

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 148**

51 Int. Cl.:

A61K 41/00 (2006.01)

A61L 2/10 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2005 E 05731056 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1737492**

54 Título: **Preparación para combatir fotodinámicamente microorganismos y uso de la preparación**

30 Prioridad:

16.04.2004 DE 102004019247
27.05.2004 WO PCT/EP2004/005719

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2013

73 Titular/es:

BRENT MEDICAL GMBH & CO. KG (100.0%)
Weissenhorner Str. 2
89250 Senden , DE

72 Inventor/es:

VIZETHUM, FREIMUT y
SCHÜTZE, REINHOLD

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 401 148 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

Preparación para combatir fotodinámicamente microorganismos y uso de la preparación

La invención se refiere al uso de una preparación para combatir fotodinámicamente microorganismos de acuerdo con las características indicadas en el preámbulo de la reivindicación 1.

5 Por el documento WO 94/28120 A se conoce una preparación de este tipo para combatir fotodinámicamente microorganismos, que presenta fotosensibilizadores con cuya irradiación se forma oxígeno singlete mediante luz. Mediante el colorante se pueden marcar los microorganismos a combatir. La preparación contiene además un principio activo para la intensificación o el debilitamiento del efecto oxidativo del oxígeno, tal como, por ejemplo, glutatión, manitol o enzimas.

10 Además, por el documento WO 96/36704 A se conocen preparaciones que contienen, además del fotosensibilizador, un principio activo para la intensificación o el debilitamiento del efecto oxidativo del oxígeno, tal como glutatión o vitamina E. También por los documentos WO 96/36704 A y WO 02/096471 A se conocen preparaciones con un fotosensibilizador que contienen, para la intensificación o el debilitamiento del efecto oxidativo del oxígeno, por ejemplo, glutatión o ácido ascórbico. Además, en el documento WO 03/066109 A están descritos procedimientos y preparaciones para la esterilización de la cavidad oral, estando previstos un fotosensibilizador y, opcionalmente, antioxidantes. Además, por el documento WO 01/87416 A1 se conocen una disposición y un procedimiento para la reducción o destrucción de microorganismos, tales como bacterias, mediante la utilización de una sustancia fotoactivable, de acuerdo con la terapia fotodinámica (PDT).

20 Con ayuda de la sustancia fotoactivable, particularmente de un colorante, se sensibilizan y/o tiñen los microorganismos y se destruyen después de la irradiación con luz con una longitud de onda y densidad energética adecuadas. El principio de acción de la POT, tras la acción y/o tinción selectiva de los microorganismos, se basa en el efecto físico de la transmisión de energía a la sustancia fotoactivable, que se denomina también fotosensibilizante o fotosensibilizador. De ahí se puede poner a disposición la energía para las reacciones en la membrana celular. La energía generada mediante un aparato de irradiación, particularmente un aparato láser, por tanto, se concentra sobre los microorganismos y el estado de equilibrio de reacciones que se desarrollan incluso en el estado no expuesto en el medio "normal" se desplaza y como consecuencia se destruyen los microorganismos.

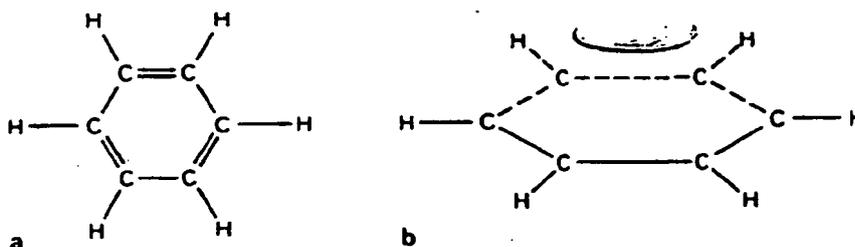
25 Además, por el documento EP 0 637 976 B1 se conoce el uso de una sustancia o compuesto fotosensibilizante o de un fotosensibilizante o fotosensibilizador (PS) durante la producción de un medicamento para el uso durante la desinfección o esterilización de tejidos de la cavidad oral o una herida o lesión en la cavidad oral mediante destrucción de microbios asociados a una enfermedad en una bolsa periodontal, en la región entre el diente y la encía. En este caso, se realiza una puesta en contacto de los tejidos, de la herida o de la lesión con el fotosensibilizante, absorbiendo los microbios asociados a una enfermedad el fotosensibilizante. Se lleva a cabo una irradiación de los tejidos, de la herida o de la lesión con luz láser con una longitud de onda que se absorbe por el fotosensibilizante. La reducción de gérmenes de este tratamiento combinado de colorante y láser se describe para diferentes gérmenes y fotosensibilizantes en forma de soluciones con, entre otras cosas, azul de metileno y azul de toluidina en diferentes concentraciones bastante escasas y, de hecho, del 0,01 al 0,00125% (peso por volumen), indicándose además la influencia de la densidad energética aplicada. Como fuentes de luz se usan láseres de HeNe con una longitud de onda de 634 nm y una potencia de 7,3 mW así como láseres de GaAs con una longitud de onda de 660 nm y una potencia de 11 mW.

40 KOMERIK N y WILSON M: "Factors influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization" JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, Vol. 92, 2002, páginas 618-623 describen la influencia de saliva y el valor de pH de la solución en la que se suspendieron las bacterias sobre la eficacia de la fotosensibilización provocada por azul O de toluidina.

45 La terapia fotodinámica es un procedimiento fotoquímico, que hasta ahora se ha aplicado, sobre todo, en la terapia contra el cáncer. Por la expresión "terapia fotodinámica" se entiende generalmente la inactivación inducida por luz de células, microorganismos o moléculas.

50 Una modificación de este principio se aplica actualmente al combatir microorganismos, la "terapia fotodinámica antimicrobiana" (APT). A este respecto, el objetivo no es el exterminio de células (tumores) propias del cuerpo, sino combatir dirigidamente infecciones locales, combatir microorganismos. El principio de acción de la APT se basa en la tinción selectiva de los microorganismos en la biopelícula mediante un denominado fotosensibilizante y la destrucción de los gérmenes mediante exposición con un láser adecuado, ajustado al fotosensibilizante.

Como fotosensibilizante se pueden usar sustancias, por ejemplo, colorantes de tiazina, que están en disposición de absorber luz con una longitud de onda adecuada y pasar, por ello, al estado excitado denominado de triplete.



Anillos de carbono aromáticos como constituyentes básicos de moléculas cromóforas

5 Los fotosensibilizantes que se pueden aplicar sistémicamente se aplican, sobre todo, en la terapia contra el cáncer. Esta se dirige contra células propias del cuerpo, se dan por vía sistémica de acuerdo con determinadas bases farmacológicas, para acumular las mismas en el tumor y activarlas a continuación mediante irradiación con luz. Esta aplicación se diferencia en principio de aquella para combatir infecciones superficiales.

