

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 870**

51 Int. Cl.:

A01N 59/16 (2006.01)

A01N 25/30 (2006.01)

A01N 33/12 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A61K 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/GB2012/000329**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136968**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12719420 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.09.2021 EP 2693884**

54 Título: **Composición antimicrobiana que comprende iones de plata, un tensioactivo catiónico cuaternario y una sal de EDTA**

30 Prioridad:

06.04.2011 GB 201105829

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

15.03.2022

73 Titular/es:

**CONVATEC TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
3993 Howard Hughes Parkway Suite 250
Las Vegas, NV 89169-6754, US**

72 Inventor/es:

PARSONS, DAVID

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 899 870 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

Composición antimicrobiana que comprende iones de plata, un tensioactivo catiónico cuaternario y una sal de EDTA

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana que se puede aplicar sobre la piel, las heridas, los cortes, las abrasiones o las quemaduras para prevenir o para tratar de infecciones, o sobre los apósitos para heridas y similares para su aplicación en la piel, heridas, cortes, abrasiones o quemaduras. Más particularmente, la invención se refiere a una composición capaz de proporcionar una actividad antimicrobiana eficaz a la vez que evita irritación en la piel y en las heridas, así como el retraso de la cicatrización de la herida.

El uso excesivo de antibióticos y el aumento asociado de la resistencia bacteriana están afectando la eficacia de los antibióticos en el tratamiento de la infección de heridas. Por tanto, son deseables alternativas eficaces a los antibióticos.

Se ha reconocido desde hace mucho tiempo que los materiales antimicrobianos tópicos y las preparaciones que los contienen desempeñan un papel importante para minimizar la posibilidad de infecciones de la piel y las heridas. Los antimicrobianos que no son antibióticos son agentes químicos no selectivos que pueden ser seguros para usar en tejidos vivos. El yodo molecular, la plata iónica y los agentes oxidantes como el hipoclorito de sodio y el dióxido de cloro han sido reconocidos como agentes antimicrobianos con eficacia contra una amplia gama de microorganismos.

Sin embargo, existen varios obstáculos para conseguir una composición antimicrobiana eficaz para su aplicación sobre las heridas basada en tales agentes. Un problema es que estos agentes antimicrobianos tienden a reaccionar con materiales orgánicos que se encuentran en la herida distintos de los objetivos microbianos previstos. Lo anterior significa que para que sean eficaces, los agentes antimicrobianos deben incluirse en las composiciones de tratamiento a niveles elevados, lo que puede provocar efectos secundarios indeseables con el uso prolongado, tales como la toxicidad celular, las reacciones de hipersensibilidad, la tinción de la piel y efectos sistémicos.

Estos efectos secundarios se describen con más detalle en las publicaciones: *"In vitro cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care"* [*"Citotoxicidad in vitro de la plata: implicaciones para el cuidado clínico de heridas"*]. Poon VK, Burd A. Burns. 2004 Mar; 30 (2): 140-7, *"A review of iodine toxicity reports"* [*"Una revisión de los informes de toxicidad del yodo"*]. Pennington JA. J Am Diet Assoc. 1990 Nov; 90 (11): 1571-81 y *"Toxicidad antimicrobiana tópica"* [*"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. Smith & Nephew et al: *"OTC Medication Information: Dermal Wound Cleanser - benzethonium chloride spray"* [*"Información sobre medicamentos de venta libre: Higienizador de heridas dérmicas - aerosol de cloruro de bencetonio"*], 17 de diciembre de 2009, páginas 1-9, en <http://otclabels.com/lib/otc/otc-meds/dermal-wound-cleanser/> en donde se describen limpiadores que incluyen cloruro de bencetonio al 0,13% y EDTA disódico al 0,02% como limpiadores [higienizadores] de heridas.

El documento WO2007/068938A2 describe una composición para el tratamiento antimicrobiano de piel y heridas, que incluye sales de EDTA (por sus siglas en inglés de *"ethylenediaminetetra-acetic acid"* o en español *"ácido etilendiaminotetraacético"*) y plata iónica.

Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para conseguir que las composiciones para el tratamiento sean efectivas sin que simplemente se aumente el nivel del agente antimicrobiano incluido en la composición. También se ha reconocido que las bacterias de las heridas a menudo existen en las biopelículas y que estas son más difíciles de tratar que sus contrapartes planctónicas.

Hemos descubierto que es posible aumentar la eficacia de los iones metálicos antimicrobianos al incluir un tensioactivo catiónico cuaternario en la formulación.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona una composición antimicrobiana adecuada para su uso en la piel y en las heridas que comprende una fuente de iones metálicos antimicrobianos y un tensioactivo catiónico cuaternario presente en un nivel superior o igual al 0,025% en peso; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) presente como sales di-, tri- o tetra-básicas de EDTA a un nivel de 0,2% a 1% en peso; en donde la composición tiene un pH de 4 a 6; y la plata iónica está presente en la composición a un nivel del 0,01% al 10% en peso.

La presencia del tensioactivo catiónico cuaternario potencia el efecto del ión metálico antimicrobiano de modo que se mejora el rendimiento del ión metálico antimicrobiano. Por ejemplo, la presencia del tensioactivo catiónico cuaternario puede aumentar la velocidad a la que actúa el ion metálico antimicrobiano.

Por el término antimicrobiano se entiende una sustancia que inhibe el crecimiento de, o elimina, microorganismos de los reinos taxonómicos de bacterias, hongos y protozoos. Por tanto, una composición antimicrobiana eficaz es aquella que se utiliza para reducir y prevenir la propagación y proliferación de microorganismos en una aplicación específica. En el cuidado de heridas, esto se puede interpretar en términos de control de infecciones cruzadas, prevención o eliminación de infecciones y reducción de la biocarga recalcitrante que puede causar retraso en la

cicatrización y cronicidad.

También hemos descubierto que es posible preparar una composición que incluya un tensioactivo catiónico cuaternario que sea eficaz en las condiciones de pH que normalmente se encuentran en una herida.

5 Las composiciones según un primer aspecto de la invención comprenden un agente antimicrobiano, preferiblemente un ión metálico por ejemplo plata, hierro, níquel, cobre, cromo, manganeso, oro, galio, magnesio, mercurio, plomo, aluminio, plomo, zinc, bismuto, estaño y paladio. Preferiblemente, el ion metálico es plata. El agente antimicrobiano se incluye preferiblemente en la composición a un nivel del 0,1% al 5% e incluso más preferiblemente del 0,5% al 10 1,5% en peso o del 1% al 5%. Si la composición está en solución acuosa, el ion metálico antimicrobiano está preferiblemente en una solución acuosa que comprende de 0,00001% a 1,0% en peso o más preferiblemente 0,0001% a 0,1%, incluso más preferiblemente 0,0001% a 0,02% en peso o 0,001% a 1,0 % por peso.

15 Las composiciones según la invención comprenden un tensioactivo catiónico. El tensioactivo catiónico puede ser una sal de amonio cuaternario, una sal de alquilpiridinio, una sal de imidazolio de alquilo, una sal de morfolinio de alquilo, una sal de bencetonio o una sal de amonio cuaternario etoxilada o mezclas de las mismas. Preferiblemente, cuando la sal es una sal de amonio cuaternario, se selecciona del grupo de sales de monoalquil trimetil amonio, sales de dialquil dimetil amonio y sales de monoalquil monobencil dimetil amonio.

20 Preferiblemente, el tensioactivo catiónico es un tensioactivo catiónico cuaternario y más preferiblemente un tensioactivo de amonio cuaternario. Preferiblemente, el tensioactivo catiónico se selecciona del grupo de cationes de bencetonio, benzalconio, dimetildialquilonio, alquilpiridinio y alquiltrimetilamonio con cualquier contraión, por ejemplo: bromuro, cloruro, acetato o sulfato de metilo. Preferiblemente, el tensioactivo catiónico cuaternario está presente en un nivel superior o igual al 0,05% al 4% en peso y más preferiblemente del 0,5% al 2% en peso.

