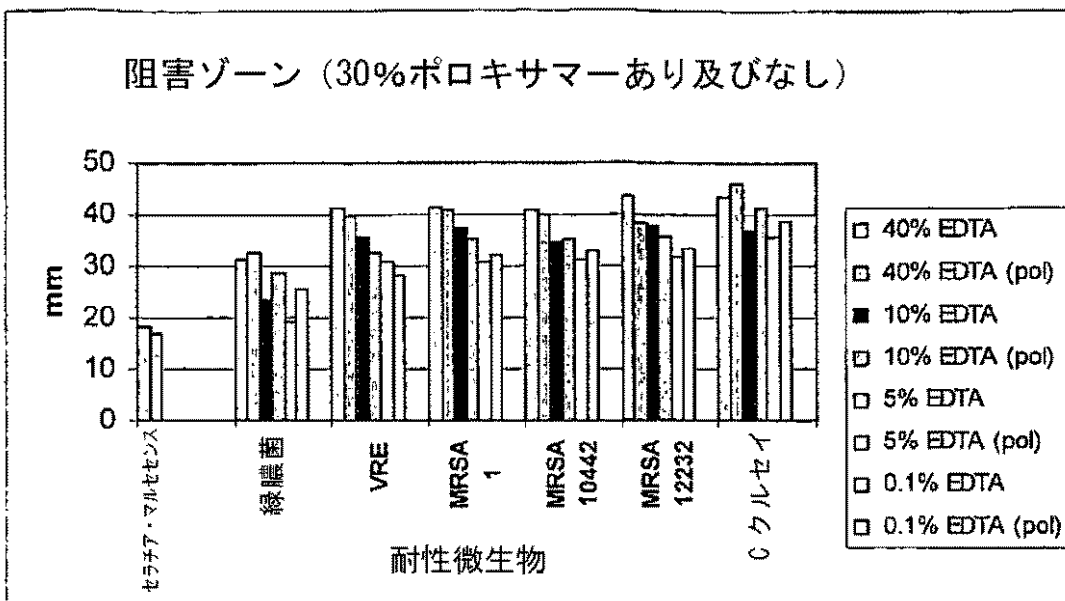
Gilbert P, Jones MV, Allison DG, Heys S, Maira T, Wood P. The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments. *Journal of Applied Microbiology* 1998;85:985-990.

Wirtanen G, Salo S, Allison DG, Mattila-Sandholm T, Gilbert P. Performance evaluation of disinfectant formulations using poloxamer-hydrogel biofilm-constructs. *Journal of Applied Microbiology* 1998; 85:965-971.

【0030】

7つの抗生物質耐性微生物を、ポロキサマーゲルで生育するバクテリアおよび酵母(バイオフィーム状)を殺すEDTAの効力を評価するために使用した。本試験のために、ろ紙ディスクを濃度範囲0.1~40%のEDTAに浸漬した。本試験において、ポロキサマーF127(ポリオキシエチレンおよびポリオキシプロピレンのジ-ブロックコポリマー)を、バクテリアがバイオフィーム表現型として生育することができ、‘現実世界’により適合する特性を発現することができる培地として使用した。ついで、微生物を播種したMuller Hinton寒天上に、35℃での24時間の試験の下、該フィルターを加えた。全プレートについて2通りで行った。

【表5】



【0031】

これらの結果により阻害ゾーンはポロキサマーの存在下では若干小さいことが示され、バイオフィームとして生育するバクテリア/酵母が、それらの対応するプランクトンと比

較して、EDTAに対して物理的により耐性があることが示される。C クルセイ (C kruzei) および緑膿菌は、ポロキサマーでゾーンがより大きく、例外であった。阻害ゾーンは、40% EDTAで試験した全ての生物において明白であった。10% および5% EDTAでは、セラチア・マルセセンスに対するゾーンはなかった。0.1% EDTAでは、試験したいずれの生物に対しても阻害ゾーンがないことが明白であり、EDTAがこの濃度では効果がないことを示す。

【実施例 4】

【0032】

EDTAのテトラ、トリおよびジ塩基性塩による最小阻止濃度(MIC)および最小殺菌濃度(MBC)

方法：マイクロタイタープレートおよび吸光度測定ならびに目視検査を行い、種々の微生物についてのMICを得た(図2参照)。本試験に含まれるEDTAの濃度は、テトラ-Naとして40mg/ml pH 10.00、トリ-Naとして40mg/ml pH 6.84、ジ-Naとして40 mg/ml pH 5.50であった。各マイクロタイタープレートに、接種菌液(100 µl)およびEDTAを加えた。ついで該プレートを 35 ± 3 にて24時間インキュベートした。インキュベーションの後、全マイクロタイタープレートについて、増殖を目視で観察した。

結果は図2に示される。

【0033】

概して、記録した全MICは、試験したEDTAの塩の全てについて同等であった。これは両溶液のpHが同等であることを示唆する。従って、EDTAの活性は、マイクロタイタープレートに加えられた塩フォームによる影響を受けない。これらの結果により低濃度のEDTAがバクテリアに対して大変有効であることが示される。

【実施例 5】

【0034】

銀含有創傷包帯材の抗菌効力に対するEDTAの影響

本試験に使用した抗菌包帯材は、Acticoat^{登録商標}(Smith and Nephew)およびAQUACEL^{登録商標} Ag Hydrofiber^{登録商標}(ConvaTec)であった。Acticoat^{登録商標}はナノ結晶銀抗菌バリア包帯材であり、銀コート高密度ポリエチレンメッシュ(HDPE)の2層間に積層されたレーヨン/ポリエステル不織内部コアから成る。該層は超音波溶着で接着されている。AQUACEL^{登録商標} Agは、カルボキシメチルセルロースナトリウム Hydrofiber^{登録商標} およびイオン銀から構成される。AQUACEL^{登録商標} Agの銀カチオンは、Hydrofiber^{登録商標} 包帯材の個々の高吸収性アニオン性カルボキシメチルセルロース繊維に付着している。AQUACEL^{登録商標} Hydrofiber^{登録商標} 包帯材(銀なし)もコントロールとして使用した。