Para que se pueda utilizar una sustancia como fotosensibilizante eficaz para esta aplicación clínica, se han de cumplir una serie de condiciones. La sustancia activa debería:

1. no ser tóxica
2. poseer propiedades de penetración adecuadas y una elevada afinidad bacteriana
3. presentar propiedades espectrales adecuadas
4. poderse aplicar de forma sencilla y segura
5. dar lugar a una humectación completa de la zona de terapia
6. poseer viscosidad adecuada, en la medida de lo posible, propiedades tixotrópicas
7. poderse aplicar también sobre heridas abiertas
8. posibilitar, en la medida de lo posible, una aplicación indolora
9. conseguir un elevado rendimiento cuántico de triplete (elevada producción de oxígeno singlete)
10. ser estable en el tiempo
11. estar admitida según la ley de productos farmacológicos o medicinales

20 Los fotosensibilizantes pueden absorber luz (energía) en su estructura y poner la misma de nuevo a disposición como energía química para otras reacciones. A partir de las moléculas de oxígeno existentes en el entorno de la molécula de fotosensibilizante excitada se forma entonces una forma excitada especial y muy reactiva, el denominado oxígeno singlete.

A este respecto, se desarrollan en principio y de forma simplificada las siguientes reacciones:

	Producto de partida	→Producto de reacción	Vida útil (s)
Ecuación 1:	$^1\text{Sensibilizante} + \text{Luz } (h\nu)$	$\rightarrow ^3\text{Sensibilizante}^{\text{excitado}}$	10^{-9}
Ecuación 2:	$^3\text{Sensibilizante}^{\text{excitado}}$	$\rightarrow ^3\text{Sensibilizante}^{\text{metaestable}}$	$>10^{-8}$
Ecuación 3:	$^3\text{Sensibilizante}^{\text{metaestable}} + ^3\text{O}_2$	$\rightarrow ^1\text{Sensibilizante} + ^1\text{O}_2$	$10^{-6}-10^{-3}$

25 Bajo la influencia de luz adecuada y oxígeno, las sustancias fotosensibilizadoras reaccionan según las vías de reacción indicadas. Los protones irradiados en la terapia fotodinámica antimicrobiana excitan el fotosensibilizador ($^1\text{Sens}$) acoplado a los microorganismos debido a su elevada capacidad de absorción (ecuación 1). En el intervalo de nanosegundos, la molécula de sensibilizador excitada de acuerdo con la ecuación (2) pasa a un estado de triplete metaestable con una mayor vida útil. La permanencia en el estado de triplete (en el intervalo de microsegundos)

30 dura bastante en comparación con otros estados de excitación (en el intervalo de pico- y nanosegundos) y, por tanto, ofrece condiciones ideales como punto de partida para reacciones fotoquímicas, tales como, por ejemplo, transmitir la energía de excitación a una molécula de oxígeno. El oxígeno excitado adopta el estado de singlete energéticamente superior con una vida útil relativamente más larga (ecuación 3).

35 El principio básico del efecto fotodinámico antimicrobiano, por tanto, se basa en la formación local de oxígeno singlete y, después, de radicales reactivos. Este oxígeno singlete activado desencadena oxidaciones de moléculas, sobre todo, en la pared celular de los microorganismos y, por tanto, una citólisis. Después de la desconexión del suministro de energía, se detiene muy rápidamente el proceso debido a la vida útil muy corta de las moléculas activadas –en el intervalo de fracciones de segundo–. Ahora, el fotosensibilizante con las dosis de energía aplicadas no se consume cuando las mismas se encuentran en un intervalo de 3 J/cm² a 6 J/cm², ya que en este intervalo no se puede comprobar el denominado fotoblanqueo -la destrucción de la molécula de fotosensibilizante mediante luz-,

40

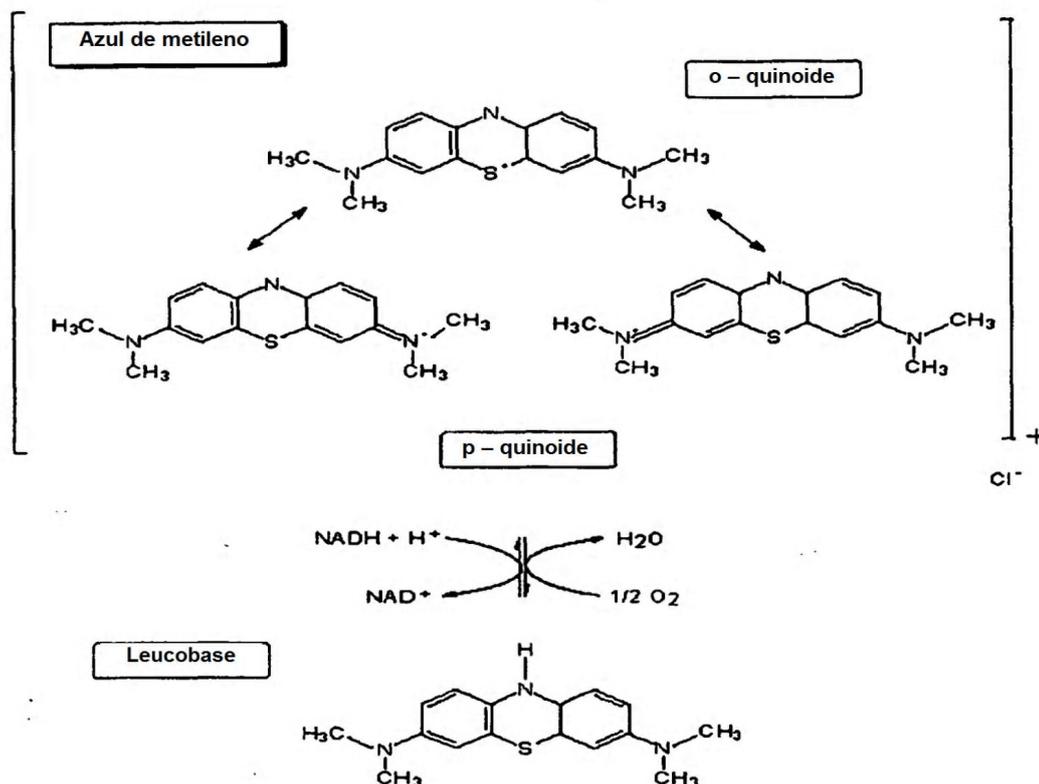
sino que permanece dentro o en el tejido. A este respecto, por ejemplo, las áreas tratadas expuestas a la luz solar pueden continuar reaccionando de forma indeseada y causar efectos secundarios.

