

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 551**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/04** (2006.01)

**A61K 8/43** (2006.01)

**A61K 8/60** (2006.01)

**A61Q 11/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2020 PCT/EP2020/055199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2020 WO20178148**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2020 E 20711798 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2022 EP 3930663**

54 Título: **Producto de cuidado bucal**

30 Prioridad:

**01.03.2019 IT 201900003009**

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

**20.01.2023**

73 Titular/es:

**CURASEPT A.D.S. S.P.A. (100.0%)  
Via Parini 19/A  
21047 Saronno (VA), IT**

72 Inventor/es:

**BOIOCCHI, LORENZO EMILIANO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 932 551 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**

Producto de cuidado bucal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un producto de cuidado bucal a base de clorhexidina y ADN sódico, como por ejemplo un enjuague bucal, un gel periodontal o una pasta de dientes, que evita la formación de placa en los dientes y, al mismo tiempo, limita la aparición y la progresión de las irritaciones de la mucosa bucal, promoviendo así su trofismo.

**Estado de la técnica**

10 Los productos de cuidado bucal a base de clorhexidina, como los enjuagues bucales, se conocen desde hace tiempo, ya que este componente activo es un potente antibacteriano gracias a su capacidad para penetrar en la membrana externa de las bacterias y coagular las proteínas internas de las mismas. La clorhexidina también ejerce una intensa actividad antiplaca. Las soluciones que contienen clorhexidina en diversas concentraciones también se utilizan para prevenir las complicaciones postoperatorias. La solicitud de patente JP-A-H05-58866 describe composiciones dentífricas que contienen polivinilpirrolidona/monoestearato de polioxietileno, hidrocloreto de clorhexidina al 0,1/0,05 % y sal sódica de ácido desoxirribonucleico al 0,1/0,2 % para reducir las bacterias de la superficie del diente, al tiempo que proporciona una acción no antibacteriana y bactericida para suprimir la formación de placa, gingivitis, periodontitis y otras enfermedades periodontales. La solicitud de patente US-A-5.662.889 describe el uso de ADN sódico en composiciones para el cuidado bucal (es decir, en enjuague bucal o en pasta de dientes) por su fuerte efecto antiperiodontosis. La solicitud de patente EP-A1-0712936 describe el uso de ADN sódico en composiciones para el cuidado bucal (es decir, en enjuague bucal o en pasta de dientes) para actividades antiinflamatorias, antisépticas y antiperiodontosis. La solicitud de patente JP-A-2018/203628 describe composiciones para el cuidado bucal que contienen copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo como aglutinante, vitamina C y metabisulfito como antioxidante, clorhexidina como agente antiséptico, citrato de sodio como ajustador del pH y ADN o ácido desoxirribonucleico como polímero orgánico.

25 Sin embargo, se sabe que el uso prolongado de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina puede, por ejemplo, causar irritación de las mucosas bucales que, a largo plazo, puede deteriorar su correcto trofismo.

De hecho, el solicitante ha comprobado que, aunque los efectos beneficiosos de la clorhexidina en el tratamiento de la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis son conocidos, siguen existiendo reservas con respecto a su uso para estos tratamientos, especialmente para los tratamientos de larga duración, debido a los efectos secundarios conocidos causados por dicho componente activo en las mucosas bucales.

**30 Compendio de la invención**

El objetivo de la presente invención es, por tanto, proporcionar un nuevo producto de cuidado bucal que comprenda clorhexidina, eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis y que tenga una actividad cicatrizante y antiinflamatoria y que además contrarreste el estrés oxidativo, para limitar la aparición y la progresión de las irritaciones y alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales resultantes del uso de la clorhexidina, y favorecer así el trofismo de las propias mucosas bucales.

De conformidad con la presente invención, el Solicitante ha descubierto sorprendentemente que estas características deseadas se pueden lograr utilizando, en combinación con clorhexidina, ADN sódico.

40 Por lo tanto, la presente invención se refiere al ADN sódico para su uso en un método para el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina en un paciente sometido a un tratamiento con clorhexidina como se define en la reivindicación 1.

45 En efecto, se ha descubierto sorprendentemente que la asociación del ADN sódico con la clorhexidina no sólo contrarresta el efecto irritante de esta última sobre las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ésta y un efecto curativo sobre posibles heridas en la cavidad bucal, sino que también permite limitar los efectos secundarios del uso prolongado de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina, que incluyen alteraciones de la estructura celular, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

Gracias a la combinación específica de ADN sódico y clorhexidina, el producto de cuidado bucal tiene, por tanto, una serie de propiedades capaces de superar los límites de aplicación y funcionalidad de los productos de cuidado bucal basados únicamente en la clorhexidina, ampliando las posibilidades de aplicación y solucionando algunos efectos secundarios de su uso prolongado.

50 De hecho, el producto de cuidado bucal es capaz de asociar una acción protectora eficaz a nivel celular frente a los efectos secundarios de la clorhexidina, limitando así la aparición y la progresión de las alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales, con un efecto antibacteriano eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis combinado con una actividad cicatrizante y antiinflamatoria capaz de contrarrestar el estrés oxidativo, y de limitar la aparición y la progresión de las irritaciones de las mucosas bucales, promoviendo así su trofismo. Estas

características hacen que su uso sea especialmente ventajoso, incluso a largo plazo, sin observar la aparición del efecto irritante y los efectos secundarios a nivel celular de la clorhexidina en las mucosas bucales.

5 El Solicitante ha observado, en particular, que uno de los límites de aplicación y funcionamiento del uso de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina reside en la aparición, especialmente en el caso de uso prolongado, de los efectos secundarios que conlleva, además de la irritación de las mucosas bucales, también alteraciones a nivel de la estructura celular de dichas mucosas, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

10 Por ello, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que la asociación del ADN sódico con la clorhexidina no sólo contrarresta su efecto irritante sobre las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ellas y un efecto curativo sobre posibles heridas de la cavidad bucal, sino que también permite limitar los efectos secundarios del uso prolongado de dicho componente activo, que incluyen alteraciones de la estructura celular, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

15 Esto permitió al Solicitante definir y desarrollar un nuevo producto de cuidado bucal con clorhexidina, que por lo tanto es eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis, y que al mismo tiempo no provocaba, o limitaba en gran medida, los efectos secundarios del uso prolongado de dicho componente activo, que incluyen irritaciones e incluso alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

En una realización preferida del mismo, dicho producto de cuidado bucal se selecciona del grupo que consiste en: enjuague bucal, gel periodontal y pasta de dientes.

20 En una realización preferida del mismo, el producto para el cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende del 0,01 % al 0,30 % en peso de clorhexidina, del 0,01 % al 0,2 % en peso de ADN sódico, del 0,1 % al 0,5 % en peso de al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo, del 0,1 % al 1,0 % en peso de ácido ascórbico, del 0,05 % al 1 % en peso de al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, con respecto al volumen total del enjuague bucal.

25 La presente invención se refiere al ADN sódico para su uso en un método para el tratamiento de una patología de la mucosa bucal, en donde dicha patología conlleva una alteración de la estructura celular de dicha mucosa bucal, seleccionándose dicha alteración de la estructura celular del grupo que consiste en: vacuolización, degeneración del núcleo celular, expansión de los espacios intercelulares.

30 De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que el ADN sódico ejerce una acción protectora sobre la estructura celular de la mucosa bucal, capaz de contrarrestar la aparición y la progresión de sus alteraciones, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

Esto permite intervenir terapéuticamente sobre las alteraciones celulares de la mucosa bucal de cualquier etiología, por ejemplo, limitando los efectos secundarios de los tratamientos con componentes activos que son especialmente agresivos para la estructura celular de las mucosas bucales, como la clorhexidina.

35 El Solicitante ha considerado que el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina constituye un aspecto innovador de especial valor a la luz de la aplicación mencionada y de los límites funcionales para el uso de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina.

40 En otro aspecto de la misma, la presente invención también se refiere, por lo tanto, al ADN sódico para su uso en un método para el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina en un paciente sometido a tratamiento con clorhexidina, en donde dichos efectos secundarios implican una alteración de la estructura celular de la mucosa bucal de dicho paciente, seleccionándose dicha alteración de la estructura celular del grupo que consiste en: vacuolización, degeneración del núcleo celular, expansión de los espacios intercelulares.

### Breve descripción de los dibujos

En los dibujos:

- 45
- La figura 1 muestra una vista esquemática transversal, no a escala, del sistema utilizado para la experimentación de acuerdo con el ejemplo 1;
  - La figura 2 muestra los resultados del ensayo de viabilidad MTT en células ROE a diferentes tiempos de tratamiento con las soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1;
- 50
- La figura 3 muestra los resultados del ensayo de viabilidad MTT en células ROE después de 1 minuto de tratamiento con una solución al 3 % en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los diferentes tiempos de tratamiento posteriores con las soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1;
  - La figura 4 muestra reconstrucciones obtenidas en 3D de las observaciones de CLSM y las proyecciones de la intensidad máxima de las muestras de ROE, tras 30 minutos de tratamiento, respectivamente, con las

soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1;

- 5 - La figura 5 muestra reconstrucciones obtenidas en 3D de las observaciones de CLSM y las proyecciones de la intensidad máxima de las muestras de ROE, tras 1 minuto de tratamiento con una solución al 3 % en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 30 minutos después del tratamiento respectivamente con las soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1;
- La figura 6 muestra secciones de muestras de ROE después de 30 minutos de tratamiento respectivamente con las soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1; y
- 10 - La figura 7 muestra secciones de muestras de ROE después de 1 minuto de tratamiento con una solución al 3 % en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 30 minutos después del tratamiento respectivamente con las soluciones A, B, C y D de acuerdo con el ejemplo 1.