25 El pH de la composición se encuentre preferiblemente entre 4,5 y 5,5. El pH deseado se puede lograr incorporando agentes tamponadores en la composición. Ejemplos de agentes tamponadores que pueden incluirse son ácido cítrico / hidrogenofosfato disódico, ácido cítrico / citrato de sodio, ácido acético / acetato de sodio. El agente tamponador puede estar presente convenientemente en una cantidad de aproximadamente 0,5% a 2% en peso de la composición para proporcionar una composición isotónica.

30 La composición comprende preferiblemente ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA está presente preferiblemente como las sales di-, tri- o tetrabásicas de EDTA. Hemos descubierto que estas sales mejoran el efecto antimicrobiano del metal iónico en la alteración de la biopelícula. Por ejemplo, hemos descubierto que el EDTA en concentraciones de 0,25 a 0,5% en peso por volumen era eficaz para lograr que una variedad de 35 microorganismos en estado de biopelícula fueran vulnerables a los agentes antimicrobianos.

40 Las composiciones de la presente invención pueden estar en forma de una solución que se puede usar como un aerosol para su aplicación en materiales de apósito o una baño de una solución en la que se pueden sumergir los materiales para apósitos, o en forma de películas delgadas solubles que pueden ser laminadas en apósitos para heridas o utilizadas junto con un apósito por separado en forma de estuches [kits]. Alternativamente, las composiciones pueden estar en forma de un semisólido blando, como por ejemplo un gel, espuma o crema, que mantiene un ambiente húmedo para la curación de heridas y promueve la curación natural.

45 Una formulación suave semisólida ofrece la ventaja de poder fluir hacia la herida para formar un contacto íntimo con el lecho de la herida y proporcionar efectos antimicrobianos a toda la superficie de la herida. Preferiblemente, la formulación tiene una viscosidad suficientemente alta para que no fluya de una herida a otros tejidos. Preferiblemente, el pH de la formulación se tampona alrededor de 5,5 ya que esto no altera el equilibrio del pH del tejido peri-herida y por lo tanto lo protege. Las composiciones de la invención también pueden estar presentes como 50 un pulverizador de polvo seco.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la presente invención.

Los datos relevantes para los ejemplos se representan en los dibujos adjuntos que muestran:

55 Las figuras 1a, 1b, 1c y 1d muestran escalas de grises que representan la eficacia antimicrobiana de un intervalo de concentraciones de plata frente a un intervalo de concentraciones de tensioactivo y una gama de tensioactivos e ingredientes opcionales;

60 La figura 2 muestra una comparación de la profundidad de penetración (mm) de la acción antimicrobiana entre apósitos de plata de prueba [testados o de ensayo] tanto con el tratamiento como sin el tratamiento de una composición según la invención; y

65 La figura 3 muestra una comparación de la actividad anti-biopelícula (datos MBEC, por sus siglas en inglés de "*minimal biofilm eradication concentration*" o "*concentración inhibitoria mínima de biopelículas*") de soluciones y geles semisólidos.

Ejemplo 1Tensioactivo catiónico cuaternario mejora la eficacia de la plata

5 **Método:** El sistema de ensayo MBEC que utiliza el dispositivo de biopelícula de Calgary proporciona un ensayo para detectar la actividad de antibióticos y biocidas contra biopelículas bacterianas. El sistema involucra un reactor para la formación de 96 biopelículas equivalentes. El sistema de ensayo MBEC es adecuado para la determinación de valores MBEC (concentración mínima de erradicación de biopelículas) y otros valores relacionados.

10 En la publicación "*The MBEC Assay System: Multiple Equivalent Biofilms for Antibiotic and Biocide Susceptibility Testing*" [*El sistema de ensayo MBEC: biopelículas equivalentes múltiples para ensayos de susceptibilidad a antibióticos y biocidas*] de Howard Ceri, Merle Olson, Douglas Morck, Douglas Storey, Ronald Read, Andre Buret y Barbara Olson, 2001 *Methods in Enzymology* Vol 337, [25] p377 y en la publicación "*The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms*" [*El dispositivo de biopelícula de Calgary: nueva tecnología para la determinación rápida de la susceptibilidad a antibióticos de las biopelículas bacterianas*] de Ceri, Olson, Stremick, Read, Morck and Buret *Journal of Clinical Microbiology*, junio de 1999, Vol 37, No. 6, p 1771-1776.

20 Las biopelículas se cultivaron en clavijas cubiertas de las placas de 96 pocillos (Nunc-TSP partes 445497 y 167008, Thermo Fisher Scientific Inc); a continuación, se enjuagaron minuciosamente con agua purificada. En una placa nueva, utilizando técnicas asépticas y soluciones esterilizadas por filtración, se pipetearon partes alícuotas de una solución acuosa de nitrato de plata, varias soluciones acuosas de un tensioactivo catiónico cuaternario y agua purificada para obtener una matriz de muestras para ensayos de 100 µl de diversas concentraciones de plata y tensioactivo. Las cubiertas de las placas con biopelícula se volvieron a colocar y se dejaron en contacto con la solución de ensayo [prueba] durante 30 minutos, 2 o 4 horas. Después de este periodo, se quitaron las tapas y se eliminó cualquier agente residual del ensayo de las clavijas enjuagando en solución salina normal estéril (0,85% p/p de NaCl).

30 A continuación, las biopelículas residuales se eliminaron físicamente de las clavijas mediante el método de sonicación establecido. Las bacterias liberadas y todavía disponibles se cultivaron en su forma planctónica durante 24 horas en una nueva placa en la que los pocillos contenían un medio de crecimiento. A continuación, se estimó la concentración de bacterias supervivientes liberadas de las clavijas midiendo la turbidez en un lector de placas ópticas. Si bien se registraron las densidades ópticas, una simple representación en escala de grises fue adecuada para su interpretación.

35 Las concentraciones de iones de plata ensayados variaron de 1,625 µg/ml a 200 µg/ml, duplicando la concentración entre muestras sucesivas. Los tensioactivos catiónicos ensayados fueron cloruro de benzetonio benzalconio, cloruro de dimetildialquilamonio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio en concentraciones que oscilan entre 31,25 µg / ml y 2000 µg / ml también duplicando la concentración entre muestras sucesivas.

40 **Resultados:** Los resultados se presentan en los gráficos de la figura 1a y en el diagrama de la izquierda en las figuras 1b, 1c y 1d. La escala de grises representa la eficacia antimicrobiana. Cuanto mayor sea la eficacia, más claro será el tono de gris, de modo que el negro no representa la eficacia antimicrobiana y el gris claro representa la eficacia antimicrobiana alta. Las sinergias positivas están representadas por un cambio a una posición más pálida en la escala de grises del control experimental (sin tensioactivo) presentado en la figura 1a. En las figuras, la concentración de plata se muestra en el eje "y" y la concentración de tensioactivo se muestra en el eje "x".

50 Estos resultados muestran los rangos de concentración donde se observó sinergia. Todos los tensioactivos catiónicos ensayados mostraron sinergia con la plata iónica por encima de una concentración crítica específica para cada tensioactivo. Por debajo de esta concentración crítica se observó inhibición del efecto antimicrobiano de los iones de plata.

Ejemplo 2EDTA y tensioactivo catiónico cuaternario que mejora la eficacia de la plata

Método: Tal como el del ejemplo 1 pero con cada solución de ensayo que también contiene 0,25% p/p de sal de ácido disódico etilendiaminotetraacético.