Partiendo de esto, la invención se basa en el objetivo de perfeccionar la preparación en el sentido de que se consiga combatir de forma mejorada los microorganismos.

5 La solución de este objetivo se realiza de acuerdo con las características indicadas en la reivindicación 1.

Mediante la preparación propuesta de acuerdo con la invención, que sirve para marcar bacterias con un colorante en forma líquida o pastosa, se consigue junto con la activación o desactivación de este colorante con respecto a su absorción de luz, una intensificación o un debilitamiento del efecto oxidativo del oxígeno singlete que se produce mediante manipulación química del colorante o su nanoentorno.

10 De acuerdo con la invención, se parte de que los fotosensibilizantes, tales como, por ejemplo, los colorantes de fenotiazina, sin que se realice en ese sentido una limitación, dependiendo del nanoentorno existente pueden reaccionar en distintas formas estructuralmente similares, como se puede ver a continuación para el azul de metileno:



15 La leucoforma del azul de metileno es, por ejemplo, no fotoactiva e incolora, mientras que las formas o- y p-quinoides son fotosensibilizantes adecuados.

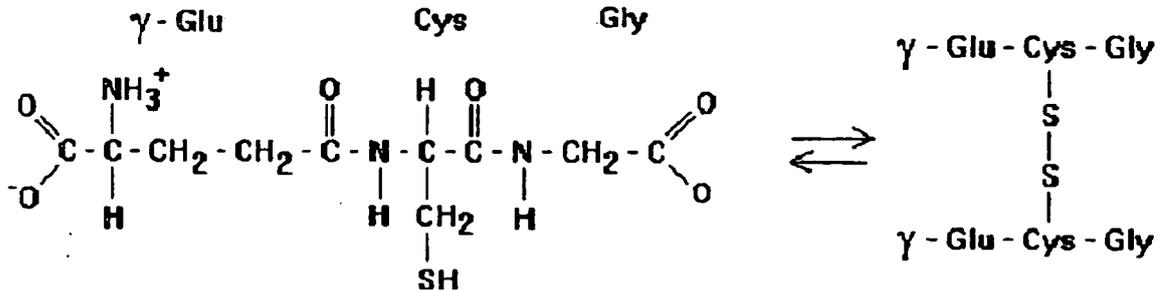
Mediante el cambio dirigido del nanoentorno de las moléculas, de este modo, se puede conectar y desconectar el efecto de forma dirigida, pudiéndose conectar o desconectar las moléculas de fotosensibilizante adsorbidas mediante protonación por donadores químicos de protones.

20 La preparación de acuerdo con la invención contiene colorantes que se pueden llevar, mediante reacciones químicas sencillas, de forma reversible de la forma activa a la inactiva y a la inversa. Después de la terapia están presentes en el cuerpo como moléculas inocuas y se pueden degradar y excretar. Por otro lado, además las todavía presentes, dado el caso, después de un tiempo x (x = horas o días) se pueden volver a "activar" mediante cambio dirigido del nanoentorno.

25 A continuación, se explican potenciales principios activos particulares de "conmutación" adecuados para la "conmutación" y su importancia general en el metabolismo como reductores, sin que en ese sentido se realice ninguna limitación.

1. Glutatión

El glutatión en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) posee las siguientes estructuras:



5 El glutatión es un derivado de aminoácido que desempeña un papel con diferente importancia en el metabolismo de las células y que está presente en una alta concentración. El glutatión está incluido en un circuito redox, en el que aparece en la forma oxidada (GSSG) y en la forma reducida (GHS). El glutatión oxidado está compuesto de dos tripéptidos encadenados entre sí mediante un enlace disulfuro, mientras que la forma tiol reducida representa un tripéptido individual con un grupo sulfhidrilo libre. En este sistema redox, se cataliza la reducción de GSSG a GSH mediante la glutatión reductasa. En este caso, el equilibrio está muy desplazado en favor del glutatión reducido y el NADPH es necesario como cofactor.

10 En las células animales, el glutatión ocupa numerosas posiciones clave en procesos bioquímicos, siendo probablemente muy importante el efecto como antioxidante. Además, desempeña un enorme papel en el metabolismo de las proteínas que contienen cisteína y participa en la desactivación de agentes tóxicos electrófilos en transportes enzimáticos catalizados por compuestos de azufre.

15 En el metabolismo, el GSH asume la función de un tampón sulfhidrilo que, entre otras cosas, debe obtener el resto de cisteína de la hemoglobina y otras proteínas de los eritrocitos en su forma reducida. Las investigaciones han dado como resultado que para la estructura natural de los eritrocitos es imprescindible el glutatión reducido, ya que un nivel incluso ligeramente menor de GSH deja ver una mayor afinidad de los glóbulos rojos por la hemólisis que en el caso normal. De la misma importancia es el ciclo redox del glutatión para la obtención de la función mitocondrial normal, estando correlacionado el nivel de GSH en este caso con la actividad de la carnitina-acilcarnitina-translocasa que, por ello, se convierte en un indicador de la presencia de glutatión en las células.

20 Durante la producción, que aparece inevitablemente en la vida aerobia, de productos secundarios, tales como peróxidos de hidrógeno y peróxidos naturales, el glutatión posee una importante función de desintoxicación. En este caso, el glutatión está incluido en un sistema aceptor específico de las células, que debe contrarrestar los radicales de oxígeno que provocan numerosas modificaciones. De este modo, por ejemplo, el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos se metabolizan en el ciclo del glutatión en una reacción catalizada por glutatión peroxidasa con glutatión reducido con formación de agua y oxígeno, lo que ocurre en una gran cantidad de células. El dímero oxidado formado de este modo de glutatión (GSSG) se reduce entonces en el circuito redox de nuevo hasta dar GSH.

30 El efecto de respaldo de glutatión reducido y glutatión peroxidasa en la protección intracelular contra daños por esta especie reactiva se pudo confirmar en numerosos estudios.

35 Se pueden producir graves consecuencias fisiopatológicas cuando una cantidad demasiado grande de oxidantes supera la capacidad del metabolismo de glutatión, por lo que se produce entonces estrés oxidativo. Los oxidantes no desintoxicados a este respecto pueden atacar entonces proteínas estructurales, enzimas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos y, por tanto, perjudicar de forma decisiva la función celular.

Se puede producir una obstaculización de la síntesis del ATP mediante peróxidos no desintoxicados en la vía mitocondrial o glucolítica. Una acumulación intracelular de GSSG, que en exceso por sí mismo también puede ocasionar daños (reacciones con grupos sulfhidrilo libres de proteínas), se disminuye intensamente mediante la función de mecanismos mediados por portador, dependientes de ATP.