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención puede presentarse en uno o más de sus aspectos o en una o más de las características preferidas que se indican a continuación, que pueden combinarse entre sí como se prefiera de acuerdo con los requisitos de la solicitud.

15 En el contexto de la presente descripción y de las siguientes reivindicaciones, todas las magnitudes numéricas que indican cantidades, parámetros, porcentajes, etc., deben considerarse precedidos en cualquier circunstancia por el término "aproximadamente", a menos que se indique lo contrario. Además, todos los intervalos de magnitudes numéricas incluyen todas las posibles combinaciones de valores numéricos máximos y mínimos y todos los posibles intervalos intermedios, así como los indicados a continuación.

20 Dentro del alcance de la presente invención, se ha identificado una combinación de dos sustancias, clorhexidina y ADN sódico, cuya combinación de características antibacterianas, de cicatrización, antiinflamatorias y contra el estrés oxidativo hacen que su uso como componentes activos de un producto de cuidado bucal sea especialmente eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis que, al mismo tiempo, limita la aparición y la progresión de las irritaciones y las alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales resultantes del uso de la clorhexidina, y favorece así el trofismo de las propias mucosas bucales.

Más particularmente, la presente invención se refiere a un producto de cuidado bucal que comprende clorhexidina y ADN sódico.

En la presente invención cuando se utiliza la expresión:

- 30 - "% en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal" significa la cantidad en gramos de un determinado componente presente en 100 mililitros (ml) de enjuague bucal;
- "clorhexidina" significa, a menos que se especifique otra cosa, el compuesto 1,1'-hexametilenbis[5-(p-clorofenil)biguanida], una sal o un complejo del mismo;
- 35 - "ADN sódico" la sal sódica del ácido desoxirribonucleico, por ejemplo, obtenible mediante la extracción de ácido desoxirribonucleico nativo del tejido de las gónadas de esturión macho y posteriormente purificado, despolimerizado y neutralizado con iones de sodio.

40 Sin querer adherirse a una teoría concreta, se cree que la asociación del ADN sódico con la clorhexidina no sólo contrarresta el efecto irritante de esta última sobre las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ellas y un efecto curativo de las posibles heridas de la cavidad bucal, sino que también permite limitar los efectos secundarios del uso prolongado de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina, que incluyen alteraciones de la estructura celular, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

45 El Solicitante ha observado, en particular, que uno de los límites de aplicación y funcionamiento del uso de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina reside en la aparición, especialmente en el caso de uso prolongado, de los efectos secundarios que conlleva, además de la irritación de las mucosas bucales, también alteraciones a nivel de la estructura celular de dichas mucosas, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

50 Por ello, el solicitante ha descubierto sorprendentemente que la asociación del ADN sódico con la clorhexidina no sólo contrarresta su efecto irritante sobre las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ellas y un efecto curativo sobre posibles heridas de la cavidad bucal, sino que también permite limitar los efectos secundarios del uso prolongado de dicho componente activo, que incluyen alteraciones de la estructura celular, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

Esto permitió al Solicitante definir y desarrollar un nuevo producto de cuidado bucal con clorhexidina, que por lo tanto es eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis, y que al mismo tiempo no provocaba, o limitaba en gran medida, los efectos secundarios del uso prolongado de dicho componente activo, que incluyen irritaciones e

incluso alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

5 Gracias a la combinación específica de ADN sódico y clorhexidina, el producto de cuidado bucal tiene, por tanto, una serie de propiedades capaces de superar los límites de aplicación y funcionalidad de los productos de cuidado bucal basados únicamente en la clorhexidina, ampliando las posibilidades de aplicación y solucionando algunos efectos secundarios de su uso prolongado.

10 De hecho, el producto de cuidado bucal es capaz de asociar una acción protectora eficaz a nivel celular frente a los efectos secundarios de la clorhexidina, limitando así la aparición y la progresión de las alteraciones de la estructura celular de las mucosas bucales, con un efecto antibacteriano eficaz contra la gingivitis, la placa bacteriana y la periodontitis combinado con una actividad cicatrizante y antiinflamatoria capaz de contrarrestar el estrés oxidativo, y de limitar la aparición y la progresión de las irritaciones de las mucosas bucales, promoviendo así su trofismo. Estas características hacen que su uso sea especialmente ventajoso, incluso a largo plazo, sin observar la aparición del efecto irritante y los efectos secundarios a nivel celular de la clorhexidina en las mucosas bucales.

15 En una realización preferida del mismo, dicho producto de cuidado bucal se selecciona del grupo que consiste en: enjuague bucal, gel periodontal y pasta de dientes.

En una primera realización preferida del mismo, el producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende clorhexidina y ADN sódico.

El enjuague bucal comprende clorhexidina.

20 Preferiblemente, la cantidad de clorhexidina en el enjuague bucal está en el intervalo del 0,01 % al 0,30 % en peso, más preferiblemente del 0,05 % al 0,30 % en peso, aún más preferiblemente del 0,09 % al 0,20 % en peso, con respecto al volumen total del enjuague bucal.

25 En el enjuague bucal, la clorhexidina puede estar presente ventajosamente también en forma de sal y de complejo. Preferiblemente, el enjuague bucal comprende clorhexidina en forma de sal o complejo. Como sal de clorhexidina, por ejemplo, se puede utilizar digluconato de clorhexidina o diacetato de clorhexidina en el enjuague bucal. Preferiblemente, el enjuague bucal comprende clorhexidina en forma de gluconato de clorhexidina.

El enjuague bucal comprende ADN sódico.

Preferiblemente, en el enjuague bucal la cantidad de ADN sódico está en el intervalo del 0,01 % al 0,2 %, más preferiblemente del 0,05 % al 0,1 %, en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.

30 El ADN sódico adecuado para los fines de la presente invención está disponible en el mercado, por ejemplo, el comercializado con el nombre de Kalinat aw polvo (Kalichem). Dicha cantidad de ADN sódico ha demostrado ser óptima para contrarrestar el efecto irritante de la clorhexidina en las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ellas y un efecto curativo sobre posibles heridas de la cavidad bucal, promoviendo así también un correcto trofismo de las propias mucosas bucales.

Preferiblemente, el enjuague bucal comprende al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo.

35 La presencia de al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo contrarresta el inconveniente de la pigmentación oscura de los dientes, un efecto secundario de la clorhexidina.

Preferiblemente, la al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo se selecciona del grupo que consiste en: metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, metabisulfito de calcio. Más preferiblemente, el enjuague bucal comprende metabisulfito de sodio.

40 Preferiblemente, en el enjuague bucal la cantidad de la al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo está en el intervalo del 0,1 % al 0,5 %, más preferiblemente del 0,15 % al 0,3 % en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.

Preferiblemente, el enjuague bucal comprende ácido ascórbico.

45 Preferiblemente, en el enjuague bucal la cantidad de ácido ascórbico está en el intervalo del 0,1 % al 1,0 % en peso, con respecto al volumen total del enjuague bucal.

La presencia de ácido ascórbico contrarresta el inconveniente de la pigmentación oscura de los dientes, un efecto secundario de la clorhexidina.

50 Preferiblemente, el enjuague bucal comprende ácido ascórbico y al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo, aún más preferiblemente del 0,1 % al 0,5 % en peso de al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo y del 0,1 % al 1,0 % en peso de ácido ascórbico, con respecto al volumen total del enjuague bucal.

Dicha combinación de componentes en dichas cantidades resultó ser óptima para contrarrestar el efecto secundario de la clorhexidina de la pigmentación oscura en los dientes.

Preferiblemente, el enjuague bucal comprende citrato de sodio tribásico.

5 Preferiblemente, en el enjuague bucal la cantidad de citrato de sodio tribásico está en el intervalo del 0,8 % al 2,0 %, más preferiblemente del 0,8 % al 1,2 %, en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.

La presencia de citrato de sodio tribásico en dichas cantidades permite, ventajosamente, regular el pH del enjuague bucal a valores óptimos para su uso.

10 En una realización preferida, el enjuague bucal comprende ácido ascórbico y citrato de sodio tribásico. Más preferiblemente, el enjuague bucal comprende del 0,1 % al 1 % en peso con respecto al volumen total del ácido ascórbico en el enjuague bucal y del 0,8 % al 2,0 % en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal de citrato de sodio tribásico.

En efecto, se ha descubierto sorprendentemente que dicha combinación de ácido ascórbico y citrato de sodio tribásico permite estabilizar la formulación del enjuague bucal

15 Preferiblemente, el enjuague bucal comprende al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo. Los copolímeros de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo adecuados para los fines de la presente invención están disponibles en el mercado, por ejemplo, los comercializados con el nombre de Luviskol® (BASF SE).

