

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 165**

51 Int. Cl.:

A61K 8/34 (2006.01)

A61K 8/36 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09757183 .0**

96 Fecha de presentación: **20.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2296614**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2011**

54 Título: **Mezclas sinérgicas de conservantes**

30 Prioridad:
03.06.2008 US 58362 P
15.08.2008 EP 08014560

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2012

73 Titular/es:
LONZA, INC.
90 Boroline Road
Allendale, NJ 07401-1613, US y
Lonza Ltd.

72 Inventor/es:
NUNEZ, Rosita;
KIMLER, Joseph;
HALL, Larry Kent;
NESBITT, Crystal y
CARTER, Craig

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 381 165 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

Mezclas sinérgicas de conservantes

5 La presente invención describe formulaciones conservantes sinérgicas que comprenden compuestos bactericidas y fungicidas, un método para reducir la carga fúngica y bactericida de una preparación así como también el uso de las formulaciones conservantes sinérgicas de acuerdo con la invención para reducir la carga fúngica y bactericida de las preparaciones.

Una amplia variedad de productos, formulaciones y preparaciones industriales, de hogar y personales necesitan ser protegidos de la contaminación con bacterias y hongos. Esto se logra usualmente al agregar liberadores de formaldehído y/o parabenos debido a que las buenas propiedades bactericidas y fungicidas de estos compuestos.

10 Sin embargo, estos compuestos del estado de la técnica sufren de algunas serias desventajas, a saber, que su capacidad de conservación es tan alta que su efecto continúa aún después de, por ejemplo en el caso de una loción, se aplica sobre la piel, se absorbe, se distribuye a través de la sangre y se deposita en los órganos principales del cuerpo. Debido a que el formaldehído y los parabenos imparten función de enzima, existe la posibilidad de interferencia con la célula humana normal y función del órgano.

15 Por lo tanto, el problema técnico que se va resolver por la presente invención es proporcionar formulaciones conservantes que evitan las desventajas de aquellos, de acuerdo con el estado de la técnica. Este problema se resuelve al reducir la concentración necesaria de la formulación mientras aún mantiene el control de microbios a través de la cooperación sinérgica sorprendente e inesperada de por lo menos dos compuestos.

20 Por lo tanto es un objeto de la presente invención proporcionar una formulación de conservante que comprende la combinación de por lo menos dos compuestos que tienen propiedades bactericidas y/o fungicidas, en donde la combinación respectiva se selecciona del grupo que consiste de metilisotiazolinona/piroctona olamina; caprililglicol/ácido deshidroacético; y alcohol laurílico/ácido sórbico.

25 El compuesto bactericida está preferiblemente presente en una concentración de 1% a 5%, cuando el compuesto bactericida es una metilisotiazolinona, y 25% a 75% cuando este es caprililglicol, o alcohol laurílico. Aún más preferido, el compuesto bactericida está presente en una concentración de 1.5% a 3% cuando este es una metilisotiazolinona, y 30% a 70% cuando es caprililglicol, alcohol laurílico.

El compuesto fungicida está preferiblemente presente en una concentración de 25% a 99%. Aún más preferiblemente, el compuesto fungicida de acuerdo con la invención está presente en una concentración de 30% a 95%.

30 Todos los porcentajes son porcentajes en peso a menos que se indique otra cosa.

El isómero preferido de metilisotiazolinona es 2-metilisotiazolin-3-ona. Sin embargo, otros isómeros también están dentro del alcance de la invención.

35 Se puede preferir que las formulaciones conservantes de acuerdo con la invención se combinen con solventes apropiados. Preferiblemente, dichos solventes se seleccionan de la clase de glicoles. Más preferiblemente, dichos solventes se seleccionan del grupo que consiste de propilenglicol, butilenglicol y pentilenglicol.

40 El método para reducir la carga fúngica y bactericida de una preparación de acuerdo con la presente invención preferiblemente comprende agregar una formulación de conservante que comprende por lo menos dos compuestos que tienen propiedades bactericidas y/o fungicidas a la preparación que se va a conservar. Los compuestos bactericidas y fungicidas preferidos, sus concentraciones y combinaciones preferidas son como se indicó anteriormente.

De manera general, las preparaciones de acuerdo con la invención se pueden agregar a una amplia variedad de productos, formulaciones y preparaciones industriales, del hogar y personales.