60 **Resultados:** Los resultados se presentan en las figuras 1b, 1c y 1d mediante el diagrama que aparece en el lado derecho. Los diagramas del lado izquierdo son los experimentos correspondientes sin EDTA.

Estos resultados muestran que el EDTA mejora aún más la actividad antimicrobiana sinérgica del tensioactivo catiónico y el ión metálico.

65

Ejemplo 3

Mejora de la eficacia antimicrobiana de ejemplos de apósitos para heridas que contienen plata

La profundidad a la que un efecto antimicrobiano en un gel de agar que contiene *Staphylococcus aureus* se evaluó para diferentes tipos de apósitos para heridas que contienen plata tratados y no tratados.

5

Materiales:

Ensayo con apósitos:

- 10 • AQUACEL Ag (5x5cm), lote 9L019035, apósito absorbente, gelificante, de fieltro fibroso que contiene 1,2% p/p de plata iónica.
- Allevyn Ag No adhesivo, lote 0935, apósito de espuma absorbente que contiene sulfadiazina de plata.
- 15 • Silvercel Hydro-alginate, lote, 37923, un apósito compuesto por una mezcla de alginato y una almohadilla fibrosa de nailon recubierta de plata envuelta en una película perforada de etileno metil acrilato.
- Sorbsan Silver - Plus, lote 012035, una almohadilla absorbente de alginato no tejido impregnada con plata, adherida a una capa de viscosa absorbente secundaria.
- 20 • Todos los anteriores tratados con EDTA disódico y cloruro de bencetonio.

Medios microbiológicos:

25

Diluyente de recuperación máxima (MRD)

Placas de agar triptona y soja (TSA) presecadas

30

0.85% Solución salina

Agar de triptona y soja fundida (TSA)

Alcohol desnaturalizado industrial (IDA)

35

Agua desionizada estéril (SDW)

Confrontación microbiana: *Staphylococcus aureus* NCIMB 9518

40 **Métodos:** Se cortaron asépticamente dos muestras circulares de 3,75 cm de diámetro de cada apósito. Una de cada muestra se colocó en una placa de Petri estéril para su posterior ensayo [análisis]. La muestra restante se trató con una solución de acuerdo con la invención utilizando el siguiente procedimiento:

45 Se pesaron 0,25 gramos de EDTA disódico y cloruro de bencetonio en botellas estériles separadas y se disolvieron en 100 ml de 50:50 (v/v) IDA:SDW y 100% IDA respectivamente.

Se añadieron 50 µg/cm² de EDTA y 50µg/cm² de cloruro de bencetonio al apósito pipeteando cuidadosamente 220 µl de cada solución sobre toda la superficie de cada muestra de apósito.

50 A continuación, las muestras se volvieron a colocar en el embalaje original y se secaron en un horno de vacío a 90 °C y 0,9 atmósferas de vacío durante aproximadamente 2 horas. Se utilizó un colorímetro para preparar una suspensión de *Staphylococcus aureus* aproximadamente 1x 10⁸ UFC/ml en MRD (0,16-0,18 OD₅₄₀) y diluido en serie para obtener aproximadamente 1x 10⁴ UFC/ml. Se inocularon dos volúmenes de 100 ml de TSA fundido (aproximadamente a 45 °C) con 1 ml de la suspensión 1x 10⁴ UFC/ml de *Staphylococcus aureus* y se arremolinó para mezclar.

55 A continuación, se midieron volúmenes de 20 ml de este agar fundido cultivado con bacterias y se vertieron en nueve recipientes de 60 ml (con un diámetro interno de 3,75 cm). Una vez enfriadas y colocadas, estos recipientes se incubaron a 35 °C ± 3 °C durante 4 horas ± 15 minutos para iniciar el crecimiento. Después de 4 horas, cada uno de los apósitos de ensayo [prueba] se hidrató con 2,5 ml de la solución salina al 0,85% en una placa de Petri estéril y se colocó en un recipiente de 60 ml y sobre la superficie del agar cultivado. A un recipiente no se le aplicó apósito para actuar como control positivo.

60 A continuación, los recipientes se incubaron durante otras 24 horas, después de las cuales se retiraron y desecharon los apósitos. A continuación, los recipientes se volvieron a incubar durante un mínimo de 72 horas para permitir que crecieran las colonias ya establecidas. Después del período de incubación final, los recipientes se evaluaron y fotografiaron junto a una regla calibrada.

65

Resultados:

5 En los sitios donde el apósito había impartido un efecto antibacteriano, en el agar cultivado debajo del apósito, el agar parecía transparente. En donde no se había inhibido el crecimiento bacteriano, el agar parecía opaco. La profundidad de la zona transparente de agar desde la superficie en contacto con el apósito se interpretó como una indicación de eficacia antimicrobiana. Los resultados se muestran en la figura 2.

10 El control positivo era opaco hacia la superficie del agar, es decir, no había una zona transparente. Los resultados indican que todos los apósitos ensayados [probados o testados] que contienen plata tenían alguna potencia antimicrobiana, pero esto variaba entre los tipos de apósitos. La adición de este ejemplo de formulación de la invención aumentó la profundidad de la zona transparente en al menos un factor de dos para todos los tipos de apósitos, pero el orden de clasificación siguió siendo el mismo. Esto sugirió que la potencia depende del tipo de apósito, pero la mejora sinérgica es independiente del tipo de apósito.

15 El Aquacel Ag tuvo una mayor profundidad de penetración que los otros apósitos tanto para los ensayos de control como para los tratados. El Aquacel Ag también tuvo la mayor mejora en la penetración antimicrobiana cuando se trató con una solución de acuerdo con la invención, ya que la profundidad media de penetración fue tres veces mayor que la del control.

20

Ejemplo 4Mejora de la eficacia antimicrobiana con diferentes metales antimicrobianos

25 Los ejemplos anteriores que utilizan el método MBEC (concentración mínima de erradicación de biopelículas) han demostrado que la adición de agentes antimicrobianos específicos a la plata mejora su actividad antimicrobiana. El propósito de este ejemplo fue evaluar el efecto de estos agentes sobre la actividad antimicrobiana de otros metales, utilizando el método MBEC.

30 **Método:** Se preparó una solución madre acuosa al 0,2% p/p del tensioactivo catiónico cuaternario cloruro de didecil dimetilamonio (DDAC) a partir de una solución comercial concentrada (solución al 50% p / v, de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

35 Se prepararon soluciones madre individuales de nitrato de plata, trihidrato de nitrato de cobre (II), nitrato de galio (III), hexahidrato de nitrato de níquel (II), heptahidrato de sulfato de zinc, tetrahidrato de cloruro de manganeso (II), heptahidrato de sulfato de hierro (II), hidrato de sulfato de hierro (III), y trihidrato de nitrato de cobre (II) a partir de sólidos de laboratorio disponibles comercialmente.

40 Cada solución se ajustó a aproximadamente un pH de 5,5 mediante la adición de pequeñas cantidades de hidróxido de sodio acuoso diluido y/o ácido clorhídrico diluido. A continuación, las soluciones de iones metálicos se diluyeron volumétricamente al 0,1% p/p (con respecto al metal) con agua purificada. Cualquier precipitado se mantuvo en suspensión homogénea mediante agitación vigorosa.

45 A continuación, se realizó el ensayo MBEC tal y como se describe en el ejemplo 1 solo para la solución de tensioactivo, para cada solución de iones metálicos individual y luego para cada solución de metal en combinación con la solución de tensioactivo.