El al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo ejerce ventajosamente una acción formadora de película y antiplaca en el enjuague bucal

20 Preferiblemente, en el enjuague bucal la cantidad del al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo está en el intervalo del 0,05 % a 1 %, más preferiblemente del 0,3 % al 1 %, en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.

25 En una realización preferida del mismo, el producto para el cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende del 0,01 % al 0,30 % en peso de clorhexidina, del 0,01 % al 0,2 %, más preferiblemente del 0,01 % al 0,1 %, en peso de ADN sódico, del 0,1 % al 0,5 % en peso de al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo, del 0,1 % al 1,0 % en peso de ácido ascórbico, del 0,05 % al 1 %, más preferiblemente del 0,3 % al 1 %, en peso de al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, con respecto al volumen total del enjuague bucal.

El enjuague bucal puede contener uno o más de los otros posibles ingredientes conocidos en la técnica para soluciones para el cuidado bucal.

30 En concreto, el enjuague bucal puede comprender además uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en: edulcorantes, aromatizantes, agentes humectantes, conservantes, emulsionantes, reguladores del pH, colorante alimentario.

Como edulcorantes, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo, xilitol, sacarinato sódico, acesulfamo potásico, sucralosa, extracto de stevia.

35 Como aromatizantes, el enjuague bucal puede contener, por ejemplo, menta, mentol, anetol, *Mentha viridis*, canela, clavo, eucalipto.

Como agentes humectantes, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo, propilenglicol, sorbitol, glicerina

Como conservantes, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo, benzoato de sodio, metilisotiazolinona.

Como tensioactivos solubilizantes, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo: aceite de ricino hidrogenado Peg 40, poloxámero 407.

40 Como reguladores del pH, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo, citrato de sodio, ácido cítrico.

Como colorantes, el enjuague bucal puede comprender, por ejemplo, CI 19140, CIU 42090, CI 17200.

El enjuague bucal se prepara convenientemente de forma conocida en forma de solución o suspensión en un medio disolvente adecuado, preferiblemente agua.

Según una realización preferida, el enjuague bucal comprende los siguientes componentes:

- 45
1. Agua
  2. Xilitol
  3. Propilenglicol

## ES 2 932 551 T3

4. Aceite de ricino hidrogenado PEG 40
5. Ácido ascórbico
6. Digluconato de clorhexidina
7. Copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo
- 5 8. ADN sódico
9. Aromatizante
10. Poloxamer407
11. Metabisulfito de sodio
12. Citrato de sodio
- 10 13. Ácido cítrico
14. C.I. 42090
15. C.I. 17200

En una realización preferida adicional, el producto de cuidado bucal es un gel periodontal que comprende clorhexidina y ADN sódico.

15 Según una realización preferida, el gel periodontal comprende los siguientes componentes:

1. Agua
2. Propilenglicol
3. Hidroxietilcelulosa
4. Copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo
- 20 5. Aceite de ricino hidrogenado PEG 40
6. Digluconato de clorhexidina
7. Acetato de sodio
8. ADN sódico
9. Mentol
- 25 10. Aceite de menta
11. Ácido acético
12. Metabisulfito de sodio
13. Ácido ascórbico

30 Preferiblemente, el gel periodontal comprende del 0,5 % en peso al 1,0 % en peso de clorhexidina, con respecto al volumen total del gel periodontal.

Preferiblemente, el gel periodontal comprende ADN sódico en una cantidad máxima del 0,3%, más preferiblemente del 0,01 % al 0,3 %, en peso con respecto al peso total del gel periodontal.

En otra realización preferida adicional, el producto de cuidado bucal es una pasta de dientes que comprende clorhexidina y ADN sódico.

35 Según una realización preferida, la pasta de dientes comprende los siguientes componentes:

1. Sorbitol
2. Agua
3. Sílice (sílice hidratada)

4. Glicerol
  5. Xilitol
  6. Cocamidopropil betaína
  7. Copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo
  - 5 8. Aceite de ricino hidrogenado PEG 40
  9. Aromatizante
  10. Digluconato de clorhexidina
  11. Carboximetilcelulosa
  12. Ácido ascórbico
  - 10 13. Metabisulfito de sodio
  14. ADN sódico
  15. Sacarina sódica
  16. Benzoato de sodio
  17. Citrato de sodio
- 15 Preferiblemente, la pasta de dientes comprende del 0,05 % en peso al 0,2 % en peso de clorhexidina, con respecto al volumen total de la pasta de dientes.
- Preferiblemente, al menos un fluoruro inorgánico puede estar opcionalmente presente en la pasta de dientes.
- Preferiblemente, en la pasta de dientes la cantidad de ADN sódico está en el intervalo del 0,01 % al 0,05 % en peso con respecto al volumen total de la pasta de dientes.
- 20 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso del producto de cuidado bucal como agente antiirritante de la mucosa bucal.
- En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso del producto de cuidado bucal según la presente invención como agente curativo de la mucosa bucal. Preferiblemente, dicha mucosa bucal comprende el tejido periodontal.
- 25 De hecho, se ha descubierto que, gracias a la asociación del ADN sódico con la clorhexidina, el producto de cuidado bucal contrarresta el efecto irritante de esta última sobre las mucosas bucales, ejerciendo un efecto protector sobre ellas y un efecto curativo sobre posibles heridas de la cavidad bucal.
- También se ha comprobado que la asociación del ADN sódico con la clorhexidina permite limitar los efectos secundarios del uso prolongado de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina, que incluyen alteraciones de
- 30 la estructura celular, incluyendo vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares, obviando de este modo uno de los límites de aplicación y funcionalidad de dichos productos.
- Preferiblemente, la presente invención se refiere por tanto al uso del producto de cuidado bucal según la presente invención en un método para el tratamiento de al menos una patología seleccionada del grupo que consiste en: gingivitis, placa bacteriana y periodontitis.
- 35 Además, sorprendentemente se ha descubierto que el producto de cuidado bucal también es eficaz en el tratamiento de la mucositis periimplantaria. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la misma, la presente invención también se refiere al uso del producto de cuidado bucal según la presente invención en un método para el tratamiento de la mucositis periimplantaria.
- En otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere al uso de ADN sódico para su uso en un método para el
- 40 tratamiento de una patología de la mucosa bucal, en donde dicha patología conlleva una alteración de la estructura celular de dicha mucosa bucal, seleccionándose dicha alteración de la estructura celular del grupo que consiste en: vacuolización, degeneración del núcleo celular, expansión de los espacios intercelulares.
- De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que el ADN sódico ejerce una acción protectora sobre la estructura celular de la mucosa bucal, capaz de contrarrestar la aparición y la progresión de sus alteraciones, incluyendo
- 45 vacuolización, degeneración del núcleo celular, y expansión de los espacios intercelulares.

Preferiblemente, dicha mucosa bucal comprende el tejido periodontal.

5 El Solicitante también ha descubierto que dicha acción protectora del ADN sódico permite intervenir terapéuticamente sobre alteraciones celulares de la mucosa bucal de cualquier etiología, por ejemplo, limitando los efectos secundarios de los tratamientos con componentes activos que son especialmente agresivos para la estructura celular de las mucosas bucales, como por ejemplo la clorhexidina.

El Solicitante ha considerado que el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina constituye un aspecto innovador de especial valor a la luz de la aplicación mencionada y de los límites funcionales para el uso de productos de cuidado bucal a base de clorhexidina.

10 En otro aspecto de la misma, la presente invención también se refiere, por lo tanto, al ADN sódico para su uso en un método para el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina en un paciente sometido a tratamiento con clorhexidina, en donde dichos efectos secundarios implican una alteración de la estructura celular de la mucosa bucal de dicho paciente, seleccionándose dicha alteración de la estructura celular del grupo que consiste en: vacuolización, degeneración del núcleo celular, expansión de los espacios intercelulares.

Preferiblemente, dicha mucosa bucal comprende el tejido periodontal.

## 15 **Parte experimental**

La invención se describe ahora mediante algunos ejemplos que se considerarán a efectos ilustrativos no limitativos de la misma.

### **Ejemplo 1**

#### **Materiales y métodos**

20 Todos los reactivos, los medios de cultivo y los materiales desechables utilizados se obtuvieron de Merck (E.Merck AG, Darmstadt, Alemania). Se obtuvieron muestras de epitelio bucal humano reconstituido (en lo sucesivo "ROE") de 0,5 cm<sup>2</sup> (SkinEthic HOE™/Epitelio bucal humano) de EPISKIN (EPISKIN, Lyon Cedex 7, Francia). El ADN sódico (en lo sucesivo "ADNNa", Kalinat® AW) se obtuvo de KALICHEM (Kalichem, Brescia, Italia).

Se probaron las siguientes soluciones de enjuague bucal que no contienen conservantes:

- 25 A. enjuague bucal que contiene 0,2 % en peso de clorhexidina, con respecto al volumen total del enjuague bucal (control positivo);
- B. enjuague bucal que contiene 0,2 % en peso de clorhexidina y 0,01 % en peso de ADNNa, con respecto al volumen total del enjuague bucal (prueba);
- C. enjuague bucal que contiene 0,01% en peso de ADNNa, con respecto al volumen total del enjuague bucal);
- 30 D. solución salina tamponada con fosfato (PBS, control negativo).