【0035】

方法：全ての包帯材(AQUACEL Hydrofiber [コントロール - 銀なし]、AQUACEL Ag HydrofiberおよびActicoat(ナノ結晶包帯材)を20 mg/mlのテトラ-Na EDTAで水和した。全ての試験を緑膿菌に対して行い、Mueller Hinton寒天(MHA)およびポロキサマーゲル(Mueller Hintonブロス(MHB)を組み込んだ)上で試験した。これにはMH寒天プレートまたはポロキサマーゲルプレートを特定の分離株と共にインキュベートして、ついで、適当な水和(飽和点まで)創傷包帯材(AQUACELおよびAQUACEL Agについては360 µl(MRD)、Acticoatについては150 µl(滅菌蒸留水 - 使用説明書により))を加えることを伴った。ついで、該包帯材周囲のクリアランスのゾーン(増殖なし)を測定した後、該プレートを 35 ± 3 にて24時間インキュベートした。阻害ゾーンを水平および垂直に(該包帯材サンプルを含めて)測定し、平均値を二重の結果セットから計算した。ついで平均包帯材サイズを平均阻害ゾーンから減じ、修正阻害ゾーン(CZOI)を測定した。CZOI試験は水和後に大きさが変わりうる銀包帯材によって生じたゾーンの形およびサイズにおける固有の変動を許容する。

【0036】

下表は、MH寒天およびポロキサマーゲル上の修正阻害ゾーン(CZOI)のサイズ(mm)を示す。

【表 6】

水和液	MHA (非バイオフィルムバクテリア)			MHB含有ポロキサマーゲル (バイオフィルムバクテリア)		
	AQUACEL	AQUACEL Ag	Acticoat	AQUACEL	AQUACEL Ag	Acticoat
EDTA	0	16	10	6	6	7
MRD	0	18	N/A	0	3	N/A
水	N/A	N/A	7	N/A	N/A	3

【 0 0 3 7 】

結論：EDTAをAQUACELに加えたとき、MHA上(非バイオフィルム状)に阻害ゾーンは認められなかった。しかしながら、EDTAまたは(マキシマムリカバリー希釈液)MRDを加えた、MHA(非バイオフィルムバクテリア)上のAQUACEL Ag周囲にZOIは認められ、銀の抗菌活性を示した。水での水和と比較して、EDTAを添加した後のActicoatの周囲により大きいZOIが認められた。ポロキサマーゲルの存在下では、MRDでAQUACEL Agを水和した後に、EDTAの使用による添加効果を示すEDTAと比べてCZOIの増加が認められた。全体として、該結果により、EDTAはバイオフィルム状(ポロキサマーゲル)で生育したバクテリアに対するイオン銀の影響を増強することが示された。全体として、これらの結果により、微生物がプランクトン状であるときAQUACEL単独では有効でないため、EDTA包帯材を用いることによって、それがプランクトンおよびバイオフィルム微生物の両方に対して有効であることが示唆される。

【 0 0 3 8 】

下表はMH寒天およびポロキサマーゲル上の修正阻害ゾーンのサイズ(mm)を示す。

【表 7】

水和液	MHA (非バイオフィルムバクテリア)			MHB含有ポロキサマーゲル (バイオフィルムバクテリア)		
	Aquacel	Aquacel Ag	ナノ結晶銀 包帯材	Aquacel	Aquacel Ag	ナノ結晶銀 包帯材
EDTA	0	15.99	9.57	6.28	5.96	6.73
MRD	0	18.04	N/A	0	3.42	N/A
水	N/A	N/A	6.74	N/A	N/A	2.82

【実施例 6】

【 0 0 3 9 】

ヨウ素を含む2成分ゲル、および実施例1に詳説されるようにEDTA(ジNa EDTA、トリNa EDTA およびテトラNa EDTA)を含有する2成分ゲルの最小阻止濃度(MIC)

本試験は、一連のEDTAフォームの活性へのpHの影響を示す。

【 0 0 4 0 】

本試験のために、実施例1に詳説されるように2成分ゲルをHEC成分(ゲル)なしに調製した。従って、MICを算出するために液体組成物のみを用いて本試験を行った。TCG/EDTA溶液のpHは、約5.5であった。試験した生物は：黄色ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌(繰り返し2回)およびC アルピカンスであった。

TCG溶液(A)

【表 8】

成分	w/w%
水	100とする
ヨウ素酸ナトリウム	0.1
クエン酸	3.99
リン酸ナトリウム	15.06

TCG溶液(B)

10

【表 9】

成分	w/w%
水	100とする
ヨウ化ナトリウム	0.4
エチレンジアミン四酢酸 四ナトリウム塩四水和物	テーブル1に示すとおり
リン酸	必要に応じて水相をpH 5.5に調整する

【0041】

20

TCG溶液およびEDTAと組み合わせたTCG溶液のMIC(括弧内の値はEDTA濃度(mg/ml)である)

【表 10】

バクテリア	TCG溶液*	TCG EDTA	TCG&トリNa EDTA	TCG&テトラNa EDTA
黄色ブドウ球菌	0.25(0)	0.008(0.31)	0.008(0.31)	0.008(0.31)
緑膿菌	0.5(0)	0.062(2.5)	0.062(2.5)	0.062(2.5)
大腸菌	0.25(0)	0.031(1.25)	0.031(1.25)	0.031(1.25)

30

*(実施濃度は0.2%ヨウ素であった)

【0042】

結論

EDTA(ジ、トリおよびテトラNa)の存在下に、MICはかなり減少した。ヨウ素濃度として表されるMICはジ、トリ、およびテトラナトリウムEDTAの存在下では、より低かったことが認められる。

【0043】

EDTAが示す抗菌効果は濃度0.31mg/mlで達成される。EDTAのフォームが異なると、異なる抗菌効力を呈すると知られるにもかかわらず、3つの全ての生物についてヨウ素生成溶液(EDTAなし)と比較してMICを有意に減少することにおいて、全てのEDTAフォームは、一定のpH(本ケースでは5.5)では同等に有効であった。