Resultados:

Metal	pH	MBEC para el ion metálico (ppm) †		Sinergia
		Sin DDAC	Con 0,1% DDAC	
Plata	5,27	12,5	0,097	+ ve
Cobre*	5,47	15,6	1,95	+ ve
Hierro (II) *	5,30	> 1000	≤0,24	+ ve
Hierro (III) *	5,40	> 1000	≤0,24	+ ve
Galio*	5,51	> 1000	≤0,24	+ ve
Manganeso	5,40	> 1000	≤0,24	+ ve
Níquel	5,51	> 1000	≤0,24	+ ve

Metal	pH	MBEC para el ion metálico (ppm) †		Sinergia
		Sin DDAC	Con 0,1% DDAC	
Zinc	5,40	> 1000	≤125	+ ve
DDAC	-	0,2%	-n / A-	-n / A-

† Concentración más baja a la que se observó actividad; ppm es equivalente a µg/g (o µg/ml en soluciones acuosas). Estos valores son aproximados.
* Estos metales formaron precipitados cuando las soluciones al 0,1% se ajustaron a pH 5,5; sin embargo, el precipitado se disolvió cuando se diluyó en la placa de prueba.

Los datos bibliográficos sobre soluciones metálicas (pH sin ajustar) sugieren el siguiente orden en términos de actividad antimicrobiana: Plata> Hierro> Níquel> Cobre> Galio> Magnesio> Bismuto

- 5 El MBEC para DDAC solo se determinó como de aproximadamente 0,2%. Cuando se utilizó DDAC al 0,1% en combinación con las soluciones de iones metálicos enumerados, todas produjeron una reducción significativa en la MBEC del metal, demostrando así un efecto sinérgico que es independiente de la identidad del metal antimicrobiano utilizado.

10 Ejemplo 5

El efecto del pH

15 Cuando se utilizan en concentraciones elevadas, muchos tensioactivos catiónicos tienen actividad antimicrobiana; típicamente esto se ve reforzado por un pH alcalino. De manera similar, muchos investigadores han descubierto que la actividad de algunos compuestos de plata también se ve reforzada por un pH elevado. Para prevenir el dolor y el daño tisular, los productos que se aplican a la piel lesionada deben tener un pH cercano a neutral o un pH ligeramente ácido. Este ejemplo investiga el efecto del pH sobre el efecto sinérgico entre un tensioactivo catiónico cuaternario y un metal antimicrobiano.

20 **Método:** Se prepararon las siguientes soluciones madre acuosas: - cloruro de bencetonio (1,0% p / p), nitrato de plata (0,1% p/p con respecto al metal), acetato de sodio (0,5 M) y ácido acético (0,5 M).

25 En el experimento de control, se mezclaron soluciones de acetato de sodio y ácido acético en varias proporciones y se diluyeron con agua purificada para dar un rango de soluciones tampón de pH con diferentes pH pero con la misma fuerza iónica general (0,1 M con respecto al ión acetato). A cada uno, se le añadió suficiente solución de nitrato de plata para hacer la solución al 0,01% p / p con respecto a la plata. A continuación, cada solución se confrontó mediante el método MBEC tal y como se describe en el ejemplo 1 para determinar si, a este nivel de pH y plata, la solución estaba por encima o por debajo de MBEC. Usando un segundo conjunto de soluciones preparadas de manera similar (tampón acetato 0,1 M, plata al 0,01%) se realizó un segundo experimento MBEC en el que se varió la concentración de la solución tensioactiva.

30 **Resultados:** Ninguna de las soluciones de plata al 0,01% con pH tamponado en el rango de 4,7 a 7,7 fue eficaz contra las biopelículas en el modelo MBEC. Se requirieron concentraciones de tensioactivo de >0,25%, ≤0,10% y 0,025% para erradicar la biopelícula en el modelo MBEC a pH 6,9, 6,2 y 5,5 respectivamente.

Lo anterior sugiere que el efecto antimicrobiano sinérgico de la presente invención se mejora reduciendo el pH (volviéndose más ácido), lo que contradice el saber actual.

40 Ejemplo 6

Mejora de la eficacia antimicrobiana de una composición semisólida (gel) que contiene plata, EDTA y tensioactivo cuaternario

45 Los ejemplos anteriores (1, 2, 4 y 5) ilustran la aplicabilidad a soluciones simples. Este ejemplo busca demostrar que la adición de excipientes inertes que modifican la forma física y las propiedades de la solución base activa no tiene ningún efecto sobre la eficacia observada. En este ejemplo se usa el aumento de la viscosidad mediante la adición del agente gelificante hidroxietilcelulosa (HEC, tipo Aqualon: Natrosol 250HX Pharm) comparándose la actividad de los geles formulados con la solución equivalente usando el ensayo MBEC tal y como se describió anteriormente.

50 **Método:** Se prepararon soluciones madre de nitrato de plata, cloruro de bencetonio, EDTA disódico (pH ~4), EDTA trisódico (pH ~8) y HEC. A continuación, se combinaron de diversas formas para producir una matriz de muestras de uno, dos, y tres componentes (el EDTA se incluyó solo una vez en cualquier combinación) con y sin HEC. Las

concentraciones finales del componente son 0%, 0,0001% o 0,02% para plata (Ag); 0%, 0,1% ó 1% para cloruro de bencetonio (BeCl); 0%, 0,2% ó 1% para EDTA; 0% ó 0,1% para HEC.

5 Las muestras de ensayo se confrontaron contra una biopelícula microbiana usando el método MBEC descrito previamente en el ejemplo 1. Los resultados se registraron como efectivos (sin crecimiento bacteriano) o ineficaces (crecimiento bacteriano indicado por la turbidez). Todas las muestras de ensayo se prepararon por duplicado y cada determinación de MBEC se realizó por triplicado, por lo que se obtuvieron seis resultados de análisis para cada muestra.

10 **Resultados:**

15 En la Figura 3 se muestra un resumen de los resultados de las combinaciones. La adición de un excipiente inerte (HEC) para modificar las propiedades físicas de la sustancia de ensayo no alteró la actividad anti-biopelícula de la mezcla de ensayo. Aún así se observó un comportamiento sinérgico para las combinaciones a pH 4 y pH 8 en el extremo inferior de los intervalos de concentración preferidos. No se observaron efectos inhibidores de la adición del excipiente inerte en el extremo superior de los intervalos de concentración preferidos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición antimicrobiana adecuada para su uso en la piel y en la heridas que comprende una fuente de plata iónica; un tensioactivo catiónico de amonio cuaternario presente en un nivel superior o igual al 0,025% en peso; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) presente como las sales di-, tri- o tetra-básicas de EDTA a un nivel de 0,2% a 1% en peso; en donde la composición tiene un pH de 4 a 6; y la plata iónica está presente en la composición a un nivel del 0,01% al 10% en peso.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la plata iónica se incluye en la composición a un nivel del 0,1% al 5% en peso.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que la plata iónica se incluye en la composición a un nivel del 0,5% al 1,5% en peso.
- 15 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tensioactivo catiónico se selecciona del grupo de las sales en las que el catión es bencetonio, benzalconio, dimetildiaquilonio, alquilpiridinio y alquiltrimetilamonio.
- 20 5. Composición según la reivindicación 4, en la que el tensioactivo catiónico cuaternario está presente en un nivel de 0,05% a 4% en peso.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que el tensioactivo catiónico cuaternario está presente en un nivel de 0,5 a 2% en peso.
- 25 7. Proceso para fabricar un apósito antimicrobiano para heridas que comprende: (i) obtener un apósito absorbente para heridas; y (ii) tratar el apósito con una composición según la reivindicación 1.