#### ***Epitelio bucal humano reconstituido (ROE)***

35 Se utilizaron 32 muestras de ROE. Las muestras de ROE se abrieron bajo la campana en presencia de un flujo de aire estéril. Las muestras se dispusieron en placas de transporte de 24 pocillos que contenían medio con nutriente de agarosa. Las muestras se extrajeron de las placas de transporte y se eliminó la agarosa. A continuación, las muestras se colocaron en placas de 6 pocillos con medio nutritivo (medio RPMI 1640, complementado con 20 % de suero bovino fetal, 1 % de L-glutamina y 1 % de penicilina/estreptomicina). Antes de la prueba, las placas de cultivo se incubaron durante toda la noche a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y 100 % de humedad relativa.

#### ***Biorreactor***

40 Las pruebas se llevaron a cabo en dos biorreactores de flujo por goteo (DFR 110) disponibles en el mercado; BioSurface Technologies, Bozeman, MT, EE.UU.) adaptados para poder colocar las bandejas que contienen las muestras en el fondo de las celdas de flujo y poder sumergir las muestras ROE en el medio circulante circundante. Esto permitió el uso del medio nutritivo a un flujo continuo.

45 Todas las bandejas de los biorreactores que contenían los tubos de ensayo y las muestras se esterilizaron antes del inicio del experimento utilizando un chemiclave con tecnología de plasma de gas de peróxido de hidrógeno (Sterrad, ASP, Irvine, CA, EE.UU.). Limitando la temperatura máxima a 45 °C, se evitaron los daños en todo el sistema causados por el calor. Después de la esterilización, los biorreactores se montaron dentro de una campana estéril.

#### ***Procedimientos de prueba***

La figura 1 muestra una vista esquemática transversal, no a escala, del sistema utilizado para la experimentación, mostrando a modo de ejemplo uno de los dos biorreactores. El sistema 1 comprende una bomba peristáltica 11, un

reactor 10 del tipo de flujo por goteo y celdas de flujo 14, 15 y 16 que contienen las muestras. El reactor 10 del tipo de flujo por goteo está equipado con una cámara de flujo 21, una entrada 12 y un desagüe 13. La cámara de flujo 21 está configurada para contener un medio de flujo 20.

5 Las muestras de ROE se cortaron de su soporte utilizando bisturíes y pinzas estériles y se colocaron dentro de los biorreactores en ocho celdas de flujo 14, 15 y 16 de politetrafluoroetileno (PTFE) con cuatro agujeros cada una, que las fijó y expuso sus superficies al medio de flujo 20 que comprende un medio nutritivo (medio RPMI 1640, complementado con un 20 % de suero bovino fetal, 1 % de L-glutamina y 1 % de penicilina / estreptomina). Todas las bandejas se fijaron en el fondo de cada cámara de flujo 21 de los dos biorreactores 10 que funcionan en paralelo y se inocularon inmediatamente con un nuevo medio nutritivo. A continuación, los biorreactores se transfirieron a una incubadora que funcionaba a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % y al 100 % de humedad relativa. A continuación, se encendió una bomba peristáltica multicanal controlada por ordenador 11 (RP-1, Rainin, Emeryville, CA, EE.UU.), se ajustó a un caudal de 9,6 ml/h y se utilizó para proporcionar un flujo constante del medio de flujo 20 que comprende el medio nutritivo a través de las celdas de flujo. En la figura 1, las flechas 17, 18 y 19 indican esquemáticamente la dirección del flujo del medio de flujo 20. La bomba peristáltica 11 alimenta a través de la entrada 12 del reactor 10 el medio de flujo 20 en la cámara de flujo 21 de los dos biorreactores 10, que luego se drena a través del desagüe 13.

Después de 24 horas, la bomba 11 se detuvo y cuatro celdas de flujo 14, 15 y 16 se trataron respectivamente con las soluciones de enjuague bucal A, B, C y D, uno para cada celda de flujo (10 ml). En cada celda de flujo se trataron dos muestras durante 5 minutos y las otras dos durante 30 minutos inclinando el biorreactor 10 durante 25 minutos, para que la solución cubra completamente las dos muestras inferiores, y después se vuelve a poner en posición horizontal durante los 5 minutos restantes para cubrir las cuatro muestras. Las cuatro celdas de flujo restantes 14, 15 y 16 se trataron primero con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % durante 1 minuto para inducir un alto estrés oxidativo y daño celular, a continuación, las muestras se enjuagaron minuciosamente con PBS estéril durante 1 minuto y las celdas de flujo 14, 15 y 16 se trataron con las soluciones de enjuague bucal probadas, tal como se ha especificado anteriormente. De nuevo, en cada celda de flujo, se trataron dos muestras con las soluciones de enjuague bucal durante 5 minutos y las otras dos durante 30 minutos.

Después de esto, la bomba 11 se reactivó para lavar las soluciones de enjuague bucal durante 60 minutos, a continuación se extrajeron todas las muestras de ROE de las celdas de flujo 14, 15 y 16, se cortó inmediatamente en 4 partes iguales utilizando bisturíes y pinzas estériles y se trabajó de la siguiente manera.

#### **Evaluación de las muestras**

30 Las muestras de ROE de cada tratamiento se sometieron a pruebas de viabilidad MTT (n = 4), a imágenes de microscopía de barrido láser confocal (CLSM) (n = 2) y a una evaluación histológica (n = 2) mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión de imágenes (TEM).

#### **Prueba de viabilidad MTT**

La supervivencia de las células se evaluó mediante el ensayo de viabilidad MTT. La dosificación se llevó a cabo de la siguiente manera: se prepararon dos soluciones madre de partida disolviendo 5 mg / ml de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) en PBS estéril y 0,3 mg/ml de N-metilfenazinio metilsulfato (PMS) en PBS estéril. Las soluciones se almacenaron a 2 °C en viales resistentes a la luz hasta el día del experimento, cuando se preparó una nueva solución de medición (FMS) mezclando en una proporción de 1:1:8, respectivamente, solución madre de MTT, solución madre estéril de PMS y PBS. Se preparó una solución de lisis (LS) disolviendo 10 % v/v de dodecil sulfato de sodio y 50 % v/v de dimetilformamida en agua destilada. Las muestras de ROE sometidas a la prueba MTT se colocaron en los pocillos de una placa de fondo plano estéril de 24 pocillos. Después de esto, se pipeteó 1 ml de FMS en cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de luz durante 1 hora. Durante la incubación, el transporte de electrones a través de la membrana celular y, en menor medida, los sistemas celulares de óxido-reducción convirtieron la sal amarilla del MTT en formazán púrpura insoluble. La conversión fue facilitada por el aceptor de electrones intermedio (PMS). A continuación, se eliminó suavemente el FMS no reaccionado de los pocillos por aspiración y se disolvieron los cristales de formazán añadiendo 1 ml de LS en cada pocillo, seguido de una incubación adicional en condiciones de luz ambiental durante 1 hora. A continuación, se extrajo un total de 100 microlitros de la suspensión de cada pocillo y se midió la densidad óptica (a 550 nm) con un espectrofotómetro (Genesys 10-S, Thermo Spectronic, Rochester, NY, EE. UU.).

#### **Observaciones de CLSM**

La obtención de la imagen CLSM se realizó utilizando la tinción Live/Dead como se describe en Brambilla E, Ionescu A, Mazzoni A, Cadenaro M, Gagliani M, Ferraroni M, Tay F, Pashley D, Breschi L. (2014) Hydrophilicity of dentin bonding systems influences *in vitro* Streptococcus mutans biofilm formation. Dent Mater. 30(8): 926-35. En resumen, las muestras de ROE sometidas a observaciones CLSM se tiñeron con el kit de viabilidad LIVE/ DEAD® para microscopía (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido). La fluorescencia de las células teñidas en vivo se observó utilizando un CLSM (Eclipse Ti2 inverted CLSM, Nikon, Tokio, Japón). Se registraron cuatro secciones de una pila de imágenes seleccionadas al azar para cada muestra de ROE. Las imágenes confocales se obtuvieron con un objetivo seco Plan Apochromat 20x (NA 0,75) y se digitalizaron con el software propio de Nikon, con una resolución de 1024 x

1024 píxeles, con un factor de zoom de 1,0. Para cada sección de pilas de imágenes, se obtuvieron las reconstrucciones en 3D con el software Drishti 3D, como se describe en Lindhe J, Heyden G, Svanberg G, Løe H, Rindom Schiøtt C. (1970). Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. J. Periodont. Res. 5(3): 177-182.

## 5 **Evaluación histológica**

Las muestras de ROE sometidas a análisis histológico se fijaron durante la noche en una solución de Karnovsky recién preparada (2,0 % de paraformaldehído, 2,0 % de glutaraldehído en tampón de cacodilato de sodio 0,1 M).