45 Las preparaciones preferidas de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste de preparaciones cosméticas tales como lociones, cremas, bálsamos y ungüentos, limpiadores, detergentes, productos de higiene femenina, pañales, preparaciones para cuidado de mascotas, preparaciones para el cabello tales como champús, acondicionadores, geles, fijadores y rociadores.

Otro objeto de la presente invención es el uso de las formulaciones conservantes sinérgicas de acuerdo con la invención para reducir la carga fúngica y bactericida de las preparaciones. Todos los detalles con respecto a los

compuestos bactericidas y fungicidas preferidos, sus concentraciones y combinaciones preferidas así como también las preparaciones preferidas en donde se pueden aplicar formulaciones conservantes sinérgicas son las mismas que aquellas dadas anteriormente.

La invención ahora se describirá por vía de los siguientes, ejemplos no limitantes.

5 **Ejemplo 1**

La prueba de exposición de conservante se hace para evaluar el desempeño de las mezclas en preparaciones cosméticas finales. La prueba se realiza en una base de champú y una loción como se describe aquí. Se prepara como sigue un cultivo bacteriano mezclado estandarizado. Se incuban tres tubos de Agar inclinados de Soja Triptica individuales de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) a aproximadamente 35°C durante ~24 horas. Cada tubo inclinado luego se lava con 5 mL de Agua de Dilución Regulada con Fosfato estéril (PBDW). Se transfiere 5 mL a 5 mL adicionales de BPDW para un total de 10 mL de suspensión bacteriana individual. La absorbancia de cada suspensión individual se mide espectrofotométricamente en 530nm después de calibración del instrumento con un blanco de PBDW. Cada suspensión individual se estandariza a ~10⁹ CFU/mL. Se transfieren asépticamente cinco mL de cada suspensión individual a una copa de espécimen estéril para crear la "Bacteria Mezclada". Luego se inocula 40 g de cada muestra de champú y loción con 0.2 mL de la solución bacteriana estandarizada y cada muestra se mezcla bien.

Se incuban dos tubos de agar Sabouraud inclinados individuales de *Candida albicans* (ATCC 10231), y tres placas de Agar Sabouraud de *Aspergillus niger* (ATCC 16404) a aproximadamente 30° C durante ~24 horas y 5 días, respectivamente. El tubo inclinado con *Candida* luego se lava con 5 mL de Agua de Dilución Regulada con Fosfato estéril (PBDW). Se transfiere 5 mL a 5 mL adicionales de BPDW para una suspensión *Candida* individual total de 10 mL. Para el *Aspergillus*, se sumerge un hisopo de algodón estéril en un tubo de 10 mL de PBDW estéril y luego se sumerge en un tubo estéril de Tween 80. El hisopo se mueve hacia atrás y hacia adelante o a través de cada una de las placas *Aspergillus*, transfiriendo las esporas al tubo PBDW de 10 mL entre cada proceso de remoción de espora. Se transfiere un mL de cada una de las suspensiones a un tubo PBDW de 9 mL separado. Cada una de estas suspensiones 1:9 se mide en un hemocitómetro y se estandarizan las suspensiones originales a ~10⁷ células/mL. Se transfieren asépticamente siete mL de cada suspensión individual a una copa de espécimen estéril para crear los "Hongos Mezclados". Luego 40g de cada champú y muestra de loción se inocula con 0.4 mL de la solución fúngica estandarizada y cada muestra se mezcla bien.

En los días 0, 7, 14 y 28, la muestra se hace como sigue. Se transfiere asépticamente un gramo de cada muestra a un tubo de caldo de cultivo neutralizante D/E de 9 mL separado para formar la dilución 10-1. Se preparan diluciones seriales a través de una dilución 10-6 en BPDW. Las diluciones seriales para los cultivos bacterianos se ponen en placas al poner la placa con Agar de Soja Triptica y se incuba a ~35°C durante 48 horas. Se colocan en placas diluciones seriales para las muestras fúngicas al poner la placa con Agar Sabouraud y se incuba a ~30°C durante 72 horas. Las placas se enumeran después del periodo de incubación. Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2. Las mezclas son efectivas en reducir significativamente los conteos bacterianos y fúngicos durante un periodo de 28 días.