Eficacia antimicrobiana

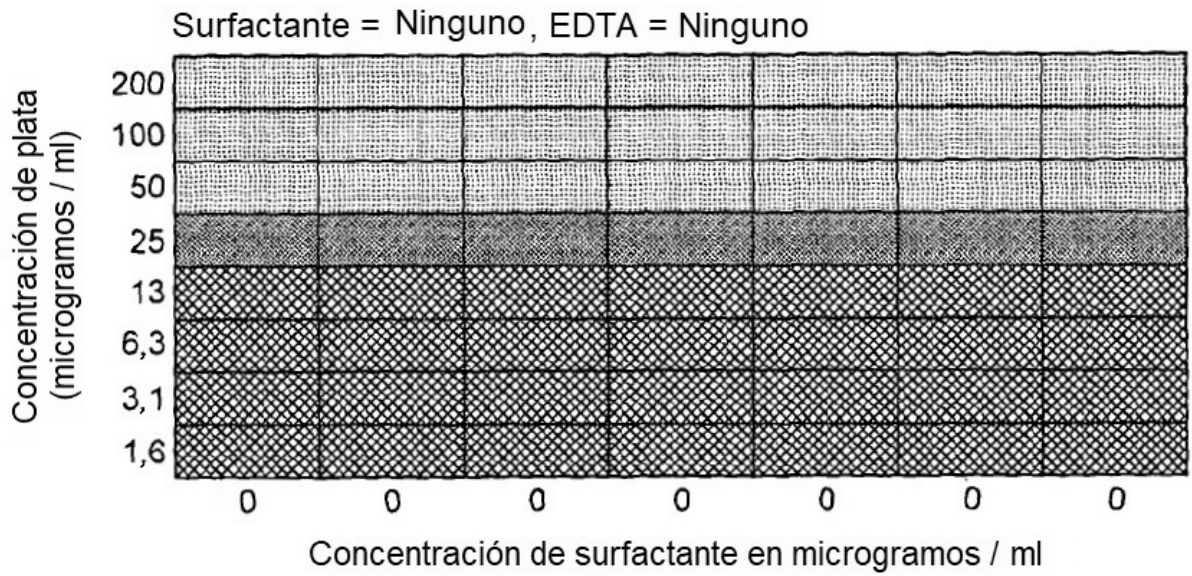
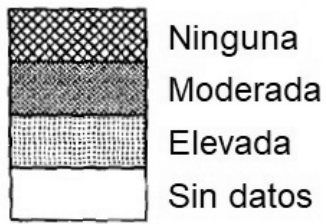


FIG. 1a

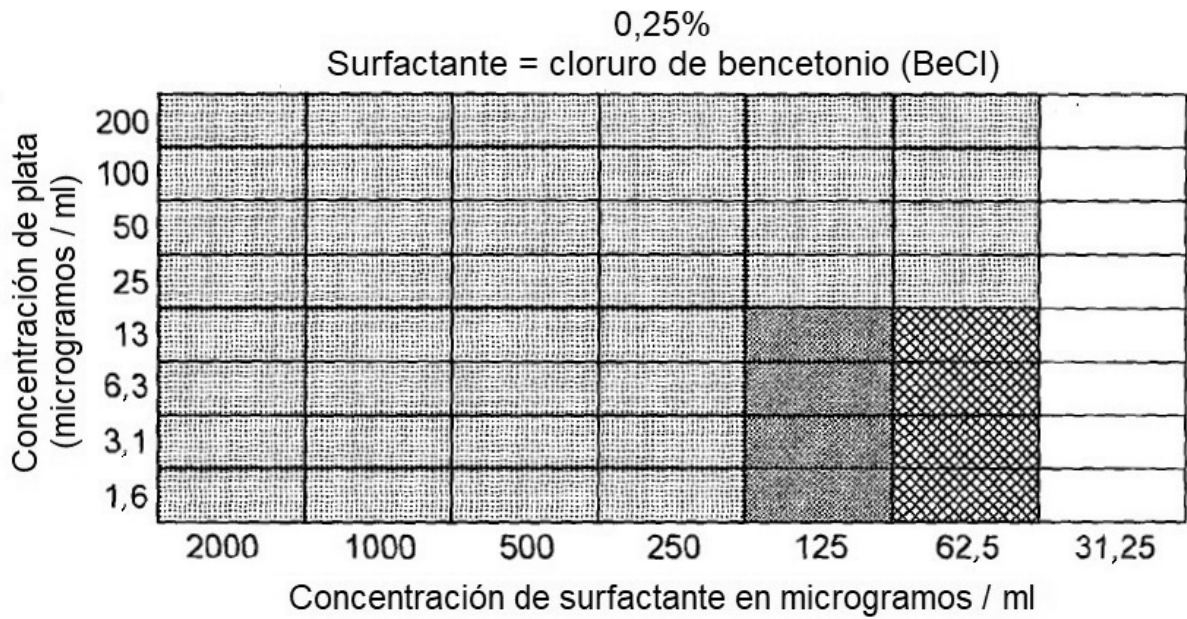
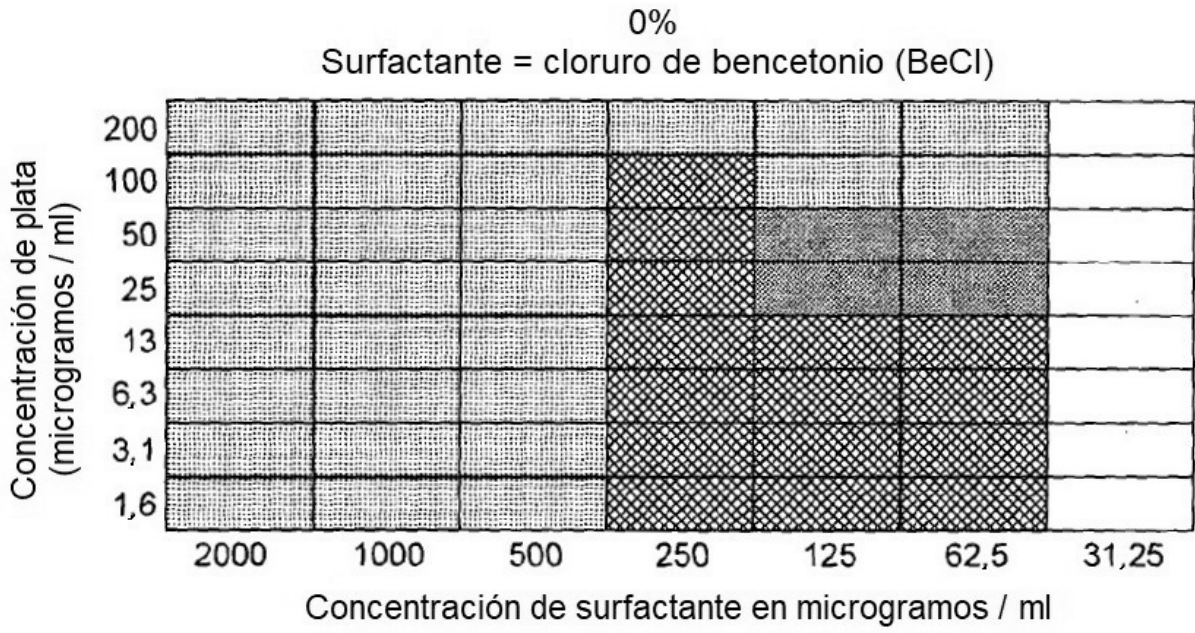