40 La importancia, que en este caso se encuentra en primer plano, del glutatión como protector se debe a un mecanismo de protección configurado de la célula, que impide con el uso del glutatión y otros equivalentes de reducción la producción de formaciones de peróxido (en cadenas de ácidos grasos). De forma similar a las células de otros órganos, naturalmente, también los miocitos están dotados de un sistema enzimático antioxidante de este tipo, que, además del sistema redox de glutatión, también contiene superóxido-dismutasa (SOD) y catalasa para

protegerse contra daños por compuestos reactivos. Ya solamente la capacidad del glutatión como donador de electrones de donar átomos de hidrógeno de su grupo tiol para, con ello, unirse la mayoría de las veces a radicales cargados con carbono, oxígeno o nitrato y con ello desactivarlos, representa la eficacia como antioxidante.

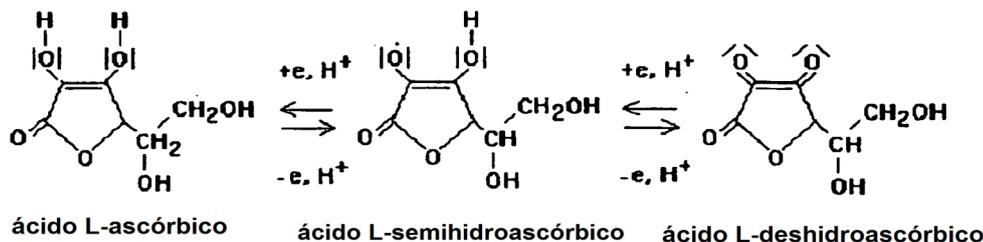
5 Ya que también se ha visto que el glutatión es una importante sustancia antioxidante en el corazón y, por tanto, un protector, existen numerosas investigaciones científicas para el problema de la posible utilidad terapéutica del suministro exógeno de glutatión en el infarto de miocardio.

10 Además, se investigó la idoneidad de un suministro externo de glutatión. En este caso, el glutatión miocárdico mediante un potente inhibidor de la síntesis del glutatión se agotó en primer lugar en animales de experimentación tratados previamente ("cerdos Yorkshire"), para poder comprobar entonces, en la comparación con animales no
15 tratados, el grado de los daños después del estrés oxidativo. Mediante una administración intravenosa del glutatión se pudo conseguir en este caso un efecto positivo, ya que con este suministro externo de glutatión aumentó el contenido miocárdico de glutatión durante la isquemia y se pudieron reducir los daños debidos a la reperfusión o el grado de infarto de miocardio. Otros trabajos diferentes en modelos de corazón perfundidos de forma aislada también han demostrado que un enriquecimiento del perfundido con GSH conlleva una recuperación claramente mejor de la función ventricular después de isquemia y reperfusión. Sin embargo, una función mejorada se basa no tanto en un aumento del nivel intracelular de GSH (el GSH no se puede transportar de forma eficaz a las células), sino más bien a efectos todavía no explorados del glutatión extracelular. Después de ensayos en un modelo de túbulos renales lesionados hipóxicamente se dedujo que el efecto citoprotector del glutatión exógeno se debe, probablemente, a la glicina que se produce por la degradación del GSH.

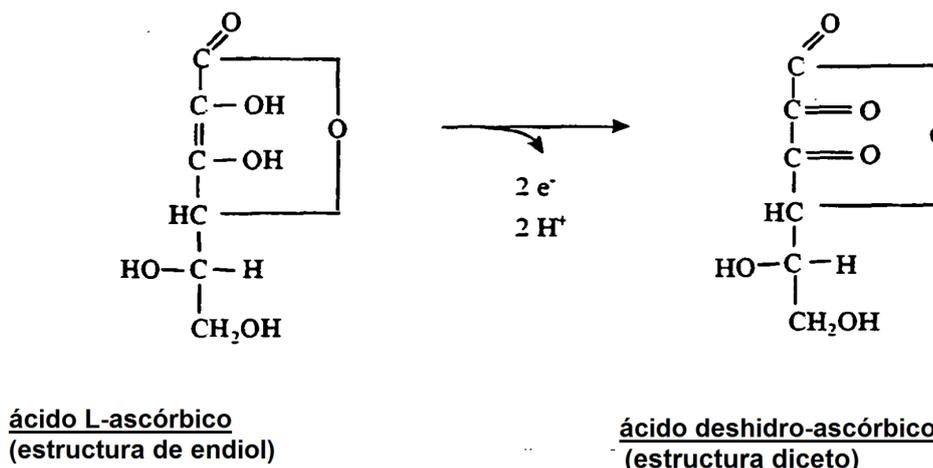
20 También se hace referencia a la glicina que se forma en el corazón agotado en cuanto a glutatión, probablemente, después de la degradación de miocitos reducidos. La glicina no es insignificante en la desintoxicación de acil-CoA, una molécula anfipática con propiedades de actividad superficial, que se acumula particularmente durante la isquemia miocárdica. Por tanto, además de la "función de conmutación" del glutatión en vista de la protonación de acuerdo con la invención del fotosensibilizante se da también un efecto protector contra daños por el efecto del
25 oxígeno singlete sobre el tejido local.

2. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico posee las siguientes estructuras:



Ácido ascórbico como donador y aceptor de protones



5 Estructuralmente, el ácido ascórbico es una cetolactona de carbono de seis miembros relacionada con glucosa y otras hexosas y una vitamina hidrosoluble. En el cuerpo se oxida de forma reversible hasta dar ácido deshidroascórbico, por tanto, actúa en el marco de un equilibrio redox como donador de electrones y aceptor de electrones, en lo que se basa también el efecto principal biológico. Los procesos redox significativos se desarrollan entre ácido L-ascórbico (actúa como donador 1 de electrones) y el ácido L-semihidroascórbico radicalico.