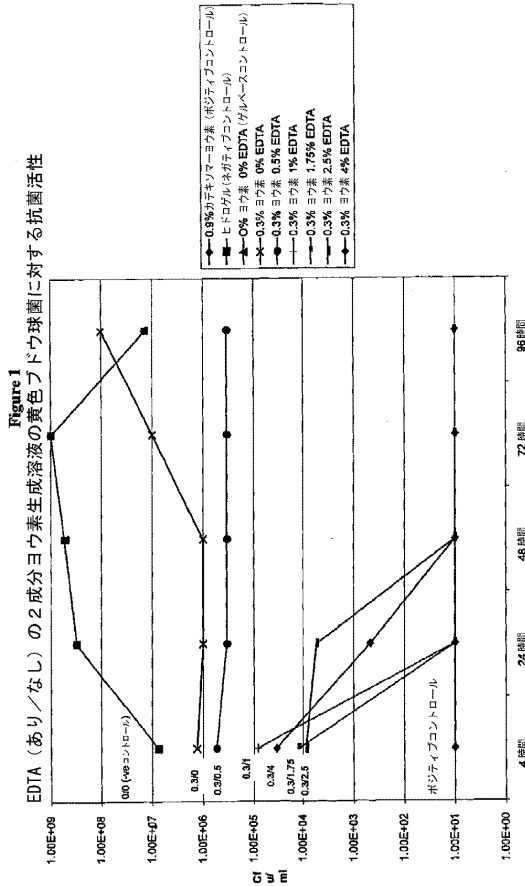
40

【図面の簡単な説明】

【0044】

(原文に記載なし)

【 図 1 】



【 図 2 】

Figure 2
別表 A: ジ、トリおよびテトラ EDTA の MIC*

微生物	識別	接種材料, cfu	MIC		
			ジ Na	トリ Na	アトプ Na
カビノコケシス (<i>S. marcescens</i>)	multi res	5.00E+04	0.938	1.875	0.938
緑膿菌 (<i>Ps. aeruginosa</i>)	NCTC 8506 (res)	6.75E+04	0.234	0.234	0.234
緑膿菌 (<i>Ps. aeruginosa</i>)	NCIMB 8626	7.00E+04	0.938	0.938	0.938
大腸菌	NCIMB 8545	5.50E+04	0.469	0.469	0.469
大腸菌	NCIMB 10544	<5.0+04	0.469	0.938	0.469
肺炎球菌 (<i>Kl. pneumoniae</i>)	033 臨床分離株	<5.0+E4	0.938	0.938	1.875
エンテロクローカセ (<i>Ent. cloacae</i>)	166 臨床分離株	5.00E+04	1.875	0.938	0.938
ミラビリス変形菌 (<i>Pr. mirabilis</i>)	NCTC 9559	1.50E+05	0.469	0.469	0.469
アクトバクテリウム (<i>A. baumannii</i>)	NCIMB 9214	4.40E+04	0.234	0.234	0.469
黄色ブドウ球菌 (<i>S. aureus</i>)	NCIMB 9518	4.00E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	1 Cardiff PHL	5.50E+04	0.117	0.469	0.234
MRSA	2 Cardiff PHL	5.75E+04	0.234	0.469	0.234
MRSA	28	1.25E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	NCTC 12232	5.00E+04	0.234	0.234	0.469
MRSA	NCTC 10442	6.50E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	103731 Chester PHL	6.00E+04	0.234	0.117	0.234
エンテロクローカセ (<i>Ent. faecalis</i>)	141 臨床分離株	2.50E+04	0.234	0.234	0.234
VRE	1 Cardiff PHL	2.75E+04	0.234	0.469	0.234
VRE	2 Cardiff PHL	3.25E+04	0.234	0.234	0.234
VRE	NCTC 12201	6.00E+04	0.234	0.234	0.234
化膿連鎖球菌 (<i>Strep. pyogenes</i>)	NCTC 8198	7.00E+04	0.234	0.469	0.469
枯草菌 (<i>B. subtilis</i>)	NCTC 3610	3.00E+04	0.234	0.234	0.234
Cクルセイ (<i>C. krusei</i>)	NCPF 3876 (res)	1.50E+04	0.938	0.938	0.938
Bフラギリス (<i>B. fragilis</i>)	NCIMB 9343	1.90E+05	0.117	0.234	0.234
クレブシエラ・フラジリス (<i>Cl. paringens</i>)	362 臨床分離株	9.00E+03	0.117	<0.117	<0.117
ペプトストロク (<i>Pep. anaerobius</i>)	NCTC 11460	1.30E+06	0.234	0.469	0.469

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成25年6月27日 (2013.6.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 4 4

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 4 4 】

【 図 1 】 EDTA (あり/なし) の 2 成分ヨウ素生成溶液の黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示す。

【 図 2 】 別表 A : ジ、トリおよびテトラ EDTA の MIC * を示す。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K	33/20 (2006.01)	A 6 1 K 33/20	
A 6 1 K	9/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/06	
A 6 1 P	17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(72)発明者 ステイブン・エル・パーシバル

英国シーエイチ４・９イーワイ、チェスター、プルフォード、キャッスル・ヒル６番

(72)発明者 フィリップ・ジー・ボウラー

英国ダブリューエイ４・５キューゼット、ウォリントン、アップルトン、ハーツウッド・クローズ
１８番

(72)発明者 デイビッド・パーソンズ

英国シーエイチ６０・５アールエヌ、ウィラル、ヘスウォール、ブライアー・ドライブ６番

F ターム(参考) 4C076 AA09 BB31 CC19 DD21 DD23 DD26 DD38 DD43 EE32

4C084 AA20 MA28 MA63 NA05 ZB351 ZB352 ZC751 ZC752

4C086 AA01 AA02 HA01 HA09 MA02 MA04 MA28 MA63 NA05 ZB35

ZC75

4C206 AA01 AA02 FA55 MA02 MA04 MA48 MA83 NA05 ZB35 ZC75

【 外国語明細書 】

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

1

Antimicrobial Composition

This invention relates to an antimicrobial composition which can be applied to skin, wounds, cuts, abrasions or burns for the prevention or treatment of infections. More particularly the invention relates to a composition capable of providing effective antimicrobial activity while at the same time avoiding wound and skin irritation and retardation of wound healing.

10 Overuse of antibiotics and the associated increase in bacterial resistance is impacting the efficacy of antibiotics in the treatment of wound infection. Effective alternatives to antibiotics are thus desirable.

