

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 731**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/155** (2006.01)

**A61K 41/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2009 E 09790912 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2323643**

54 Título: **Composición y procedimiento para el tratamiento de MRSA**

30 Prioridad:

**01.08.2008 US 85577 P**

**11.06.2009 US 186068 P**

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

**05.09.2013**

73 Titular/es:

**ONDINE INTERNATIONAL LTD. (100.0%)  
Suite 5 Edghill House, Wildey Business Park  
St. Michael, BB**

72 Inventor/es:

**STREET, CALE;  
LOEBEL, NICOLAS y  
PEDIGO, LISA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 421 731 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 y procedimiento para el tratamiento de MRSA

### Campo de la Invención

5 La presente invención proporciona una composición fotosensibilizadora y un procedimiento de desinfección fotodinámica que usa dicha composición para el tratamiento de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina ("MRSA") que potencia la eficacia del tratamiento de MRSA al tiempo que reduce la irritación y la sensibilidad a los tejidos del huésped en el sitio de tratamiento.

### Antecedentes de la Invención

10 El MRSA, un aerobio esférico Gram-positivo, representa hasta un 50% de las infecciones hospitalarias por *S. aureus*, y representa un problema de miles de millones de dólares en las unidades de cuidados críticos, unidades de cuidados intensivos y hospitales generales en todo el mundo. Dado que las bacterias se adaptan naturalmente a los antibióticos, más de un 95% de los pacientes con MRSA no responden a los antibióticos de primera línea. Determinadas cepas de MRSA son ahora incluso más resistentes a antibióticos glicopeptídicos como Vancomicina®, eliminando el último tratamiento antibiótico eficaz que quedaba para la enfermedad. Debido el hecho de que el  
15 MRSA es resistente a la mayoría de los antibióticos tales como meticilina, oxacilina, penicilina y amoxicilina, existe una necesidad de tratar MRSA sin el uso de antibióticos.

La desinfección fotodinámica es un procedimiento de tratamiento alternativo deseable ya que se ha demostrado que es una aproximación in vitro antimicrobiana no antibiótica eficaz. Una ventaja ejemplar de la desinfección  
20 fotodinámica como una modalidad de tratamiento de MRSA es que, debido a este mecanismo bactericida no específico, típicamente no está sujeta a problemas de resistencia que pueden afectar al uso de antibióticos. Como otra ventaja ejemplar, se puede usar en forma de un tratamiento tópico localizado que se puede administrar en áreas tales como las cavidades nasales (por ejemplo, la mucosa nasal) en las que MRSA se encuentra con mayor probabilidad en el organismo humano.

La desinfección fotodinámica implica fundamentalmente el uso de la energía de la luz para activar uno o más  
25 fotosensibilizadores de una composición fotosensibilizadora de modo que esos fotosensibilizantes dejan pasar energía directamente a un sustrato/diana (reacción de tipo I), o pueden interactuar con oxígeno molecular para producir especies oxigenadas reactivas (reacción de tipo II). Estas reacciones median la reducción no específica de MRSA y de otras células microbianas principalmente mediante peroxidación lipídica, daño a la membrana, y daño a los componentes intracelulares.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición fotosensibilizadora para el tratamiento de MRSA que  
30 comprende un fotosensibilizador (por ejemplo, fenotiazina) y clorhexidina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se muestra a continuación, esta composición, cuando se usa para la desinfección fotodinámica de MRSA, potencia la eficacia del tratamiento de MRSA. Además, en una realización de la presente invención, la composición fotosensibilizadora también reduce y/o elimina la irritación y la sensibilidad a tejidos del huésped en el sitio de tratamiento.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar MRSA que comprende: aplicar la  
40 composición que comprende un fotosensibilizador, clorhexidina y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sitio de tratamiento; y aplicar luz al sitio de tratamiento a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador con el fin de reducir MRSA en el sitio de tratamiento.