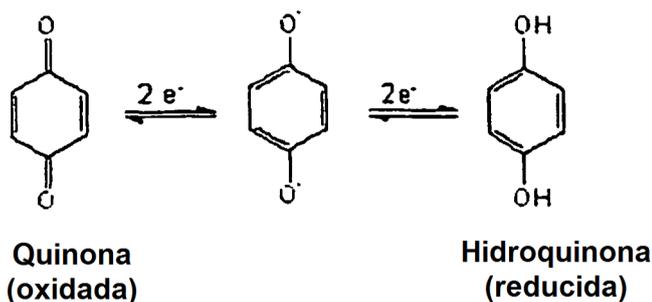
Además de otras numerosas funciones que ha de realizar el ácido ascórbico en el metabolismo, se encuentra en primer plano en este caso la importancia como "aceptor" endógeno. Esta función como captador de radicales se basa en sistemas de aceptor específicos con los que están dotadas las células para protegerse contra radicales de oxígeno y otros metabolitos de oxígeno tóxicos, que pueden conducir muy evidentemente a daños tisulares reversibles e irreversibles, entre otras cosas, también en el miocardio. En este caso, los radicales libres conocen distintos patrones de daño, siendo la peroxidación de fosfolípidos de membrana y la oxidación de compuestos sulfhidrilo seguramente las más significativas. Mientras que en el marco de la peroxidación de fosfolípidos se produce la generación de especies de radicales distintas, tales como radicales lipídicos, radicales de alcóxido de lípidos, peróxidos de lípidos e peróxido de hidrógenos de lípidos, durante la oxidación de compuestos sulfhidrilo se inactivan proteínas transportadoras de membrana y enzimas esenciales, lo que conduce, a su vez, a la acumulación de determinados electrolitos y, por tanto, al daño celular. Con ayuda de los antioxidantes que están incluidos en los sistemas de protección endógenos (además de ácido ascórbico, también vitamina E y alfa-tocoferol), las células intentan limitar o finalizar las reacciones continuas y en cadena desencadenadas por una producción de radicales de tipo explosiva.

20 El ácido ascórbico pertenece a los agentes más intensamente reductores en el medio biológico.

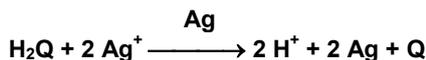
Mediante protonación del fotosensibilizante y limitación de la reacción en cadena de radicales se puede controlar el efecto fotodinámico.

3 Hidroquinona > Quinona

25 Las quinonas colaboran en las reacciones redox en mitocondrias (cadena respiratoria) y cloroplastos (fotosíntesis). Se diferencia entre las ubiquinonas y las plastoquinonas, que se caracterizan por diferentes restos de cadena lateral en el anillo de quinona. Una ubiquinona adopta como "coenzima Q" una situación clave como aceptor de electrones primario en el fotosistema II de la fotosíntesis.



30 Como agente reductor o donador de protones tal como se aplica, por ejemplo, también en el desarrollo fotográfico, se puede usar también la hidroquinona, abreviada H₂Q



4 Alcoholes y aldehídos

35 Como donadores de protones pueden servir también alcoholes mono o polivalentes, que se deshidrogenan hasta dar aldehídos. Por ejemplo, propanol o glicerina.

2.5 Solución de Na₂S₂O₄ del 0,05 al 3% como agente reductor.

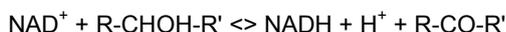
40 6 Control enzimático: el efecto de la protonación y desprotonación del fotosensibilizante se puede reforzar y controlar también mediante enzimas adecuadas, tal como, por ejemplo, mediante xantina –xantina deshidrogenasa–, la deshidrogenasa es una enzima con una especificidad de sustrato relativamente baja. Transfiere hidrógeno, por ejemplo, de formaldehído o acetaldehído a un aceptor adecuado. Esto es posible, por ejemplo, en el azul de metileno mencionado anteriormente. A su vez, la enzima xantina deshidrogenasa se puede inhibir mediante uretano.

Se puede conseguir un comportamiento de reacción similar mediante el sistema enzimático succinato-deshidrogenasa, que cataliza la etapa succinato > fumarato –una reacción que se produce en el ciclo de citrato–. Se puede inhibir competitivamente mediante una serie de sustancias similares al succinato.

El aceptor de hidrógeno más conocido y más frecuente es el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD):



o, por ejemplo,



Uno de los protones se une por el NAD⁺ directamente al anillo de nicotinamida, el otro permanece en solución.

10 El NAD⁺ es una coenzima –nunca actúa en solitario, sino exclusivamente después de la unión a una proteína. Las proteínas (enzimas) que se unen a NAD⁺ pertenecen a la clase de las deshidrogenasas. Todas catalizan la misma reacción química (véase anteriormente), sin embargo, se diferencian con respecto a su especificidad de sustrato. De este modo, se conocen entre muchas otras la alcohol deshidrogenasa, la lactato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, glicerina aldehído fosfato deshidrogenasa, entre otras.

7. Refuerzo del efecto de oxígeno singlete mediante cambio de la relación hidrógeno/deuterio

15 El oxígeno singlete que se produce con exposición se elimina rápidamente también por los átomos de hidrógeno existentes en el agua. En el entorno natural, prácticamente apenas aparece el isótopo químicamente equivalente deuterio. Mediante sustitución de una parte de los átomos de hidrógeno por el deuterio químicamente igual disminuye claramente esta extinción y, por tanto, se refuerza el efecto antibacteriano, ya que las moléculas de fotosensibilizante excitadas unidas y los oxígenos singlete desencadenados por las mismas encuentran en su nanoentorno un ambiente de deuterio en lugar de hidrógeno. La vida útil más larga de los oxígenos singlete significa más reactividad frente a moléculas de membrana bacteriana. Esto se puede conseguir mediante sustitución del hidrógeno por deuterio en el intervalo del 0 al 100%.

25 Una configuración particular de la invención está dirigida a una solución de lavado con la que se continúa optimizando el combate fotodinámico. A continuación, se describen las relaciones de efecto que se cumplen tanto para la preparación descrita anteriormente como para la solución de lavado.

La inactivación fotoquímica de microorganismos contiene un desarrollo complejo de reacciones químicas. En principio, se pueden representar tres reacciones básicas:

- 30
- La tinción de microorganismos relevantes con un colorante fotoquímicamente activo
 - La activación del colorante con una luz de longitud de onda y densidad energética adecuadas
 - El desarrollo de las reacciones de inactivación necesarias (oxidación de membrana mediante radicales/oxígeno singlete)

Para el desarrollo clínico, por tanto, son decisivas dos etapas:

- La tinción con el colorante fotosensibilizante
- La exposición del área diana

35 Los colorantes para la tinción histológica están compuestos de dos constituyentes esenciales.

1. Grupo cromóforo (portadores de colorante), por ejemplo, compuestos azo, benceno.

Un grupo cromóforo todavía no hace que un producto químico sea un colorante, a pesar de que pueda parecer coloreado a la vista.

40 Para esto se necesita un segundo componente que se denomina auxocromo (coadyuvante de color).

2. Grupos auxocromos (coadyuvante de color),

son o grupos ácidos, por ejemplo

grupos R-O(-) hidroxilo,

R-COO(-) carboxilo,

45 R-NO₂(-) nitro,

o grupos básicos, por ejemplo

grupos R-NH₃(+).

El tipo de los auxocromos determina la clasificación en colorantes ácidos y básicos. Están presentes la mayoría de las veces en forma de las correspondientes sales.