Topical antimicrobial materials and preparations containing them have long been recognised as playing an important part in minimising the opportunity for skin and wound infections. Antiseptics are non-selective chemical agents that can be safe to use on living tissue. Molecular iodine, ionic silver and oxidising agents such as sodium hypochlorite and chlorine dioxide have been recognised as antiseptic agents with effectiveness against a wide range of micro-organisms. There are however several barriers to making an effective antimicrobial composition for application to wounds based on such agents. One problem is that these antiseptic agents tend to react with organic materials found in the wound other than the intended microbial targets. This means that to be effective, antiseptic agents need to be included in treatment compositions at high levels, which may cause undesirable side effects with prolonged use such as cell toxicity, hypersensitivity reactions, skin staining and systemic effects. Such side effects are further described in "In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care". Poon VK, Burd A. Burns. 2004 Mar;30(2):140-7, "A review of iodine toxicity reports". Pennington JA. J Am Diet Assoc. 1990 Nov;90(11):1571-81 and "Topical antimicrobial toxicity".

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

2

Lineaweaver W, Howard R, Soucy D, McMorris S, Freeman J, Crain C, Robertson J, Rumley T. Arch Surg. 1985 Mar;120(3):267-70.

Wounds are often colonised by a variety of micro-organisms, some of
5 which may cause infection. It is increasingly recognised that microbial
populations living within a biofilm environment contribute to delayed
healing and infection. Biofilms are comprised of exopolymeric substances
that are produced by bacteria once they attach to a surface, and this helps
to protect micro-organisms from immune cells and antimicrobial agents.
10 Since efficacy of antimicrobial agents (e.g. antibiotics and antiseptics) is
compromised by the biofilm matrix, strategies to disrupt the biofilm and
expose micro-organisms within can be helpful in increasing the activity
level of antimicrobial agents and thus reducing the concentration of such
agents needed to make an effective composition.

15

Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) added as the di-sodium or
calcium di-sodium salts has been used to treat topical infections or to treat
hard surfaces such as catheters. WO03/047341 describes the use of
EDTA for example as an additive for a toothpaste. EDTA is also used as
20 a formulation agent to reduce the effects of water hardness and generally
as a chelating agent.

EDTA has been described in combination with other antibiotic agents for
example in US 5998488 it is used in combination with an antimicrobial
25 preservative in a solution for ophthalmic use. Formulations suitable for
topical use on wounds have not been proposed.

There is thus a need for a composition which has the benefits of an
antimicrobial agent but which reduces the potential of adverse reactions.

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

3

Suprisingly we have found that EDTA is capable of disrupting biofilms by chelating the metal ions, calcium and magnesium, that maintain the integrity of the biofilm matrix.

5 Accordingly a first aspect of the invention provides an antimicrobial composition suitable for use on skin and wounds comprising a source of antiseptic agent and an agent which disrupts biofilms such as EDTA.

The presence of EDTA enhances the effect of the antiseptic so that the
10 concentration of antiseptic agent may be reduced and yet still achieve effective antiseptis. By increasing the effectiveness of the antiseptic agent, its concentration in the composition can be reduced thereby reducing the potential for adverse reactions.

15 This aspect of the invention allows the preparation of compositions able to reduce the bacterial bioburden to a level manageable by the host within 24 hours using at least 50% less of the antiseptic agent, more preferably 50-60% less and ideally 65-85% less. This then allows the wound to progress towards healing and can be evidenced by a visual improvement
20 in the wound.

We have also found that it is possible to prepare a composition which includes EDTA which is effective under the conditions of pH normally found in a wound.

25

Accordingly a second aspect of the invention provides a composition suitable for use on wounds comprising di-, tri- and tetra-basic salts of EDTA at a pH of 4 to 8.

30 The compositions according to a first aspect of the invention comprise an antiseptic agent, preferably molecular iodine, ionic silver, chlorhexidine,

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

4

or hydrochloric acid or an oxidising agent such as sodium hypochlorite, chlorine dioxide, hydrogen peroxide or peroxy acid salts . The antiseptic agent is preferably included in the composition at a level of from 0.01% to 10% by weight, more preferably 0.1% to 5% by weight. Iodine is preferably included in the composition at a level of from 0.01% to 10% by weight and more preferably from 0.1% to 1.0% by weight. Preferably the iodine source is an iodide and the composition further comprises an oxidant and a buffer, the oxidant being held separately from the iodide until the point of use. The buffer is preferably capable of maintaining the pH of the composition at between pH4.5 and pH 6 so that iodine is generated at a physiologically acceptable and efficacious rate. Compositions comprising iodide and an oxidant held separately from the iodide are described further in EP1158859B.

Where iodide is present, the amount of oxidant in the composition is tailored to provide a stoichiometric match with iodide. Preferably the oxidant is iodate and is provided in a molar ratio of from 1:4 to 1:10 with iodide. In this way the iodide where present in the composition fully reacts with the oxidant. Iodide and Iodate are preferably present as sodium salts although other usual counter ions may be present.

Where the antiseptic agent is ionic silver it is preferably included in the composition at a level of from 0.1% to 10% by weight and more preferably 0.5% to 1.5%.

The pH of the composition is generally below 8 and preferably between 4 and 8, more preferably between 4 and 6 and most preferably between 4.5 and 5.5. The desired pH may be achieved by incorporating buffering agents in the composition. Examples of buffering agents which may be included are citric acid/di-sodium hydrogen phosphate, citric acid/sodium citrate, acetic acid/sodium acetate. The buffering agent may conveniently

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

5

be present in an amount of about 1% to 20% by weight of the composition preferably about 4% to 6% by weight and particularly about 5% by weight so as to provide an isotonic composition

5 EDTA is preferably present as the di-, tri- or tetra-basic salts of EDTA. We have found that these salts are effective for eradicating microorganisms in the free floating or planktonic state and biofilm state alone or in the presence of an antiseptic agent. For example we have found that EDTA at concentrations of 0.1-40% weight by volume was
10 effective in killing a range of microorganisms both in the planktonic and biofilm state. Microorganisms that were effectively killed by EDTA included *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, vancomycin resistant Enterococcus (VRE) and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

15

EDTA is preferably present in the compositions of either aspect of the present invention at a level of 0.5% to 10% by weight of the composition, more preferably 1% to 3% by weight.