Después de enjuagar en el tampón, las muestras se tiñeron con un 2% de OsO<sub>4</sub> y un 2 % de acetato de uranilo. A continuación, las muestras se deshidrataron en soluciones de acetona y se incorporaron a la resina Epon-Araldite (Fluka, Italia). Se prepararon cortes transversales de 0,5 micrómetros, sometidos a tinción con azul de toluidina, de todas las muestras de los diferentes grupos experimentales y a continuación se observaron por microscopía óptica (software Pro Plus Imaging) a un aumento final de 1500x, y por TEM (microscopio Zeiss EM10).

## **Resultados**

### **Ensayo MTT**

15 En el conjunto de datos del ensayo de viabilidad MTT se comprobó preliminarmente la normalidad de la distribución (prueba de Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad (prueba de Levene). Dado que los datos no se distribuyen normalmente ni siquiera después de la transformación logarítmica, se realizó el análisis no paramétrico usando la prueba de Wilcoxon ( $p < 0,05$ ).

20 Los resultados obtenidos en las células ROE a diferentes tiempos de tratamiento con las soluciones A, B, C y D se muestran en la figura 2. La figura 3 muestra los resultados del ensayo de viabilidad MTT en las células ROE después de 1 minuto de tratamiento con una solución al 3 % en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los diferentes tiempos de tratamiento posteriores con las soluciones A, B, C y D.

25 Como se puede observar en la figura 2, después de 5 minutos de tratamiento con las soluciones de enjuague bucal, se observó una disminución significativa de la viabilidad en las muestras tratadas con la solución C en comparación con la solución B. No se identificó ningún cambio significativo en la viabilidad de las soluciones con respecto al control negativo (solución D). El tratamiento de las muestras de ROE con las soluciones de enjuague bucal durante 30 minutos tuvo como resultado una reducción significativa de la viabilidad mediante la solución C con respecto a las soluciones que contienen clorhexidina. El tratamiento con un 3 % en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 3) provocó una disminución general de la viabilidad. Las muestras tratadas durante 5 minutos mostraron una viabilidad significativamente mayor tras el tratamiento con la solución A que con la solución B pero, después de 30 minutos de tratamiento, la diferencia entre estas dos soluciones disminuyó de forma significativa y fue significativamente mayor que con las soluciones C y D. Además, la solución C provocó una viabilidad significativamente mayor que la solución D, lo que sugiere una actividad significativa y positiva del ADNNa sobre la viabilidad celular.

### **Observaciones de CLSM**

35 Las reconstrucciones de microscopía confocal obtenidas tras un tratamiento de 5 minutos con las soluciones de enjuague bucal no mostraron diferencias entre los grupos. Las reconstrucciones de las muestras tras 30 minutos de tratamiento se muestran en la figura 4 (muestras tras 30 minutos de tratamiento con las soluciones A, B, C y D) y en la figura 5 (muestras tras 1 minuto de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 30 minutos después del tratamiento con las soluciones A, B, C y D).

40 Las muestras tratadas con la solución A y, en menor medida, con la solución B mostraron una buena conservación de la estructura celular incluso en las muestras expuestas al peróxido de hidrógeno. Las muestras de control negativo (D) mostraron la presencia de células muertas en la superficie y, después del tratamiento con peróxido de hidrógeno, en la superficie se podía identificar una capa casi completamente compuesta por células muertas. Las muestras tratadas sólo con ADNNa (solución C) mostraron una cantidad mucho menor de células muertas que en el control negativo, tanto en ausencia como en presencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno.

### **Evaluación histológica**

50 Los cortes del tejido ROE (0,5 µm) obtenidos tras el tratamiento de 5 minutos con las soluciones de enjuague bucal no mostraron diferencias entre los grupos. Los cortes de las muestras después de 30 minutos de tratamiento se muestran en la figura 6 (muestras tratadas con las soluciones A, B, C y D) y en la figura 7 (muestras tras 1 minuto de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y posterior tratamiento con las soluciones A, B, C y D).

Considerando las muestras de la figura 6, el control negativo (D) mostró la conservación completa de las estructuras tisulares. Las muestras tratadas con las soluciones A y, en menor medida, B mostraron alteraciones de la estructura celular, como vacuolización, núcleo degenerado y la ampliación inicial de los espacios intercelulares, tanto en las capas más externas como en las basales. Estas alteraciones pueden deberse a la actividad de la clorhexidina. De

hecho, la adición de ADNNa al enjuague bucal de clorhexidina (solución B) mostró alteraciones menos intensas de la estructura celular con respecto al enjuague bucal sólo con clorhexidina (solución A). Las muestras tratadas con la solución C mostraron las mismas alteraciones, pero limitadas a la primera capa celular. El tratamiento con peróxido de hidrógeno (véase la figura 7) mostró, como se esperaba, un gran daño en las células ROE, como una marcada vacuolización, núcleo degenerado y el ensanchamiento de los espacios intercelulares. Estas alteraciones fueron más evidentes en las muestras tratadas con el control negativo (D) y con la solución A (sólo clorhexidina). En las muestras tratadas con la solución B, pueden encontrarse en las capas más internas algunas células que no muestran signos de degeneración, donde estas células estaban probablemente más protegidas de las especies reactivas de oxígeno generadas por el peróxido de hidrógeno y donde el ADNNa ejercía una acción de minimización del daño celular. Las muestras tratadas con el enjuague bucal C (sólo ADNNa) mostraron signos mínimos de degeneración celular.

En conclusión, el ADNNa mostró una clara acción protectora contra la degeneración celular debida al estrés oxidativo y a la exposición a las soluciones de enjuague bucal que sólo contenían clorhexidina.

## Ejemplo 2

El objetivo de este experimento es probar la eficacia del producto de cuidado bucal según la presente invención en forma de gel en presencia de mucositis periimplantaria, es decir, en presencia de una hemorragia al sondear alrededor de un implante en ausencia de pérdida de hueso de soporte y de bolsas patológicas (<3 mm). Selección de pacientes

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los criterios de la Declaración de Helsinki y según los principios de la Buena Práctica Clínica tras la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Biomédica de Chieti y Pescara. Por lo tanto, se reclutaron pacientes con mucositis periimplantaria en el Departamento de Medicina, Ciencias Orales y Biotecnológicas con el fin de evaluar las propiedades de control de la placa bacteriana y la inflamación.

Los pacientes seleccionados para el estudio se reclutaron de acuerdo con los principios consagrados en la Declaración de Helsinki para la realización de estudios científicos, y según los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con buena salud, por lo tanto, ausencia de: enfermedades sistémicas relevantes, como, principalmente, diabetes, enfermedades inmunitarias, enfermedades hematológicas; neoplasias; enfermedades infecciosas graves como el VIH o la hepatitis viral con signos y/o síntomas de insuficiencia hepática; dificultades cognitivas; dificultades intelectuales; déficits motrices;
- Mayores de 18 años;
- Participación en la experimentación mediante un consentimiento informado específico; Candidatos seleccionados por la presencia de un implante afectado por mucositis, definido como:
- Presencia de sangrado al sondeo en ausencia de pérdida de hueso de soporte alrededor del implante;
- Ausencia de movilidad del implante;
- Presencia de al menos 2 mm de encía queratinizada alrededor del implante;
- Ausencia de rehabilitaciones de implantes que no sean coronas individuales o puentes de tres elementos como máximo;
- Ausencia de signos evidentes de sobrecarga o traumatismo oclusal.

Los principios de exclusión serán los siguientes:

- No hay desdentados totales después del procedimiento quirúrgico del implante (si no hay elementos naturales después de la cirugía,, es imposible determinar la placa, las variables de sangrado);
- No fumadores o fumadores ligeros (menos de 10 cigarrillos al día);
- Buen cuidado bucal con bajos niveles de placa e índice de sangrado y ausencia de lesiones periodontales en otros elementos dentales (FMPS y FMBS  $\leq$  25 %);
- Pacientes alérgicos al gluconato de clorhexidina o a otros componentes de la formulación del dispositivo y del placebo.

Elección del índice de evaluación principal

Objetivos principales: Puntuación del índice de placa: se registró la presencia/ausencia de placa en las superficies evaluadas.

Elección del índice de evaluación secundario

Registro de parámetros clínicos de

-Sangrado al sondeo ("BOP"): se registró la presencia/ausencia de sangrado al sondeo.

-Índice gingival (Loe & Silness 1963): la salud de los tejidos periodontales se registró según el siguiente criterio:

0 = Encía normal;

1 = Inflamación leve - ligero edema y cambio de color en ausencia de sangrado al sondeo;

5 2 = Inflamación moderada - enrojecida, tejidos edematosos y sangrado al sondeo;

3 = Inflamación importante - marcado enrojecimiento, edema, ulceración y tendencia a la hemorragia.

#### Análisis Estadístico

10 Se realizó un análisis descriptivo de los datos, donde las variables cuantitativas se presentan con la media y la desviación estándar. Para comparar los dos grupos examinados con respecto a las variables cuantitativas, se utiliza la prueba T de Student. El nivel de significación se ha fijado en el 5 %. La distribución normal se evaluó mediante la prueba de Kilmogorov Smirnof (valor  $p > 0,05$ ) y mediante la evaluación de los gráficos con las variables de respuesta de 14 días.