FIG. 1b

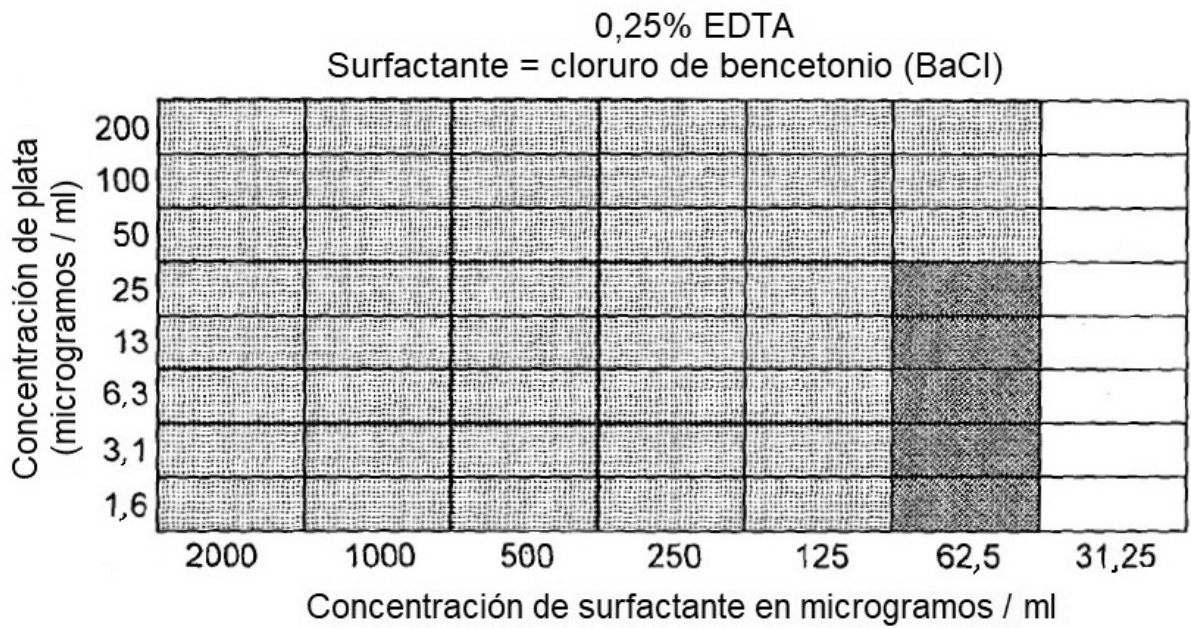
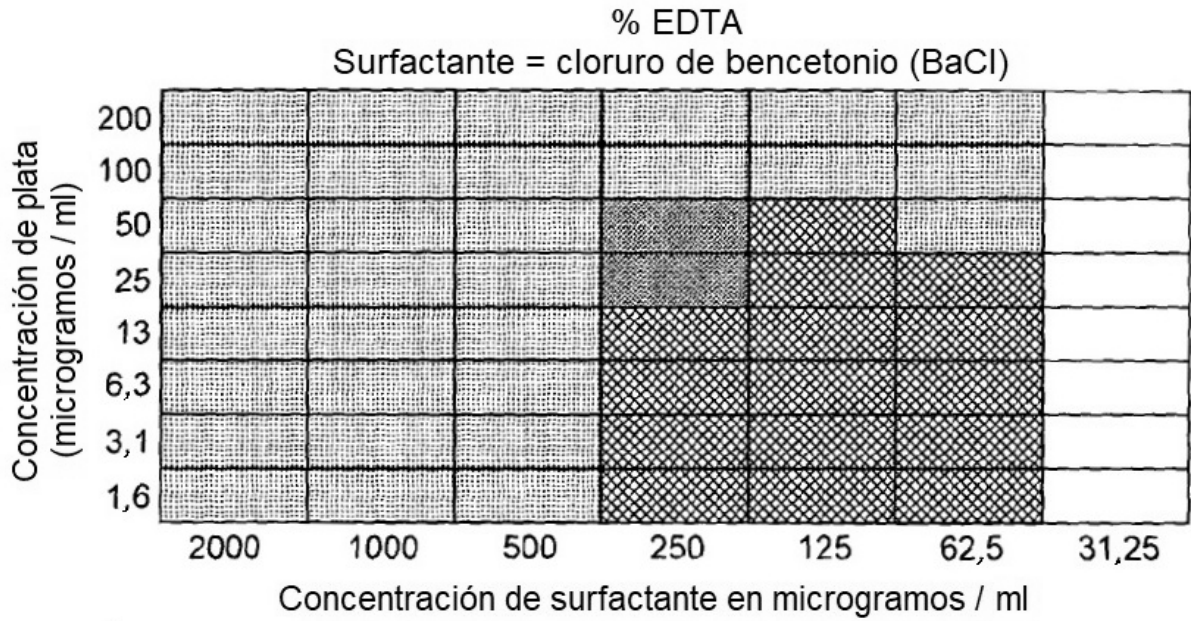


FIG. 1b Cont'd

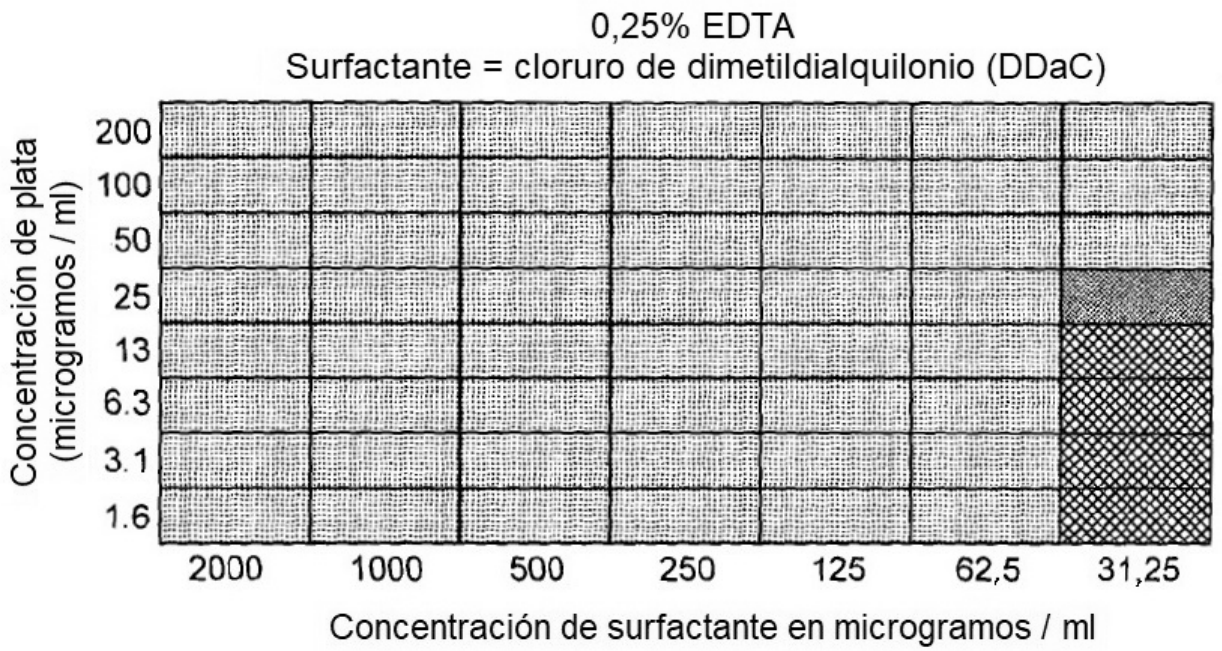
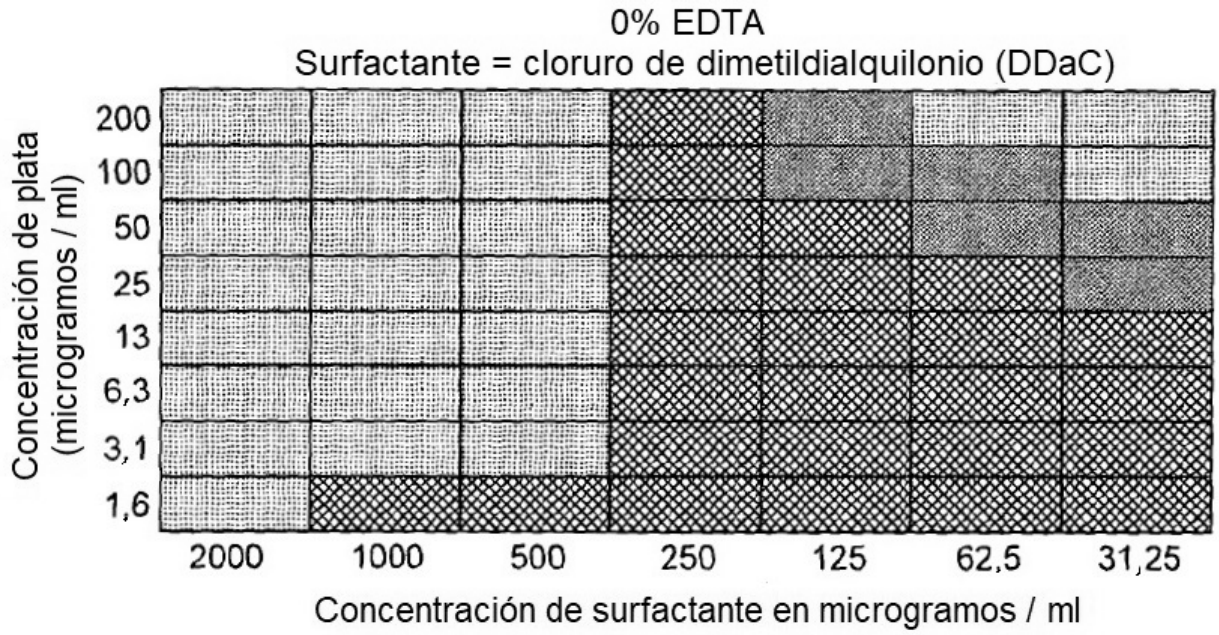