5 La teoría de la tinción (Harms) dice que los colorantes básicos cargados positivamente se adhieren a componentes celulares y tisulares ácidos que muestran entonces el efecto de la basofilia. Por otro lado, los colorantes ácidos cargados negativamente se unen a componentes cargados positivamente, es decir, acidófilos en células y tejidos.

Tejido	Colorante
Componentes (ácidos) cargados negativamente (-), por ejemplo, ácidos nucleicos, mucilagos "basofilia"	Colorantes (básicos) cargados positivamente (+), por ejemplo, azul de metileno, verde de metileno
Componentes (básicos) cargados positivamente (+), por ejemplo, gránulos eosinófilos "acidofilia"	Colorantes (ácidos) cargados negativamente (-), por ejemplo, eosina

10 Basándose en los trabajos de Robert Koch, Paul Ehrlich ha descrito en su publicación "Über das Methylenblau und seine klinisch- bakterioskopische Verwertung" Zeitschrift für klinische Medizin 1881;2;710-3 la aplicación de colorantes de fenotiazina para hacer visibles bacterias. Las soluciones colorantes están compuestas de moléculas de colorante disueltas que reaccionan de forma más o menos específica a membranas. Las bacterias se pueden teñir y comprobar en la denominada tinción simple con azul de metileno.

Las membranas celulares de microorganismos y células representan estructuras estructurales altamente específicas. La interacción con el entorno se determina por las relaciones locales de concentración y carga. Para una reacción de una molécula, por ejemplo, de un colorante, es necesario un contacto con la membrana.

15 Esta coloración de bacterias tiene lugar en soluciones acuosas del 0,1% al 1% y las mismas se encuentran, por norma general, en un valor de pH de 3-4. La parte de la molécula que da color, el catión de colorante, se apoya en la pared de la bacteria con ayuda de su carga superficial positiva, denominándose estos colorantes también colorantes vitales.

La reacción de color depende, entre otras cosas, también del valor de pH de la muestra a colorear. Un valor de pH ácido intensifica la reacción con el azul de metileno básico (coloración azul).

20 En la inactivación de gérmenes fotoquímica se utiliza ahora el catión de colorante acumulado como "máquina fotoquímica" que absorbe la energía de la luz láser y transforma la misma en energía química ¡que se utiliza para la producción de oxígeno singlete!

25 La exposición se ve influida, sobre todo, por la selección de una longitud de onda adecuada, que se debería aproximar al máximo de absorción del colorante, la densidad superficial y energética suficiente, sin embargo, sobre todo también por la distribución en el espacio uniforme de la luz. Esto es decisivo, sobre todo, cuando se deben tratar estructuras complejas con propiedades ópticas diferentes, tales como dientes, huesos y membrana mucosa en un área.

Sorprendentemente, se ha demostrado que se puede mejorar claramente el efecto de la inactivación fotoquímica de microorganismos cuando se incluye una tercera etapa:

30 de acuerdo con la invención se realiza la preparación de la región terapéutica después de la tinción y antes de la exposición mediante eliminación por lavado de la solución colorante con una solución de lavado adecuada

En una serie de ensayos clínicos, en pacientes con infecciones bacterianas comprobadas en bolsas gingivales, las mismas se lavaron con una solución al 0,1% de azul de metileno y, de este modo, se tiñeron las bacterias y la placa existentes en ese lugar.

35 A continuación, las bolsas se expusieron a un láser a través de una óptica y después se lavaron exhaustivamente todas las bolsas con una solución de lavado acuosa para retirar, en la medida de lo posible, todos los restos de colorante.

Después del lavado con la solución de lavado, se extrajo de nuevo una muestra de las bolsas para determinar la densidad de población bacteriana restante.

40 En el marco de una serie de ensayos ampliada, se expusieron las bolsas después de un cuidadoso lavado para la retirada de restos de colorante de nuevo durante un minuto a un láser y una óptica. En la Tabla 1 están

representados los números de gérmenes resultantes en dos pacientes.

Tabla 1: comparación de los números de gérmenes en dos pacientes antes del tratamiento, después del tratamiento y después de nueva exposición después del lavado

Tipo de Bacteria	Paciente 1 antes del tratamiento	Paciente 1 después de exposición 1	Paciente 1 después de exposición 2	Paciente 2 antes del tratamiento	Paciente 2 después de exposición 1	Paciente 2 después de exposición 2
<i>Actinobacillus actinomycetemcom.</i>	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<2,7 \times 10^3$	$<4,5 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	$<2,5 \times 10^2$	$<1,5 \times 10^2$	$<1,5 \times 10^2$	$<4,6 \times 10^4$	$<1,3 \times 10^3$	$<2,9 \times 10^2$
<i>Tannerella forsythensis</i>	$<1,7 \times 10^5$	$<5,7 \times 10^3$	$<2,5 \times 10^2$	$<6,3 \times 10^5$	$<5,3 \times 10^3$	$<2,5 \times 10^2$
<i>Treponema denticola</i>	$<6,6 \times 10^4$	$<6,6 \times 10^3$	$<2,5 \times 10^2$	$<4,7 \times 10^5$	$<4,1 \times 10^3$	$<2,5 \times 10^2$
<i>Fusobacterium nucleatum ssp.</i>	$<2,6 \times 10^5$	$<4,4 \times 10^3$	$<2,8 \times 10^2$	$<3,1 \times 10^5$	$<6,2 \times 10^3$	$<2,5 \times 10^2$
<i>Prevotella intermedia</i>	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$
Total	$<4,2 \times 10^8$	$<2,3 \times 10^8$	$<2,1 \times 10^7$	$<4,2 \times 10^8$	$<4,8 \times 10^7$	$<1,4 \times 10^7$
antes del tratamiento =	Muestra extraída antes de la reacción de tinción					
después de la exposición 1 =	Muestra extraída después de la exposición con solución colorante					
después de la exposición 2 =	Muestra extraída después de la exposición después de la eliminación por lavado del colorante					

5 A este respecto, se puede ver que la nueva exposición después de la eliminación por lavado de la solución colorante refuerza sorprendentemente el efecto de la desinfección fotoquímica.

No se pudo conseguir un efecto similar realizándose la extracción de la muestra directamente después de la eliminación por lavado del colorante sin nueva exposición. Este efecto, por tanto, no se consiguió mediante la "eliminación por lavado" de los gérmenes.

10 Tampoco se pudo conseguir un efecto comparable mediante la exposición doble después de la eliminación por lavado. Por tanto, este efecto tampoco se debe a un aumento de la dosis de exposición.

Con el lavado de la zona de terapia con la solución de lavado antes de la exposición, por tanto, se mejoró clara y sorprendentemente el efecto de la exposición.