#### Fases experimentales

Se han probado los siguientes geles:

15 E. gel que contiene 0,2 % en peso de clorhexidina y 0,01 % en peso de ADNNa;

F. gel "placebo" de composición idéntica al gel E pero que no contiene ni clorhexidina ni ADNNa;

El tamaño de la muestra fue de 24 pacientes, con una proporción de reclutamiento entre los dos grupos de 1:1 (12 pacientes por grupo experimental).

20 Después de registrar las variables clínicas y una sesión de cuidado bucal, cada paciente recibió un tubo de gel anónimo, una jeringa y una boquilla aplicadora para las aplicaciones (3 veces al día durante 14 días). Los pacientes que recibieron el gel E (que contiene 0,2 % en peso de clorhexidina y 0,01 % en peso de ADNNa), fueron identificados como Grupo A, los pacientes que recibieron el gel F (gel "placebo"), fueron identificados en cambio como Grupo B.

Los controles con los valores a registrar durante los seguimientos se establecieron de la siguiente manera:

• Basal (Tiempo 0, "T0")

25 • 14 días después de la cirugía (Tiempo 1, "T1")

En la fase T0, se creó el registro periodontal con la recogida del índice de placa, sangrado al sondeo, y el índice gingival según el protocolo clínico.

30 Todos los pacientes que completaron la fase de estudio clínico T0 y T1. Por ello, se instruyó a los sujetos sobre las maniobras correctas de cuidado bucal en casa y se les volvió a evaluar al cabo de 14 días. En la fase T1, se creó el registro periodontal con la recogida del índice de placa, sangrado al sondeo, y el índice gingival según el protocolo clínico. No se registraron efectos adversos durante el periodo de estudio. Asimismo, no hubo efectos indeseados o secundarios tras la administración del gel E o F.

#### Resultados

##### Índices de valoración principales

35 En el momento T0, el valor basal con respecto al índice de placa detectado es de  $2,4 \pm 0,4$  para el Grupo A (gel E) y de  $2,2 \pm 0,5$  para el Grupo B (gel F) ( $p > 0,05$ ). Después de 2 semanas de tratamiento (T1), el índice de placa medido es de  $0,5 \pm 0,4$  para el grupo A (gel E) y de  $1,7 \pm 1,9$  para el grupo B (gel F) ( $p < 0,05$ ).

##### Índices de valoración secundarios

40 En el momento T0, el valor basal con respecto al BOP detectado fue de  $57,1 \% \pm 15,2 \%$  para el Grupo A (gel E) y de  $55,3 \% \pm 11,7 \%$  para el Grupo B (gel F) ( $p > 0,05$ ). Después de 2 semanas de tratamiento (T1) el BOP medido es del  $14,3 \% \pm 6,6 \%$  para el Grupo A (gel E) y del  $45,4 \% \pm 9,8 \%$  para el Grupo B (gel F) ( $p < 0,05$ ).

Los datos relativos al índice gingival medido en los diferentes tiempos experimentales: en el basal, y en T1 después de dos semanas de tratamiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

	Grupo A (gel E)	Grupo B (gel F)	Valor P
Índice gingival T0	2,21 ± 0,51	2,35 ± 0,67	p > 0,05
Índice gingival T1	0,82 ± 0,53	1,62 ± 0,74	p < 0,05

### Conclusiones

- 5 En el tiempo experimental T1 surge una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A (gel E) y el Grupo B (gel F) con respecto al parámetro principal Puntuación de la placa. Los beneficios del tratamiento también son evidentes en relación con los índices secundarios de sangrado al sondeo y el índice gingival, observándose una diferencia estadísticamente significativa de los parámetros evaluados a favor del Grupo A, confirmando así la eficacia del producto de cuidado bucal según la presente invención en el tratamiento de la mucositis periimplantaria.

### Ejemplo 3

- 10 El propósito de este experimento es evaluar clínicamente las propiedades antimicrobianas y de control de la placa dental del producto de cuidado bucal según la presente invención en forma de enjuague bucal sobre el tejido blando de la cavidad bucal después de dos semanas en pacientes con patología periodontal.

#### Selección de pacientes

- 15 El experimento se llevó a cabo de acuerdo con los criterios de la Declaración de Helsinki y según los principios de la Buena Práctica Clínica tras la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Biomédica de Chieti y Pescara. Por lo tanto, los pacientes con enfermedad periodontal fueron reclutados en el Departamento de Medicina, Ciencias Orales y Biotecnológicas con el fin de evaluar las propiedades de control de la placa bacteriana y la inflamación gingival.

Los pacientes fueron reclutados de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con periodontitis crónica con sondeos > 3 mm en un número mayor o igual a 20 elementos;
- 20 • Pacientes no fumadores o moderadamente fumadores (<10 cigarrillos al día);

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes con dispositivos de ortodoncia;
- Intolerancias o alergias a los enjuagues bucales;
- Tabaquismo y consumo de alcohol;;
- 25 • Pacientes sometidos a radioterapia/quimioterapia durante menos de 5 años;
- Pacientes inmunocomprometidos;
- Sistémico, enfermedades renales o cardiovasculares;
- Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o sometidas a terapia antibiótica y antiinflamatoria.

#### Elección del índice de evaluación principal

- 30 Puntuación de la placa en toda la boca (FMPS): se registrará la presencia/ausencia de placa en 4 sitios por diente y se calculará el porcentaje en relación con las superficies

#### Elección del índice de evaluación secundario

Puntuación de sangrado en toda la boca (FMBS): se registrará la presencia/ausencia de sangrado al sondear en 4 sitios por diente y se calculará el porcentaje en relación con las superficies.

- 35 Índice gingival (Loe & Silness 1963): la salud de los tejidos periodontales se registra según el siguiente criterio:

0 = Encía normal;

1 = Inflamación leve - ligero edema y cambio de color en ausencia de sangrado al sondeo;

2 = Inflamación moderada - enrojecida, tejidos edematosos y sangrado al sondeo;

3 = Inflamación importante - marcado enrojecimiento, edema, ulceración y tendencia a la hemorragia.

Registro de cualquier complicación, acontecimientos adversos y abandonos.

Análisis Estadístico

- 5 La distribución de los datos de FMPS, FMBS y GI relativos a los grupos experimentales en diferentes momentos experimentales, como el basal, 1 semana y 2 semanas, se evaluaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La significación de los datos del estudio se evaluó mediante la prueba T de Student para  $p < 0,05$ .

Tratamiento experimental

Se han probado los siguientes enjuagues bucales:

G: enjuague bucal que contiene 0,2 % en peso de clorhexidina y 0,01 % en peso de ADNNa;

- 10 H: enjuague bucal "placebo" con una composición idéntica a la del gel E pero que no contiene ni clorhexidina ni ADNNa.

El tamaño de la muestra fue de 54 pacientes, con una proporción de reclutamiento entre los dos grupos de 1:1 (27 pacientes por grupo experimental).

- 15 Los pacientes que recibieron el enjuague bucal G (que contenía 0,2 % en peso de clorhexidina y 0,01 % en peso de ADNNa) se identificaron como Grupo A, los pacientes que recibieron el enjuague bucal H (enjuague bucal "placebo"), fueron identificados como Grupo B.

Fases del estudio

Fase experimental V1. Revisión de cribado para evaluar la elegibilidad del paciente y la inclusión en el estudio. Aprobación del consentimiento informado y de las instrucciones de cuidado bucal.

- 20 Fase experimental V2 (basal). Registro periodontal con registro de la puntuación de placa en toda la boca (FMPS) y la puntuación de sangrado en toda la boca (FMBS) y el índice gingival (GI). Los pacientes recibirán el envase de enjuague bucal en función del grupo de estudio asignado (A o B) y se realizará un enjuague de 10 ml. El protocolo incluía un total de tres enjuagues en el domicilio al día (por la mañana y por la noche después de las comidas) durante 2 semanas de tratamiento.

- 25 Fase experimental V3 (1 semana) Control con registro de los siguientes índices FMPS, FMBS y GI.

Fase experimental V4 (2 semanas) Control con registro de FMPS, FMBS, GI, y el acabado para eliminar las posibles manchas que se hayan formado.

## Resultados

Índices de valoración principales

- 30 En el momento V2, el valor basal con respecto a la FMPS detectada fue de  $52,7 \pm 9,2$  para el Grupo A (enjuague bucal G) y de  $58,2 \pm 6,1$  para el Grupo B (enjuague bucal H) ( $p > 0,05$ ). A la semana de tratamiento (V3), la FMPS medida fue de  $13,3 \pm 5,6$  para el Grupo A y de  $18,7 \pm 4,3$  para el Grupo B ( $p < 0,05$ ). Por último, a las 2 semanas de tratamiento (V4) la FMPS fue de  $14,2 \pm 4,1$  para el Grupo A y de  $20,3 \pm 5,2$  para el Grupo B ( $p < 0,05$ ).

Índices de valoración secundarios

- 35 En el momento V2, el valor basal con respecto a la FMBS detectada fue de  $46,7 \pm 8,7$  para el Grupo A y de  $49,2 \pm 6,2$  para el Grupo B ( $p > 0,05$ ). A la semana de tratamiento (V3), la FMPS medida fue de  $12,7 \pm 4,2$  para el Grupo A y de  $18,5 \pm 5,9$  para el Grupo B ( $p < 0,05$ ). Por último, a las 2 semanas de tratamiento (V4) la FMBS fue de  $13,1 \pm 3,2$  para el Grupo A y de  $19,8 \pm 4,9$  para el Grupo B ( $p < 0,05$ ).