FIG. 1c

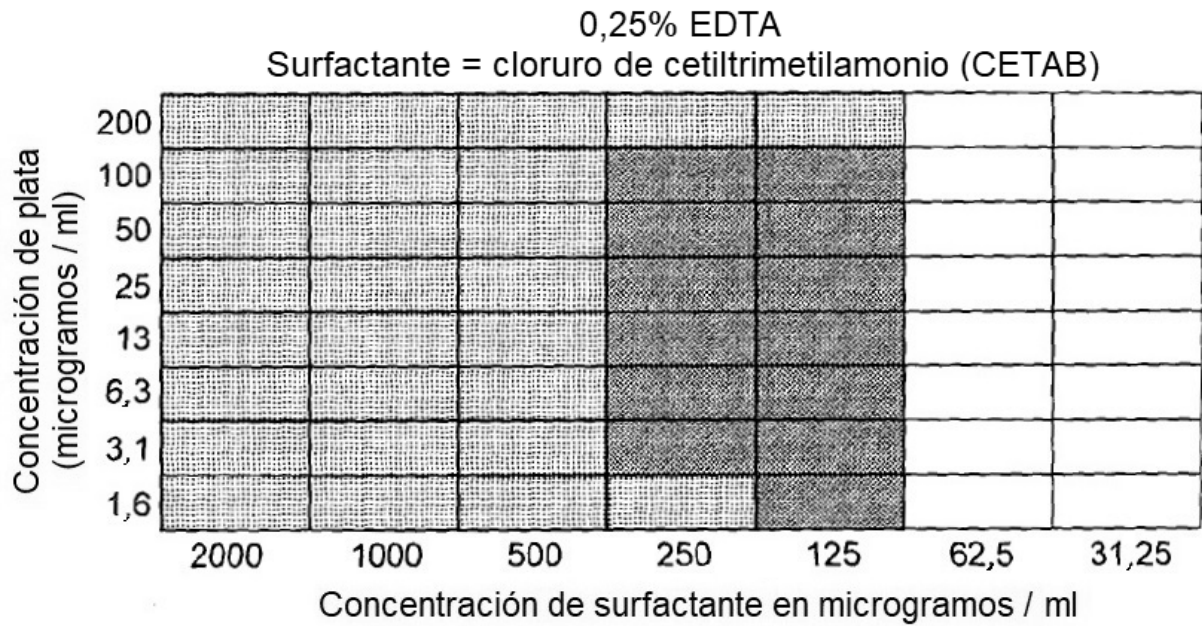
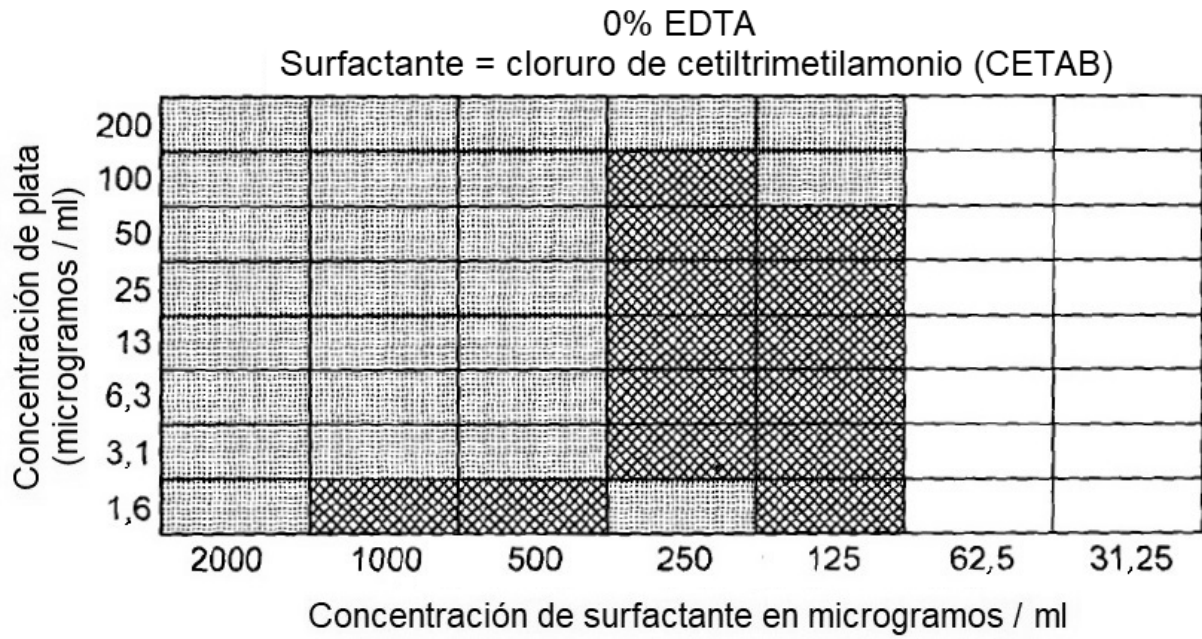