Tabla 1

Datos de Exposición a Conservante Mezclados con Conteos Bacterianos (CFU/gramo)				
Muestras de prueba	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
Loción no conservada	1.0 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁵	1.4 x 10 ⁴	1.4 x 10 ³
Loción + 95 ppm metilisotiazolinona + 0.5% piroctona olamina	1.7 x 10 ⁷	<10	<10	<10
Loción + 1% Capriliiglicol + 0.5% Ácido deshidroacético	1.1 x 10 ⁷	<10	<10	<10
Muestras de prueba	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
Champú no conservado	9.2 x 10 ⁶	2.5 x 10 ⁷	2.0 x 10 ⁷	2.2 x 10 ⁶
Champú + 0.5% alcohol laurílico + 0.5% ácido sórbico	1.2 x 10 ⁷	<10	<10	<10

Inóculo:

40 Se mezclan Bacterias – aproximadamente en cantidades iguales de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. 9 x 10⁵ a 5.5 x 10⁶.

Tabla 2

Datos de Exposición a Conservante Mezclados con Conteos Fúngicos (CFU/gramo)				
Muestras de Prueba	Día 0	Día 7	Día 14	Día 28
Loción no conservada	5.0×10^5	2.1×10^5	3.2×10^5	1.1×10^4
Loción + 95 ppm metilisotiazolinona + 0.5% piroctona olamina	1.0×10^5	<10	<10	<10
Loción + 1% Caprililglicol + 0.5% Ácido deshidroacético	2.0×10^5	<10	<10	<10
Champú no Conservado	9.8×10^5	2.1×10^5	2.6×10^4	3.4×10^3
Champú + 0.5% alcohol laurílico + 0.5% ácido sórbico	3.0×10^5	<10	<10	<10
Inóculo: Hongo Mezclado – aproximadamente cantidad igual de <i>C. albicans</i> y <i>A. niger</i> . 6.9×10^4 a 1.2×10^5				

Ejemplo 2

5 Se determinan las concentraciones inhibitoras mínimas (MIC) para componentes individuales y formulaciones binarias como sigue. Se preparan suspensiones bacterianas individuales de *S. aureus* (gram positivas), *E. coli* y *P. aeruginosa* (ambas gram negativas) y suspensiones fúngicas individuales de *C. albicans* y *A. niger* como se describe en el Ejemplo 1. Cada suspensión individual se estandariza con PBDW para producir $\sim 10^8$ CFU/ml o $\sim 10^7$ células/ml para las bacterias individuales y hongos, respectivamente.

10 Los componentes individuales y formulaciones binarias se diluyen en agua DI o propilenglicol (según sea apropiado para solubilidad) para producir 10,000 ppm de la solución activa de partida total. De la solución 10,000 ppm, se hace una dilución 1:9 en Caldo de Cultivo de Nutrientes estéril para producir una solución activa 1,000 ppm. Se transfiere cinco mL de la dilución 1,000 ppm a cinco mL de Caldo de Cultivo de Nutrientes estéril (NB) para producir una solución activa de 500 ppm. Este esquema de dilución se repite hasta 3.90 ppm activo. Las mismas diluciones se hacen en Caldo de Cultivo de Dextrosa Sabouraud estéril (SDB) para la prueba fúngica MIC. La serie de nueve
15 soluciones activas (3.9 ppm - 1000 ppm) se prepara para cada uno de los cinco microorganismos que se van a probar.

De la suspensión *E. coli*, se agrega 0.1 mL a cada una de las nueve, soluciones activas de 5-mL en NB. Cada tubo se mezcla vigorosamente. Esto se repite para cada una de las suspensiones bacterianas. De forma similar, se agrega 0.1 mL de la suspensión *C. albicans* a cada una de las nueve, soluciones activas de 5-mL en SDB. Esto se repite con
20 *A. niger* en un conjunto separado de diluciones. Cada tubo se mezcla vigorosamente. Se preparan los controles para cada organismo al inocular 5 mL de NB o SDB, según sea apropiado. Todos los tres conjuntos de tubos bacterianos se incuban a 35°C durante 48 horas y los dos conjuntos de tubos fúngicos se incuban a 30°C durante 72 y 120 horas. Al final del periodo de incubación, los tubos se mezclan y se inspeccionan visualmente para turbidez comparado con el control. La concentración más baja con una carencia de turbidez se registra como la
25 Concentración Inhibidora Mínima (MIC). Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4.