Una investigación de parámetros esenciales de la solución de lavado dio como resultado que cambiaron los siguientes parámetros químicos y ópticos de la zona de terapia:

- 15
- Valor de pH
 - Concentración de iones
 - Transparencia óptica
 - Concentración de proteínas

20 Con el lavado después de la tinción de los microorganismos antes de la exposición, con un ajuste dirigido de los parámetros ópticos y químicos se puede mejorar el efecto de la luz y garantizar el desarrollo en la medida de lo posible sin alterar de las cadenas de reacción fotoquímicas.

La solución de lavado posee, al menos, una de las siguientes propiedades:

- El valor de pH del área de terapia se desplaza del intervalo adecuado para la tinción de los microorganismos

de 3-4 al intervalo adecuado para la formación de oxígeno singlete de 7 a 9. La formación de oxígeno singlete y, por tanto, el ataque oxidativo a la membrana de microorganismos, en soluciones con valor de pH de 7-9 es hasta 5 veces mayor que en el intervalo de pH 3-4.

5 ● La concentración de iones cambia y se debilitan los sistemas de tampón (por ejemplo, de sangre y saliva). La formación de oxígeno singlete aumenta en soluciones no tamponadas o débilmente tamponadas de pH 5-6 el doble, si se comparan con soluciones intensamente tamponadas del mismo valor de pH.

10 ● Disminuye la extinción del líquido en el área de terapia. ¡Dependiendo de la concentración de la solución colorante, un espesor de capa de 200 μm con una solución de azul de metileno al 1% ya conduce a una absorción de la luz del 95%! Por otro lado, son activas solo las moléculas de colorante en el sentido de la terapia que están unidas de forma electroestática directamente a la membrana de microorganismos. La vida útil de los reactantes decisivos de las reacciones fotoquímicas que se desarrollan asciende a:

○ Molécula de fotosensibilizante excitada = 1×10^{-9} s

○ Oxígeno singlete = 1×10^{-4} a 10^{-7}

15 Con ello, la longitud de camino libre media de las moléculas de oxígeno singlete reactivas se encuentra en aproximadamente 0,2 nm. Por tanto, sus posibilidades de reacción permanecen limitadas también a este radio alrededor de la molécula. Las moléculas de colorante que permanecen en solución libre, por tanto, no son útiles en el sentido de la terapia, sino que impiden, mediante el aumento de la extinción, incluso el efecto terapéutico.

● Actúan hemostáticamente y/o disminuyen en general la concentración de proteínas plasmáticas, ya que pueden servir también como compañeros de reacción concurrentes para oxígeno singlete y radicales formados.

20 Por lo tanto, están previstas soluciones de lavado con base acuosa o no acuosa que presentan al menos una de las siguientes propiedades:

● poseen un valor de pH de 7-9,

● no contienen ninguna concentración de compuestos de este tipo que podrían servir como sistemas de tampón (por ejemplo, fosfatos, citratos, carbonatos),

25 ● no aumentan la extinción de la luz láser aplicada,

● eliminan mediante lavado de forma eficaz la solución colorante,

● presentan un efecto hemostático.

30 De acuerdo con la invención, la preparación que contiene colorante o que es un colorante de este tipo se aplica, en primer lugar, en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente y a continuación se lleva a cabo un lavado con la solución de lavado, particularmente agua y/o con un valor de pH básico en la medida de lo posible. A continuación, se lleva a cabo la irradiación mediante la luz del aparato de irradiación, realizándose de forma preferente un daño celular optimizado. Se ha visto que es particularmente eficaz aplicar la preparación en primer lugar en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente y llevar a cabo, a continuación, un lavado con la solución de lavado, particularmente agua y/o con una presión parcial de oxígeno lo más alta posible y, finalmente, llevar a cabo la irradiación mediante la luz de la fuente luminosa mencionada, realizándose preferentemente un daño celular optimizado. Además, se ha visto que es particularmente apropiado que después de la aplicación de la preparación en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente y, además, antes de la exposición mediante la luz de la fuente luminosa se lleve a cabo una disminución de la cantidad de la preparación y, de hecho, particularmente mediante frotado y/o secado y/o aspiración y/o eliminación por soplado.

40 Se comienza lentamente con la aplicación de la sustancia fotoactivable, que se aplica cubriendo la superficie mediante una jeringa sobre las áreas tisulares infectadas. La cantidad se ha de elegir necesariamente de tal manera que la sustancia fotoactivable humedezca la superficie de las zonas infectadas de la forma más delgada posible. Se ha de asegurar la humectación completa de huecos y bolsas en el tejido. Dado el caso, con una morfología compleja se ha distribuir cuidadosamente con el soplador de aire. El tiempo de acción de la sustancia fotoactivable asciende al menos a 60 s. Después del lavado durante al menos 3 s con aspiración simultánea de exceso de solución (¡retirar obligatoriamente depósitos de colorante!) se tiene que exponer con el aparato de irradiación. Es esencial para el efecto reductor de gérmenes y, por tanto, para el resultado del tratamiento, la dosificación correcta del suministro de energía, la exposición.

50 Después del tiempo de acción de la preparación o del fotosensibilizante (PS), que está indicada con al menos 60 s, de acuerdo con la invención se elimina mediante lavado el exceso de PS y, al mismo tiempo, se aspira la solución de lavado. Con ello, se retiran el PS y el exudado y quedan solo los restos remanentes para una absorción por gestión

oral.

Tabla de relación de dilución después de eliminación por lavado y aspiración del PS

Solución de lavado en ml	Dilución	Contenido MB en %	Molar	Contenido MB en mg/ml	mg sustancia en 0,5 ml
0	Solución de partida	1	0,031	10	5
5	1:10	0,01	0,003	1	0,5
50	1:100	0,001	0,0003	0,01	0,05

5 Como se puede ver en la anterior tabla, con la eliminación por lavado, dilución y aspiración del PS en el factor 10 permanecen todavía 0,5 mg y con la dilución en el factor 100 todavía 0,05 mg de sustancia. Esto se correspondería con una dilución del factor 100 (lavado con agua), con la suposición de que toda la cantidad restante se absorbe y reabsorbe por vía oral, en un adulto con un peso corporal supuesto medio de 65 kg, a una de 0,0008 mg por kg de peso corporal o 0,08 microgramos por kg de peso corporal. En un niño con un peso supuesto de 20 kg, esto serían 0,0025 miligramos por kg de peso corporal o 2,5 microgramos por kg de peso corporal.

10 Para la solución al 1% usada como antídoto para la inyección se indica una dosis máxima diaria de hasta 200 mg. Esto significa, para un adulto, una dosis de kg por día de aproximadamente 3 mg y para un niño de 10 mg/día/kg.