FIG. 1C Cont'd

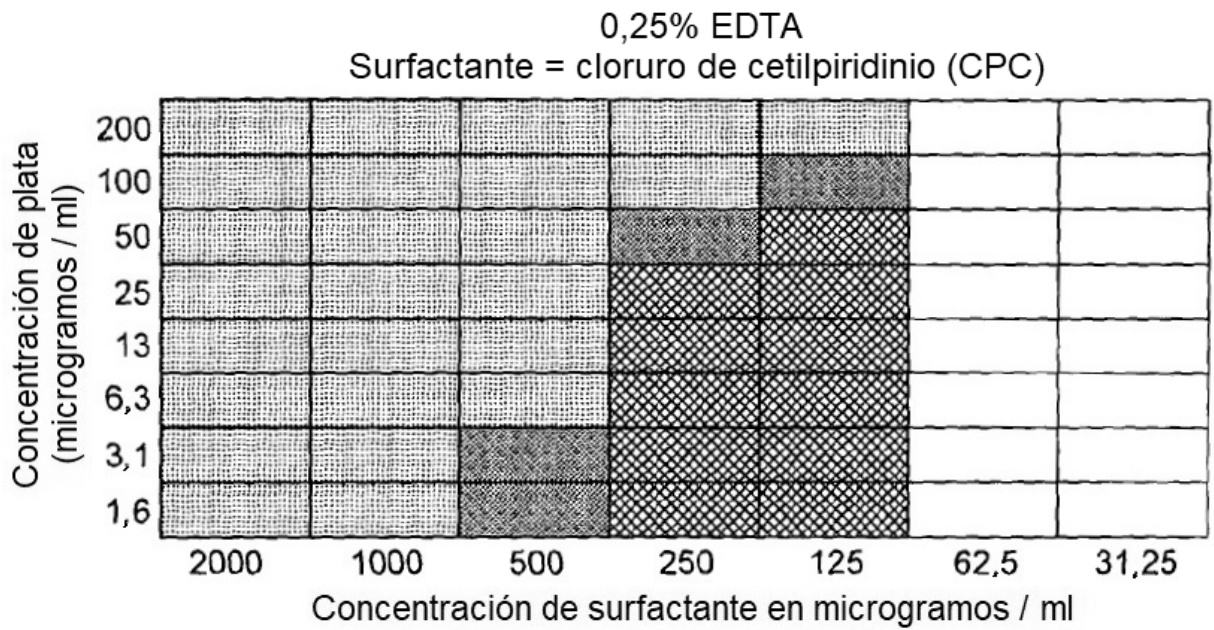
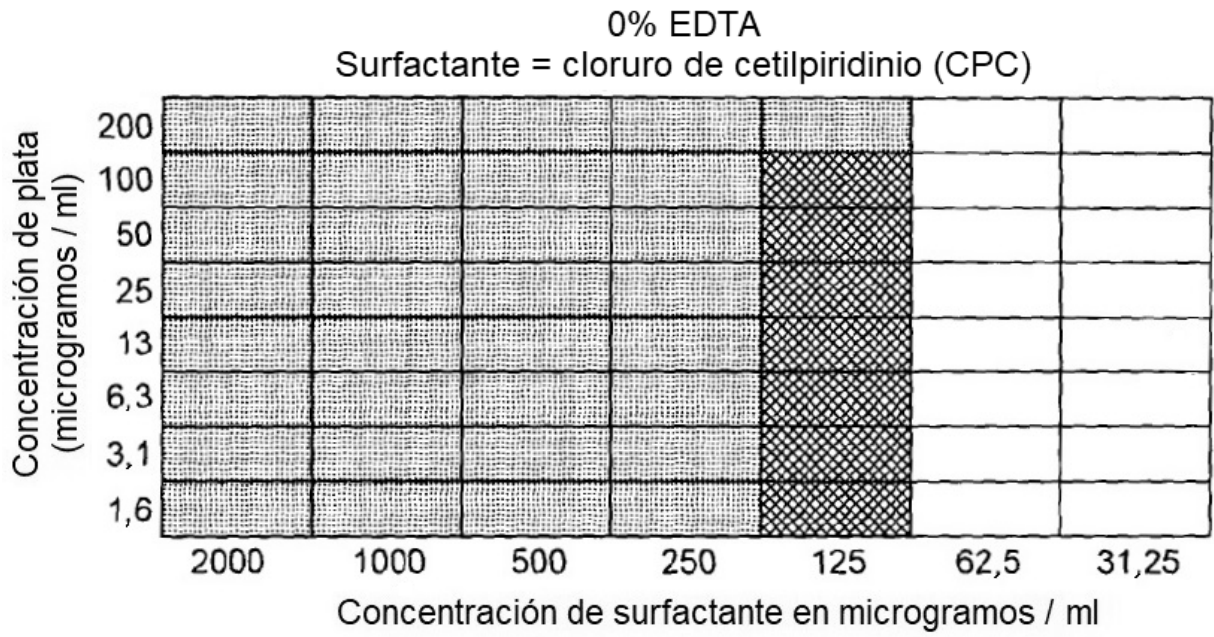


FIG. 1d

Profundidad de penetración o actividad antimicrobiana del apósito de plata tratado con una composición según la invención

Organismo de confrontación: *Staphylococcus aureus* NCIMB 9518

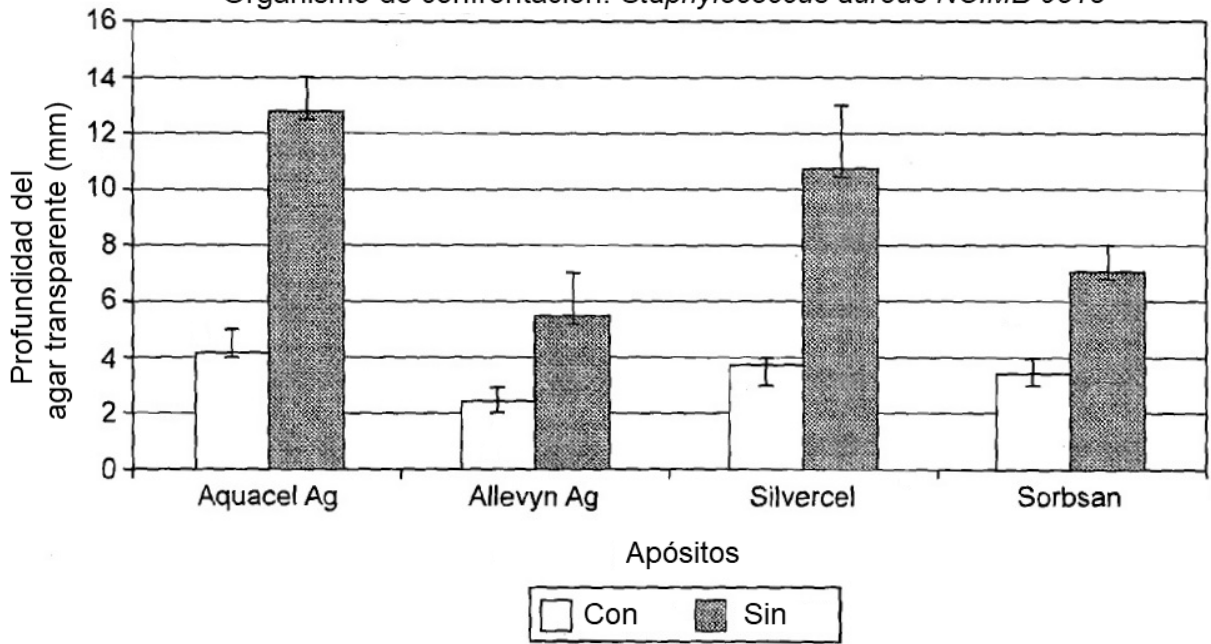


FIG. 2

Soluciones						
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	4	4	4	4	4	4
Growth /6	4	0	0	1	0	1
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	1	1	1	1	1	1
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	4	4	4	4	4	4
Growth /6	4	2	1	1	2	1
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	8	8	8	8	8	8
Growth /6	6	0	0	0	1	2
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	1	1	1	1	1	1
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	8	8	8	8	8	8
Growth /6	6	0	1	0	0	0

Geles						
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	4	4	4	4	4	4
Growth /6	6	0	1	0	0	1
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	1	1	1	1	1	1
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	4	4	4	4	4	4
Growth /6	4	0	0	0	0	0
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	8	8	8	8	8	8
Growth /6	6	0	0	0	0	0
Ag	0,0001	0,02	0,0001	0,02	0,0001	0,02
EDTA	1	1	1	1	1	1
BeCl	0	0	0,1	0,1	1	1
pH	8	8	8	8	8	8
Growth /6	6	0	1	0	0	0

FIG. 3