20 The compositions of the present invention may be in the form of a water based gel which maintains a moist wound healing environment and promotes healing. A gel gives the advantage of flow into the wound to form an intimate contact with the wound bed and provide antimicrobial effects to the whole wound. Preferably the gel has a high enough
25 viscosity that it does not flow out of wounds on areas of the body that are or become non-horizontal. Preferably the pH of the gel is buffered at around 5.5 as this does not alter the pH balance of the peri-wound tissue and therefore protects it.

30 The following examples are illustrative of the present invention.

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

6

Example 1Effect of EDTA on Iodine

- 5 Compositions containing iodine and EDTA were prepared by making a pair of aqueous gels which were intimately mixed at the point of use. Each gel was made by preparing an aqueous solution containing all of the appropriate water-soluble parts according to the formulations below and then adding a slurry of a non-ionic cellulosic viscosifier
- 10 (hydroxyethylcellulose) in propylene glycol.

Gel A

Component	% w/w
Water	To 100
Propan-1,2-diol	10
Hydroxyethylcellulose	3.86
Sodium iodate	0.16
Citric acid	3.99
di-sodium phosphate	15.06

15 Gel B

Component	% w/w
Water	To 100
Propan-1,2-diol	10
Hydroxyethylcellulose	4.14
Sodium iodide	0.59
Ethylenediaminetetraacetic acid tetra-sodium salt tetrahydrate	0.1-4.0
Phosphoric acid	As necessary to adjust aqueous

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

7

	phase to ph 5.5
--	-----------------

A commercially available cadexomer iodine ointment was present as a positive control as it contains 0.9% iodine. Intrasite is an amorphous hydrogel and was present as a negative control as it contains 0% iodine.

5

Method

9 ml of simulated wound fluid was added to a 17 ml volume cell well. A 1 ml culture of *Staphylococcus aureus* was added to each well to give a final culture concentration of 10^6 cfu/ml. Controls for this experiment involved adding 2g of cadexomer iodine ointment (positive control) and hydrogel (negative control) separately to three cell wells each. 1g of gels A and B, with different concentrations of EDTA, were then added to separate cell wells (in triplicate). The cell wells containing the culture and gels were then shaken at 600 rpm at 35°C. After time intervals of 4, 24, 48, 72 and 96 hours a 0.1 ml test sample was taken from each well and placed into 9.9 ml MRD (maximum recovery diluent) containing 1% sodium thiosulphate. A 1 ml sample was then transferred to Tryptone Soy Agar plates and incubated for 48 hours. Bacterial counts were then recorded.

20

Results

Test composition	4 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Iodosorb(positive control)	10	10	10	10	10
Intrasite(negative control)	7600000	310000000	530000000	1000000000	14000000
0%I ₂ 0%EDTA confirm data?	7600000	310000000	530000000	1000000000	14000000

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

8

0.3%I ₂ 0%EDTA	1240000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0%EDTA	1010000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0%EDTA	1670000	1000000	1000000	10000000	100000000
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	1500000	1000000	1000000	1000000	1000000
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	92000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 0.5%EDTA	58000	10	10	10	10
Test composition	4 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
0.3%I ₂ 1%EDTA	8100	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1%EDTA	130000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1%EDTA	110000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	710	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	4400	10	10	10	10
0.3%I ₂ 1.75%EDTA	31000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	8500	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	10600	10	10	10	10
0.3%I ₂ 2.5%EDTA	6200	16000	10	10	10

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

9

0.3%I ₂ 4%EDTA	93000	10	10	10	10
0.3%I ₂ 4%EDTA	8500	10	10	10	10
0.3%I ₂ 4%EDTA		1400	10	10	10

These results are shown graphically in Figure 1.

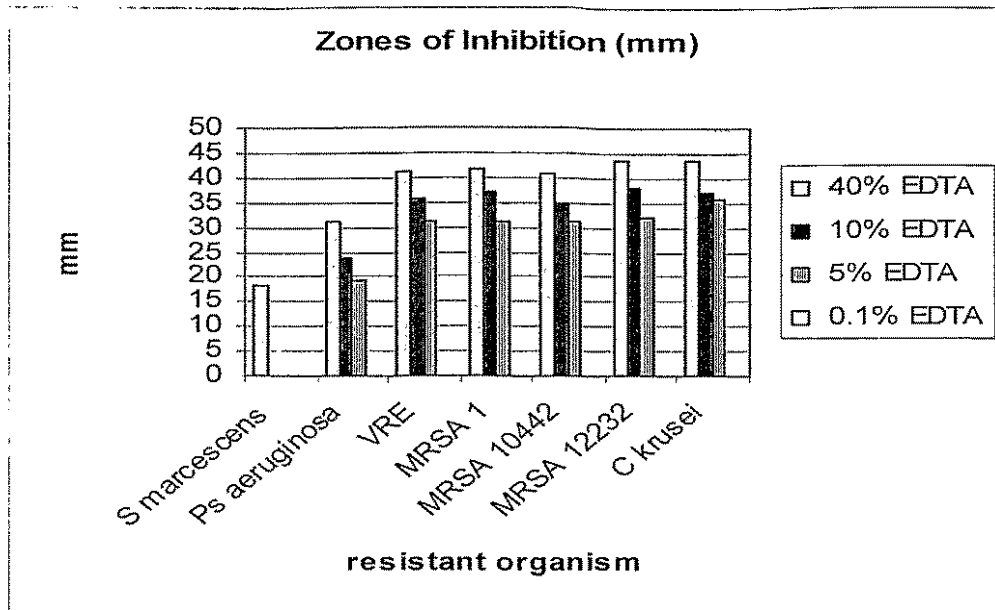
These results show by adding as little as 0.5% EDTA (calculated as the di-sodium salt) to iodine the efficacy of iodine, at 0.3%, is enhanced when compared to the control of 0.3% iodine with no EDTA. Clearly from the results EDTA enhances the effects of iodine within 24 hours to the same efficacy of 0.9% iodine (positive control).