El valor de sinergismo es $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$. Q_A es la concentración del componente A en la mezcla, Q_a es la concentración del componente A aplicado individualmente, Q_B es la concentración del componente B en la mezcla, Q_b es la concentración del componente B aplicado individualmente. Cuando el valor de sinergismo es menor de uno, la mezcla es sinérgica. Los valores para $(Q_A/Q_a + Q_B/Q_b)$ de 1 y más de 1 representan un efecto aditivo y un efecto
30 antagonístico, respectivamente.

Tabla 3

Valores MIC (en ppm) para formulaciones conservantes versus bacterias			
Tipo de organismo	Gram (+)	Gram (-)	Gram (-)
Nombre del organismo	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Número de cepa ATCC	6538	9027	8739
Mezcla de Caprililglicol y Ácido Deshidroacético	500	500	500
Q_A	250	250	250
Q_a	>1000	>1000	1000
Q_B	250	250	250
Q_b	500	500	500
$Q_A/Q_a + Q_B/Q_b$	< 0.75	< 0.75	0.75

Tabla 4

Valores MIC (en ppm) para formulaciones conservantes versus formulaciones con bacterias, levadura y hongos con piroctona olamina					
Tipo de Organismo	Gram (+)	Gram (-)	Gram (-)	Moho	Levadura
Nombre del organismo	S. aureus	P. aeruginosa	E. coli	A. niger	C. albicans
Número de cepa ATCC	6538	9027	8739	16404	10231
Mezcla de Metilisotiazolinona y Piroctona olamina	31.25	31.25	31.25	7.81	7.81
Q _A	15.63	15.63	15.63	3.91	3.91
Q _a	250	62.5	62.5	500	250
Q _B	15.63	15.63	15.63	3.91	3.91
Q _b	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
Q _A /Q _a + Q _B /Q _b	0.31	0.5	0.5	0.07	0.08

Tabla 5

Valores MIC (en ppm) para mezclas conservantes versus bacterias y hongos				
Tipo de Organismo	Gram (+)	Gram (-)	Hongo	Levadura
Nombre del organismo	S. aureus	P. aeruginosa	A. niger	C. albicans
Número de cepa ATCC	6538	9027	16404	10231
Mezcla de Alcohol laurílico y Ácido sórbico	250	500	500	500
Q _A	125	250	250	250
Q _a	>1000	>1000	>1000	>1000
Q _B	125	250	250	250
Q _b	1000	500	1000	>1000
Q _A /Q _a + Q _B /Q _b	<0.239	<0.727	<0.477	<0.454

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de conservante comprende la combinación de por lo menos dos compuestos que tienen propiedades bactericidas y/o fungicidas, en donde la combinación respectiva se selecciona del grupo que consiste de metilisotiazolinona/ piroctona olamina; caprililglicol/ácido deshidroacético y alcohol laurílico/ácido sórbico.
- 5 2. La formulación de conservante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto bactericida está presente en una concentración de 1% a 5%, cuando el compuesto bactericida es una metilisotiazolinona, y 25% a 75% cuando es caprililglicol o alcohol laurílico.
- 10 3. La formulación de conservante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el compuesto bactericida está presente en una concentración de 1.5% a 3% cuando este es una metilisotiazolinona, y 30% a 70% cuando es caprililglicol o alcohol laurílico.
4. La formulación de conservante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto fungicida está presente en una concentración de 25% a 99%.
5. La formulación de conservante de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el compuesto fungicida está presente en una concentración de 30% a 95%.
- 15 6. Un método para reducir la carga fúngica y bactericida de una preparación que comprende agregar la formulación de conservante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 a la preparación.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la preparación se selecciona del grupo que consiste de productos, formulaciones y preparaciones industriales, del hogar y personales.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la preparación se selecciona del grupo que consiste de preparaciones cosméticas tales como lociones, cremas, bálsamos y ungüentos, limpiadores, detergentes, preparaciones de higiene femenina, pañales, preparaciones para cuidado de mascotas, preparaciones para el cabello tales como champús, acondicionadores, geles, fijadores y rociadores.
9. Uso de una formulación de conservante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para reducir la carga fúngica y bactericida de las preparaciones.