- 40 Los datos relativos al índice gingival medido en los diferentes tiempos experimentales: en el basal, a la semana y a las 2 semanas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

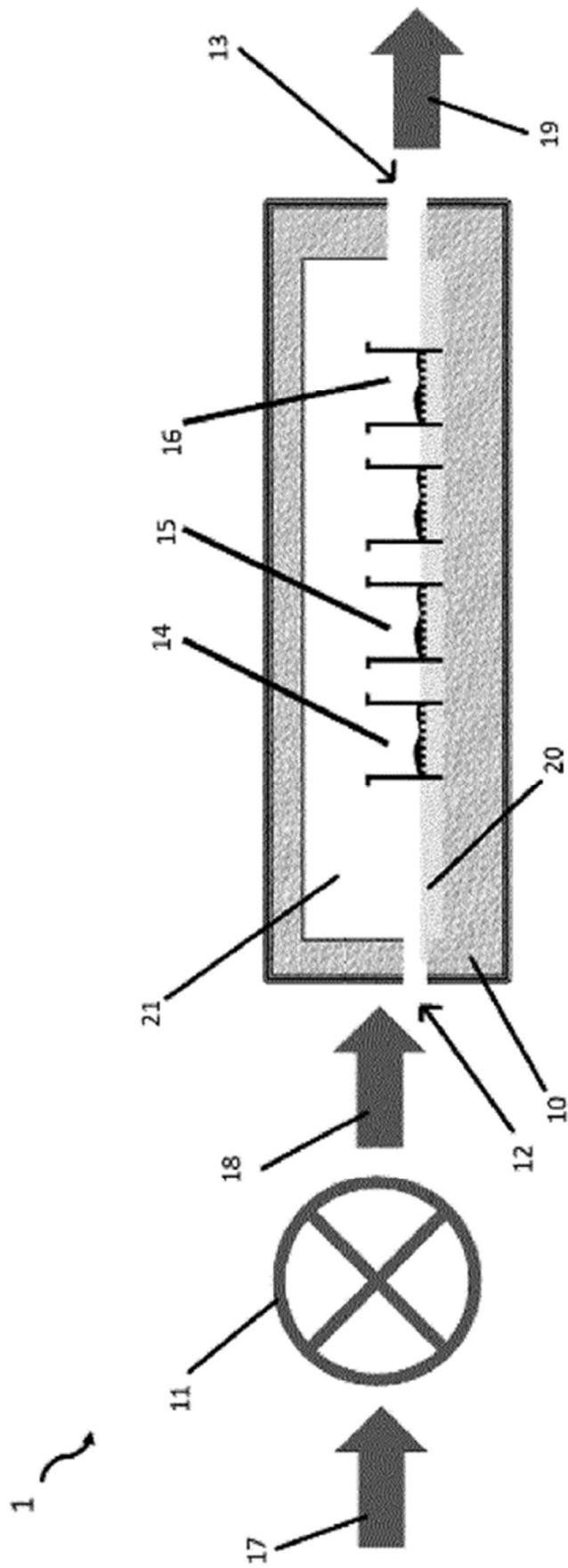
	Grupo A (enjuague bucal G)	Grupo B (enjuague bucal H)	Valor P
Índice gingival V2 (línea basal)	2,85 ± 0,47	2,71 ± 0,51	p > 0,05
Índice gingival V3 (1 semana)	1,14 ± 0,55	1,75 ± 0,49	p < 0,05
Índice gingival V4 (2 semanas)	1,09 ± 0,44	1,96 ± 0,39	p < 0,05

### Conclusiones

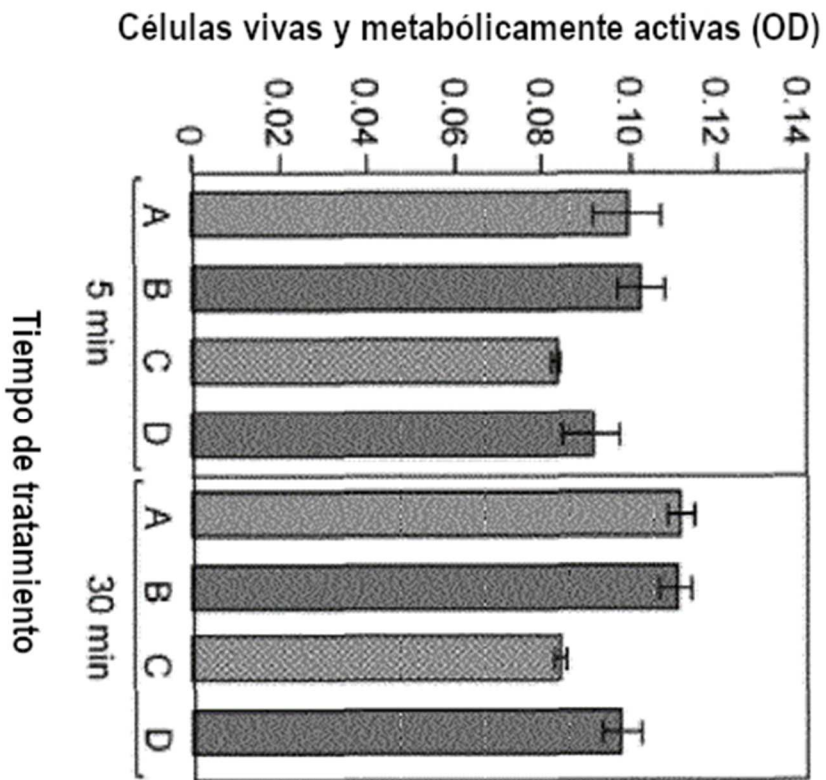
- 5 Ya en el tiempo experimental V3 se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el Grupo A y el Grupo B con respecto al parámetro principal FMPS. Diferencia que se confirma después de dos semanas de tratamiento, en el que los niveles medios de FMPS se mantienen por debajo del 20 % en el Grupo A. En este sentido, los beneficios del tratamiento también son evidentes en relación con los índices secundarios de la FMBS y el índice gingival que muestran una variación estadísticamente significativa de los parámetros clínicos a favor del Grupo A, un resultado que se puede relacionar con el efecto beneficioso inducido por el producto de cuidado bucal según la invención en los tejidos gingivales de los sujetos sometidos a tratamiento.
- 10

## REIVINDICACIONES

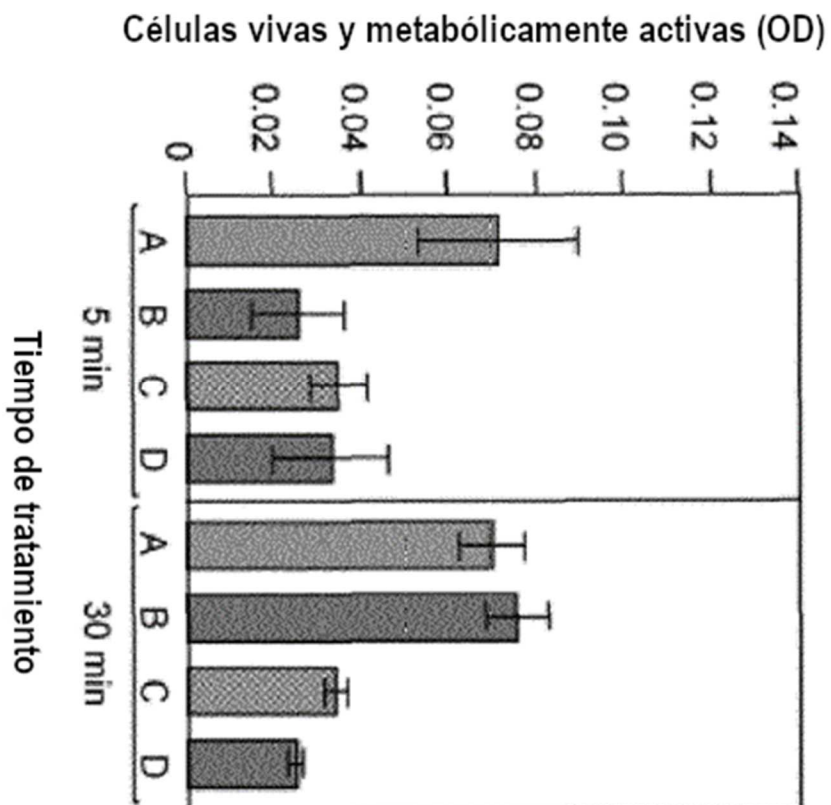
- 5 1. ADN sódico para su uso en un método para el tratamiento de los efectos secundarios de la clorhexidina en un paciente sometido a un tratamiento con clorhexidina, en donde dichos efectos secundarios conllevan una alteración de la estructura celular de la mucosa bucal de dicho paciente, seleccionándose dicha alteración de la estructura celular del grupo que consiste en: vacuolización, degeneración del núcleo celular, expansión de los espacios intercelulares.
2. ADN sódico para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento con clorhexidina se realiza con un producto de cuidado bucal que comprende clorhexidina y ADN sódico.
3. ADN sódico para su uso según la reivindicación 2, en donde dicho producto de cuidado bucal que comprende clorhexidina y ADN sódico se selecciona del grupo que consiste en: enjuague bucal, gel periodontal y pasta de dientes.
- 10 4. ADN sódico para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal y la cantidad de clorhexidina está en el intervalo del 0,01 % al 0,30 % en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.
5. ADN sódico para uso según la reivindicación 3 o 4, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal y la clorhexidina está en forma de sal o de complejo.
- 15 6. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal y la cantidad de ADN sódico está en el intervalo del 0,01 % al 0,2 % en peso con respecto al volumen total del enjuague bucal.
7. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo.
- 20 8. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende ácido ascórbico.
9. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo.
- 25 10. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende citrato de sodio tribásico.
- 30 11. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde dicho producto de cuidado bucal es un enjuague bucal que comprende del 0,01 % al 0,30 % en peso de clorhexidina, del 0,01 % al 0,2 % en peso de ADN sódico, del 0,1 % al 0,5 % en peso de al menos una sal metabisulfito de un metal alcalino o alcalinotérreo, del 0,1 % al 1,0 % en peso de ácido ascórbico, del 0,05 % al 1 % en peso de al menos un copolímero de polivinilpirrolidona-acetato de vinilo, con respecto al volumen total del enjuague bucal.
12. ADN sódico para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho producto de cuidado bucal es un gel periodontal que comprende del 0,5 % al 1,0 % en peso de clorhexidina, con respecto al volumen total del gel periodontal.
- 35 13. ADN sódico para uso según la reivindicación 3 o 12, en donde dicho producto de cuidado bucal es un gel periodontal que comprende ADN sódico en una cantidad como máximo del 0,3 % en peso con respecto al peso total del gel periodontal.
14. ADN sódico para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho producto de cuidado bucal es una pasta de dientes que comprende del 0,05 % al 0,2 % en peso de clorhexidina, con respecto al volumen total de la pasta de dientes.
- 40 15. ADN sódico para su uso según la reivindicación 3 o 14, en donde dicho producto de cuidado bucal es una pasta de dientes que comprende ADN sódico en una cantidad del 0,01 % al 0,05 % en peso con respecto al volumen total de la pasta de dientes.
16. ADN sódico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho tratamiento con clorhexidina es para el tratamiento de al menos una patología seleccionada del grupo que consiste en: gingivitis, placa bacteriana y periodontitis.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