10 Example 2

Zones of inhibition with tetra sodium EDTA

Seven antibiotic resistant microorganisms were used to evaluate the efficacy of EDTA in killing bacteria and yeasts grown on agar. For this experiment filter paper discs were soaked in EDTA at concentrations ranging from 0.1-40%. EDTA was made up by dissolving it in an appropriate amount of sterile double distilled water. The filters were then added onto Muller Hinton agar which had been inoculated with a microorganism under study for 24 hours at 35°C. All microorganisms were tested twice.

10



These results show that the “zones of inhibition” ranged from 20 to 43mm (including disc 13mm). Zones were higher with increasing levels of EDTA indicating that EDTA alone is an effective antiseptic agent.

Example 3

Zones of inhibition with EDTA

10

Poloxamer F127 hydrogels (Univar, Basildon, Essex, UK) are di-block co-polymers of polyoxyethylene and polyoxypropylene that demonstrate thermo-reversible gelation properties. At temperatures below 15°C, poloxamer is liquid and fully miscible with water but changes to a firm gel at temperatures in excess of 15°C. Poloxamer encourages bacteria to exhibit a more clinically relevant biofilm phenotype. Gilbert *et al* determined that *P. aeruginosa* cells grown on poloxamer hydrogel (biofilm form) express outer membrane proteins between 78 and 87 kDa, which are not evident in cells grown on standard nutrient agar ('planktonic') (Gilbert *et al.*, 1998). Consequently poloxamer gel cultures

20

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

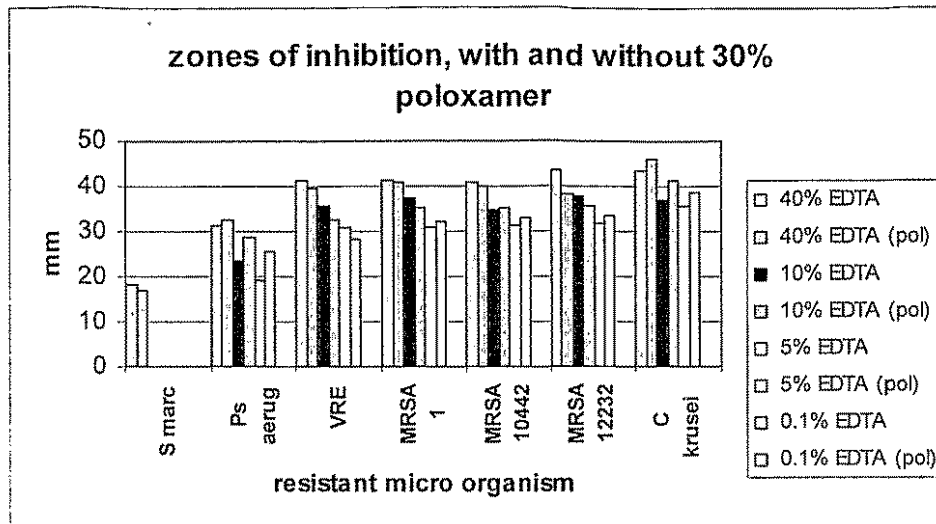
11

mimic many of the properties of biofilm-grown *P. aeruginosa* (Gilbert et al., 1998). This indicates that there is a phenotypic difference between *P. aeruginosa* cells grown on poloxamer hydrogel and nutrient agar, with only poloxamer grown cells resembling biofilm cells. It was found from
5 Wirtanen's study (1998) that bacteria which are grown in poloxamer have biofilm properties and associated enhanced biocide resistance. Gilbert and colleagues suggested that bacteria grown in poloxamer hydrogels could be exposed to biocides to provide a reproducible method for testing the antimicrobial efficacy of biocides against biofilm bacteria (Gilbert et al.,
10 1998).

Gilbert P, Jones MV, Allison DG, Heys S, Maira T, Wood P. The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments. *Journal of Applied Microbiology* 1998;85:985-990.
15 Wirtanen G, Salo S, Allison DG, Mattila-Sandholm T, Gilbert P. Performance evaluation of disinfectant formulations using poloxamer-hydrogel biofilm-constructs. *Journal of Applied Microbiology* 1998; 85:965-971.

20 Seven antibiotic resistant microorganisms were used to evaluate the efficacy of EDTA in killing bacteria and yeasts grown on poloxamer gel (biofilm state). For this experiment filter paper discs were soaked in EDTA at concentrations ranging from 0.1-40%. In this present study poloxamer F127, a di-block copolymer of polyoxyethylene and
25 polyoxypropylene, was used as a medium on which bacteria could be grown as a biofilm phenotype and express the characteristics more appropriate to the 'real world'. The filters were then added onto Muller Hinton agar which had been inoculated with the microorganism under study for 24 hours at 35°C. All plates were done in duplicate.

30



These results show that the zones of inhibition were slightly smaller in the presence of poloxamer indicating that bacteria/yeasts growing as biofilms are physically more resistant to EDTA when compared to their planktonic counterparts. *C. krusei* and *Ps. aeruginosa* were the exception with larger zones with poloxamer. Zones of inhibition were evident on all organisms tested at 40% EDTA. At 10% and 5% EDTA there were no zones with *Serratia marcescens*. At 0.1% EDTA no zones of inhibition were evident with any organism studied indicating that EDTA is not effective at this level.

Example 4

15 Minimum inhibitory concentrations (MIC's) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC's) with Tetra, Tri and Di basic salts of EDTA

Method: A microtitre plate and optical density readings and visual inspection were performed to obtain the MIC's for a variety of microorganisms (see Figure 2). Concentrations of EDTA included in this study were 40mg/ml pH 10.00 as tetra-Na, 40mg/ml as tri-Na pH 6.84, 40 mg/ml as di-Na pH 5.50. Into each microtitre plate, 100 μ l of

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

13

inoculum and EDTA was added. The plate was then incubated for 24 hours at $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Following incubation all microtitre plates were inspected visually for growth.

5 The results are presented in Figure 2.

In general all MIC's recorded were equivalent for all the salts of EDTA studied. This suggests that the pH of both solutions is equivalent. Therefore, the activity of EDTA is not affected by the salt form added to
10 the microtitre plate. These results show that low concentrations of EDTA are very effective on bacteria.