En 0,5 ml de solución al 1% están disueltos como máximo 5 mg de MB. Incluso si el paciente se traga todo, la dosis por kg por día asciende solo aproximadamente a 80 µg y para un niño, a 250 µg. Esto se corresponde solo aproximadamente al 2,5% de la dosis recomendada para la desintoxicación sin tener en cuenta la dilución recomendada terapéuticamente indicada anteriormente antes de la exposición.

15 Un factor esencial adicional que se refiere a la eliminación por lavado de la preparación o del fotosensibilizante (PS) antes de la exposición, es la elevada absorción de la preparación o del fotosensibilizante (PS) en el intervalo de la longitud de onda de la luz aplicada.

20 Las mediciones muestran que una película de líquido que se encuentra sobre el tejido de la preparación o del fotosensibilizante de 100 µm disminuye la densidad energética eficaz en el 97%. Con una duplicación adicional del grosor de capa se continúa debilitando la luz respectivamente, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer. Con ello no es posible una irradiación terapéuticamente eficaz con una preparación o fotosensibilizante en exceso.

25 Debido al lavado con la solución de lavado, particularmente agua, con concentración de iones lo más baja posible se ponen en riesgo las bacterias y/o membranas celulares debido al gradiente de presión osmótica generado de este modo. Se ha de señalar que, por ejemplo, una solución salina fisiológica sería desfavorable debido a la concentración iónica relativamente alta. El valor de pH de la solución de lavado se predefine ventajosamente más bien básico. Preferentemente, se predefine un valor de pH de 7 a 9. La presión parcial de oxígeno está predefinida preferentemente grande. En el marco de la invención, la solución de lavado, particularmente agua de grifo tratada para el lavado presenta una presión parcial de oxígeno en el intervalo de 4 a 6 mg/l. De forma apropiada, la solución de lavado está enriquecida con oxígeno molecular en hasta 14 mg/l. Además, se ha visto que es apropiado un enriquecimiento de peróxido de acuerdo con la invención y, de hecho, preferentemente como solución de peróxido de hidrógeno del 0,5% al 3%.

Debido al anterior lavado con la solución de lavado de concentración iónica baja, durante la irradiación media de la luz láser se lleva a cabo un daño celular optimizado. La preparación y la combinación con la solución de lavado producen de acuerdo con la invención un cambio dirigido del valor de pH en el intervalo de trabajo en tres etapas:

- 35
- tinción en el intervalo ácido, particularmente a un valor de pH entre 3 y 5.
 - ajuste o desconexión más bien en el intervalo ácido mediante la solución de lavado, particularmente ácido ascórbico.
 - exposición en el intervalo de neutro a ligeramente básico, particularmente a un valor de pH entre 7 y 9.

REIVINDICACIONES

1. Preparación en forma líquida o pastosa para su uso para combatir fotodinámicamente microorganismos en bolsas gingivales, que contiene un fotosensibilizante que presenta colorante, durante cuya irradiación mediante luz se forma oxígeno singlete, pudiéndose marcar mediante el colorante los microorganismos, que contiene particularmente un principio activo para la intensificación del efecto oxidativo del oxígeno singlete mediante manipulación química del colorante o su nanoentorno en combinación con una solución de lavado, mediante la cual, para mejorar la eficacia de la preparación, se puede eliminar mediante lavado el fotosensibilizante después de la tinción de los microorganismos y antes de la irradiación, **caracterizada por que** el fotosensibilizante se aplica en primer lugar en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente, por que, a continuación, se lleva a cabo un lavado con la solución de lavado, particularmente agua y/o con una concentración iónica lo más baja posible y por que, finalmente, se lleva a cabo la irradiación mediante la luz láser, y realizándose preferentemente un daño celular optimizado o por que se aplica el fotosensibilizante en primer lugar en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente, por que, a continuación, se lleva a cabo un lavado con la solución de lavado, particularmente agua y/o un valor de pH lo más básico posible y por que, finalmente, se realiza la irradiación mediante la luz láser, realizándose preferentemente un daño celular optimizado.
2. Preparación para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la solución de lavado está configurada de tal manera que se desplaza, mediante la eliminación por lavado, del valor de pH del área terapéutica a un intervalo adecuado para la formación de oxígeno singlete de 7 a 9 y/o se puede modificar la concentración iónica.
3. Preparación para el uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada por que** la solución de lavado está configurada de tal manera que mediante la eliminación por lavado se pueden debilitar los sistemas de tampón y/o se puede disminuir la extinción del líquido en el área de terapia y/o se puede conseguir un efecto hemostático local y/o se puede disminuir la concentración de proteínas plasmáticas.
4. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** la solución de lavado con base acuosa o no acuosa presenta, al menos, una de las siguientes propiedades:
- un valor de pH de 7 a 9,
 - ninguna concentración de compuestos que pudieran servir de sistemas de tampón,
 - ningún aumento de la extinción de la luz láser aplicada,
 - una capacidad de eliminación por lavado eficaz de la solución colorante,
 - un efecto hemostático.
5. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** la solución de lavado, particularmente agua de grifo tratada, presenta una presión parcial de oxígeno de 4-6 mg/l y/o está enriquecida con oxígeno molecular hasta 14 mg/l y/o por que el medio mencionado está enriquecido con un peróxido, particularmente con una solución de peróxido de hidrógeno del 0,5 al 3%.
6. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** el colorante se puede activar o desactivar con respecto a su absorción de luz y/o por que mediante la protonación por donadores químicos de protones se pueden conectar o desconectar las moléculas de fotosensibilizante absorbidas y/o por que se puede controlar el efecto fotodinámico mediante la protonación del fotosensibilizante y limitación de la reacción en cadena de radicales.
7. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada por que** al menos una parte de los átomos de hidrógeno del agua está sustituida por deuterio.
8. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada por que** el fotosensibilizante en un disolvente presenta una concentración, y de hecho, de peso por volumen, mayor del 0,1%, preferentemente mayor del 0,5% y particularmente en lo esencial del 1% y/o por que para la concentración está predefinido un límite superior del 10%, preferentemente del 4%, particularmente del 3%.
9. Preparación para el uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada por que** la sustancia fotoactivable se aplica en primer lugar en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente, por que, a continuación, se lleva a cabo un lavado con una solución de lavado, particularmente de agua y/o con una presión parcial de oxígeno lo más alta posible y por que, finalmente, se lleva a cabo la irradiación mediante la luz láser, realizándose preferentemente un daño celular optimizado, o por que la sustancia fotoactivable se aplica en primer lugar en una alta concentración sobre la zona a tratar terapéuticamente, por que, a continuación y antes de la exposición, se realiza una disminución de la cantidad de colorante mediante frotado, secado, aspiración o eliminación por soplado.