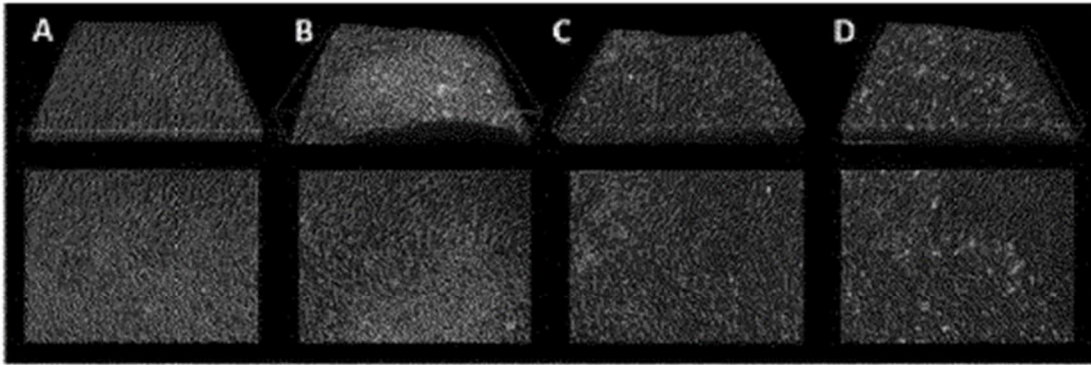


FIG. 4

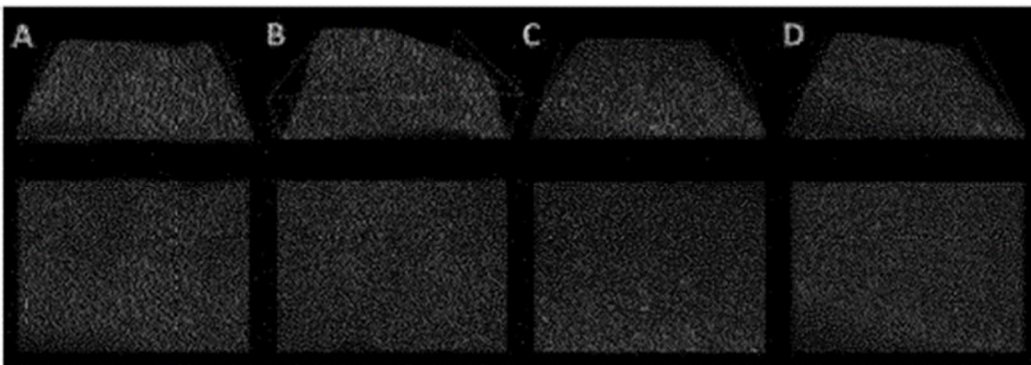
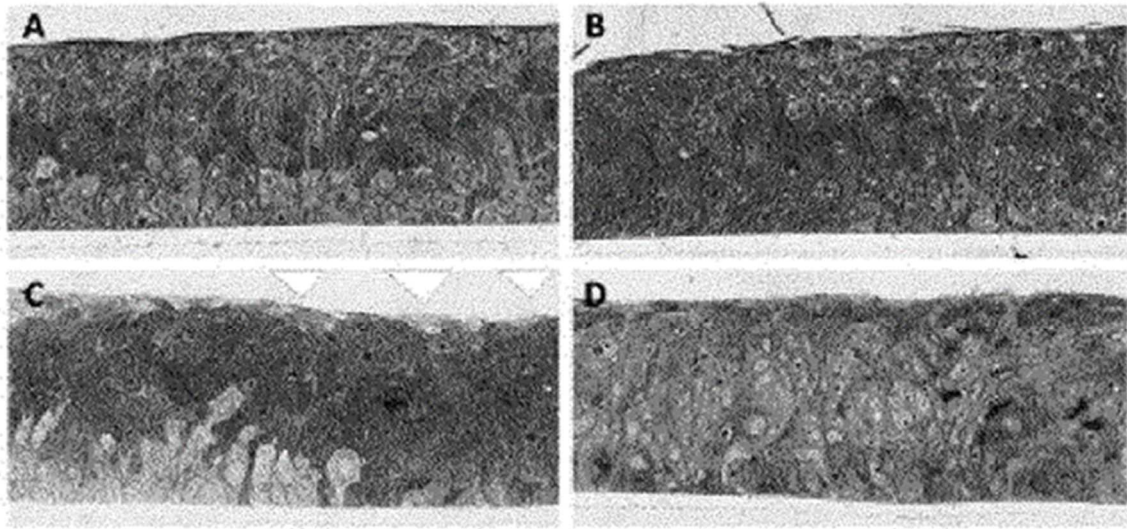
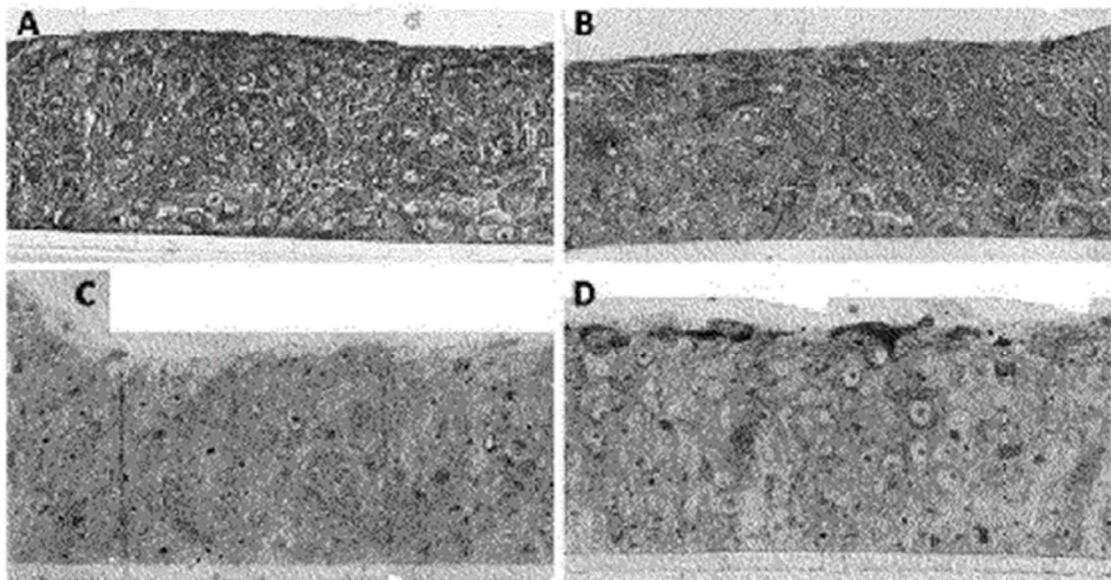


FIG. 5



**FIG. 6**



**FIG. 7**