Example 5The effect of EDTA on the antimicrobial efficacy of silver containing wound dressings

5

The antimicrobial dressings used in this study were Acticoat™ (Smith and Nephew) and AQUACEL® Ag Hydrofiber® (ConvaTec). Acticoat™ is a nanocrystalline silver antimicrobial barrier dressing which consists of a rayon/polyester non-woven inner core laminated between two layers of silver-coated high density polyethylene mesh (HDPE). The layers are held together with ultrasound welds. AQUACEL® Ag is comprised of sodium carboxymethylcellulose Hydrofiber® and ionic silver. The silver cations in AQUACEL® Ag are associated with the individual highly absorbent anionic carboxymethylcellulose fibres of the Hydrofiber® dressing. AQUACEL® Hydrofiber® dressing (without silver) was also used as a control.

Method: All dressings (AQUACEL Hydrofiber [control – without silver], AQUACEL Ag Hydrofiber and Acticoat (nanocrystalline dressing) were hydrated with 20 mg/ml of tetra-Na EDTA. All tests were performed against *Ps aeruginosa* and tested on Mueller Hinton agar (MHA) and Poloxamer gel (incorporating Mueller Hinton broth (MHB). This involved inoculating either a MH agar plate or poloxamer gel plate with a specific isolate and then adding an appropriate hydrated (to saturation point) wound dressing (360 μ l (MRD) for AQUACEL and AQUACEL Ag and 150 μ l (sterile distilled water- as per manufacturers instructions) for Acticoat). The plates were then incubated at $35^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ for 24 hours after which the zone of clearance (no growth) around the dressing was measured. Zones of inhibition were measured horizontally and vertically (inclusive of the dressing sample) and a mean value was calculated from the duplicate set of results. The mean dressing size was then subtracted

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

15

from the mean zone of inhibition to determine the corrected zone of inhibition (CZOI). A CZOI test allows for any inherent variability in the shape and size of zones created by the silver dressings which may change in dimension following hydration.

5

Table to show the size of corrected zone of inhibition (CZOI) in mm on MH agar and poloxamer gel

Hydrating Fluid	MHA (Non-biofilm bacteria)			Poloxamer gel with MHB (biofilm bacteria)		
	AQUACEL	AQUACEL Ag	Acticoat	AQUACEL	AQUACEL Ag	Acticoat
EDTA	0	16	10	6	6	7
MRD	0	18	N/A	0	3	N/A
Water	N/A	N/A	7	N/A	N/A	3

10 **Conclusion:** When EDTA was added to AQUACEL no zones of inhibition were observed on MHA (non-biofilm state). However, ZOI's were observed around AQUACEL Ag on MHA (non-biofilm bacteria) when EDTA or (maximal recovery diluent) MRD was added indicating the antimicrobial activity of silver. Larger ZOI's were observed around

15 Acticoat following the addition of EDTA when compared to hydration with water. In the presence of poloxamer gel an increase in the CZOI was observed following hydration of AQUACEL Ag with MRD when compared to EDTA indicating an additive effect with the use of EDTA. Overall the results showed that EDTA enhances the effects of ionic silver

20 on bacteria grown in the biofilm state (poloxamer gel). Overall these results suggest that by using an EDTA dressing it is effective against both planktonic and biofilm microorganisms because AQUACEL alone is not effective when the microorganisms are in the planktonic state.

25

Table to show the size of corrected zone of inhibition in mm on MH agar and poloxamer gel

Hydrating fluid	MHA (non-biofilm bacteria)			Poloxamer gel with MHB (biofilm bacteria)		
	Aquacel	Aquacel Ag	Nanocrystalline silver dressing	Aquacel	Aquacel Ag	Nanocrystalline silver dressing
EDTA	0	15.99	9.57	6.28	5.96	6.73
MRD	0	18.04	N/A	0	3.42	N/A
Water	N/A	N/A	6.74	N/A	N/A	2.82

5

Example 6

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for a two component gel comprising iodine and a two component gel as detailed in Example 1 containing EDTA (diNa EDTA, triNa EDTA and tetraNa EDTA)

10

This experiment shows the effect of pH on the activity of a range of EDTA forms.

15 For this experiment a two component gel as detailed in Example 1 was made without the HEC component (gel). This experiment was therefore performed using only liquid compositions in order for MIC's to be calculated. The pH of the TCG/EDTA solutions was approx 5.5. The organisms tested included: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (repeated twice) and *C albicans*.

20

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

17

TCG Solution (A)

Component	% w/w
Water	To 100
Sodium iodate	0.1
Citric acid	3.99
di-sodium phosphate	15.06

TCG Solution (B)

Component	% w/w
Water	To 100
Sodium iodide	0.4
Ethylenediaminetetraacetic acid tetra-sodium salt tetrahydrate	As shown in Table 1
Phosphoric acid	As necessary to adjust aqueous phase to pH 5.5

5

MIC's for TCG solution and TCG solution combined with EDTA (values in brackets are EDTA concentrations in mg/ml)

Bacterium	TCG solution*	TCG EDTA	TCG & tri Na EDTA	TCG& tetra Na EDTA
<i>S aureus</i>	0.25 (0)	0.008 (0.31)	0.008(0.31)	0.008 (0.31)
<i>Ps aeruginosa</i>	0.5 (0)	0.062 (2.5)	0.062 (2.5)	0.062 (2.5)
<i>E coli</i>	0.25 (0)	0.031 (1.25)	0.031 (1.25)	0.031 (1.25)

10 * (working concentration was 0.2% iodine)

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

18

Conclusion

MIC's were reduced considerably in the presence of EDTA (di, tri and tetra Na). It can be seen that the MICs, expressed as Iodine concentration, are lower in the presence of di, tri and tetra sodium EDTA.

The antimicrobial benefit of having EDTA present is achieved at concentrations of 0.31 mg/ml. Despite different forms of EDTA being known to provide differential antimicrobial efficacy, at a constant pH (5.5 in this case) all EDTA forms were equally effective in significantly reducing the MIC's for all three organisms compared to be iodine generating solution without EDTA.

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

19

Claims

1. An antiseptic composition suitable for use on skin and wounds comprising a source of an antimicrobial agent and an agent which disrupts
5 biofilms.
2. An antiseptic composition as claimed in claim 1 characterised in that the agent which disrupts biofilms is EDTA.
- 10 3. An antiseptic composition suitable for use on skin and wounds as claimed in claim 1 or claim 2 characterised in that the antimicrobial agent is selected from the group of iodine, ionic silver or an oxidising agent such as sodium hypochlorite or chlorine dioxide.
- 15 4. A composition suitable for use on wounds comprising di-, tri- and tetra-basic salts of EDTA at a pH of 4 to 8.
5. A composition as claimed in claims 1 to 3 characterised in that the composition has a pH of between 4 and 8.
20
6. A composition as claimed in claims 1 to 4 characterised in that the composition has a pH of between 4.5 and 5.5.
7. A composition as claimed in any preceding claim in the form of a
25 gel.
8. A composition as claimed in any preceding claim characterised in that the composition comprises iodine.
- 30 9. A composition as claimed in any preceding claim characterised in that the composition comprises an iodine source, an oxidant and a buffer

WO 2007/068938

PCT/GB2006/004691

20

wherein the iodine is held separately from the oxidant until the point of use.

10. A composition as claimed in claim 9 characterised in that the
5 composition is capable of generating from 5microg of iodine per g of composition per hour to 1500microg of iodine per g of composition per hour.

11. A composition as claimed in claims 1 to 6 characterised in that the
10 composition comprises ionic silver.

12. A composition as claimed in claim 11 characterised in that the
composition comprises from 0.1% to 10% by weight and more preferably
0.5% to 1.5% by weight of ionic silver.

15

13. A method of making an antiseptic composition as claimed in claim
4 comprising the steps of adding EDTA as a tetrasodium salt in aqueous
solution and then adjusting the pH of the composition to pH 4 to 8.

20 14. Use of an antiseptic composition in the manufacture of a
medicament suit comprising an antimicrobial agent and an agent which
disrupts biofilms for use in the treatment of chronic wounds and burns.

15. Use of an antiseptic composition as claimed in claim 14
25 characterised in that the agent which disrupts biofilms is EDTA.

16. Use of an antiseptic composition as claimed in claim 14 or claim
15 characterised in that the antimicrobial agent is selected from the
group of iodine, ionic silver or an oxidising agent such as sodium
30 hypochlorite or chlorine dioxide.

Abstract: An antiseptic composition suitable for use on skin and wounds comprising a source of an antimicrobial agent and an agent which disrupts biofilms.

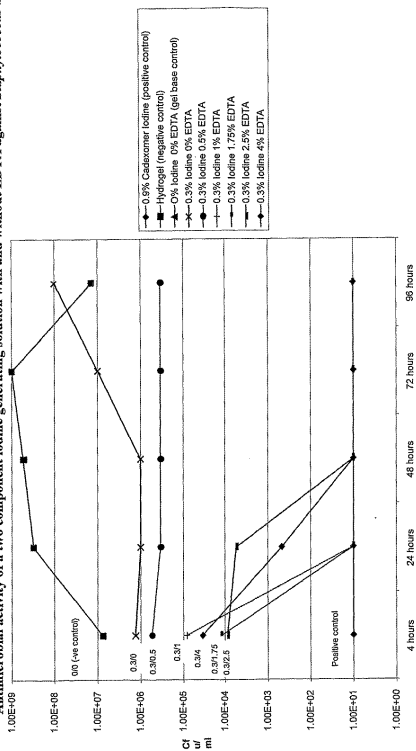
【 1 】

WO 2007/068938

1/2

PCT/GB2006/004691

Figure 1
Antimicrobial activity of a two component iodine generating solution with and without EDTA against *Staphylococcus aureus*



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【 2 】

WO 2007/068938

2/2

PCT/GB2006/004691

Figure 2
Appendix A: MICs* for di, tri and tetra EDTA

Micro organism	identification	inoculum, cfu	MICs		
			di Na	tri Na	tetra Na
<i>S marcescens</i>	multi res	5.00E+04	0.938	1.875	0.938
<i>Ps aeruginosa</i>	NCTC 8506 (res)	6.75E+04	0.234	0.234	0.234
<i>Ps aeruginosa</i>	NCIMB 8626	7.00E+04	0.938	0.938	0.938
<i>E coli</i>	NCIMB 8545	5.50E+04	0.469	0.469	0.469
<i>E coli</i>	NCIMB 10544	<5.0+04	0.469	0.938	0.469
<i>Kl pneumoniae</i>	033 clinical isolate	<5.0+E4	0.938	0.938	1.875
<i>Ent cloacae</i>	166 clinical isolate	5.00E+04	1.875	0.938	0.938
<i>Pr mirabilis</i>	NCTC 9559	1.50E+05	0.469	0.469	0.469
<i>A baumannii</i>	NCIMB 9214	4.40E+04	0.234	0.234	0.469
<i>S aureus</i>	NCIMB 9518	4.00E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	1 Cardiff PHL	5.50E+04	0.117	0.469	0.234
MRSA	2 Cardiff PHL	5.75E+04	0.234	0.469	0.234
MRSA	26	1.25E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	NCTC 12232	5.00E+04	0.234	0.234	0.469
MRSA	NCTC 10442	6.50E+04	0.234	0.234	0.234
MRSA	103731 Chester PHL	6.00E+04	0.234	0.117	0.234
<i>Ent faecalis</i>	141 clinical isolate	2.50E+04	0.234	0.234	0.234
VRE	1 Cardiff PHL	2.75E+04	0.234	0.469	0.234
VRE	2 Cardiff PHL	3.25E+04	0.234	0.234	0.234
VRE	NCTC 12201	6.00E+04	0.234	0.234	0.234
<i>Strep pyogenes</i>	NCTC 8198	7.00E+04	0.234	0.469	0.469
<i>B subtilis</i>	NCTC 3610	3.00E+04	0.234	0.234	0.234
<i>C krusei</i>	NCPF 3876 (res)	1.50E+04	0.938	0.938	0.938
<i>B fragilis</i>	NCIMB 9343	1.90E+05	0.117	0.234	0.234
<i>Ci perfringens</i>	362 clinical isolate	9.00E+03	0.117	<0.117	<0.117
<i>Pep anaerobius</i>	NCTC 11460	1.30E+06	0.234	0.469	0.469