La presente invención proporciona adicionalmente un procedimiento para reducir microbios que causan  
45 enfermedades que comprende: aplicar una composición que comprende un fotosensibilizador, clorhexidina a una concentración superior a aproximadamente un 0,01% e inferior a aproximadamente un 2% v/v, y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sitio de tratamiento que contiene microbios que causan enfermedades; y aplicar luz al sitio de tratamiento a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador con el fin de reducir los microbios en el sitio de tratamiento.

### Breve descripción de los dibujos

Las características y los aspectos inventivos de la presente invención serán más evidentes después de la lectura de  
50 la siguiente descripción detallada, reivindicaciones, y dibujos, de los cuales lo que sigue a continuación es una breve descripción:

La Figura 1 es un gráfico que muestra el perfil de absorbancia de tres composiciones que se describen a continuación en el Ejemplo I; y

La Figura 2 es una tabla que muestra los datos recogidos para los experimentos que se describen a continuación en el Ejemplo II.

**Descripción de la realización preferente**

En la presente invención, la clorhexidina se combina con un fotosensibilizador para aumentar los efectos de la desinfección fotodinámica para reducir, eliminar y/o matar (en lo sucesivo en el presente documento mencionado colectivamente como "reducir", "que reduce", y/o "reducción") microbios que causan enfermedades tales como MRSA o similares. La composición fotosensibilizadora de la presente invención incluye un fotosensibilizador, clorhexidina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se analiza a continuación, la composición combina los efectos antimicrobianos potentes a corto plazo de la desinfección fotodinámica con una desinfección química más sostenida proporcionada por la clorhexidina.

La clorhexidina (por ejemplo, gluconato de clorhexidina, digluconato de clorhexidina, dihidrocloruro de clorhexidina, diacetato de clorhexidina o similares) es un antiséptico de amplio espectro usado para la desinfección tópica de la superficie de la piel (por ejemplo, lavado quirúrgico o similar). Para dicha aplicación, la clorhexidina se usa comúnmente en concentraciones a un porcentaje de volumen total  $\geq 2$  ("% v/v"). Véase por ejemplo, BactoShield® (2%, 4%), Betasept® (4%), ChloroPrep® (2%), Chlorostal® (2%), Lavado Quirúrgico con Dial® (4%), Dyna-Hex (2%, 4%) Hibiclens® (4%) y Operand® (2%). Se ha informado de irritación y sensibilidad con dicho uso de productos que contienen clorhexidina, especialmente en áreas sensibles de la piel.

En una realización de la presente invención, se proporciona clorhexidina a una concentración que reduce y/o elimina la irritación y la sensibilidad potencial a los tejidos del huésped en el área de tratamiento. Esta reducción y/o eliminación de la irritación y la sensibilidad potencial es especialmente útil cuando los tejidos del huésped en el área de tratamiento son tejidos sensibles tales como la mucosa nasal. Las concentraciones ejemplares adecuadas son aproximadamente un 1% v/v; aproximadamente un 0,5% v/v; aproximadamente un 0,25% v/v; aproximadamente un 0,125% v/v; entre aproximadamente un 0,125% v/v y aproximadamente un 1% v/v; entre aproximadamente un 0,125% v/v y aproximadamente un 0,8% v/v; entre aproximadamente un 0,125% v/v y aproximadamente un 1,5% v/v; entre aproximadamente un 0,25% v/v y aproximadamente un 0,5% v/v; entre aproximadamente un 0,25% v/v y aproximadamente un 1% v/v; entre aproximadamente un 0,25% v/v y aproximadamente un 1,5% v/v; un intervalo que es inferior a aproximadamente un 1% v/v pero superior a aproximadamente un 0,1 % v/v; un intervalo que es inferior a aproximadamente un 0,8% v/v pero superior a aproximadamente un 0,1% v/v; un intervalo que es inferior a aproximadamente un 2% v/v pero superior a aproximadamente un 0,1% v/v; y un intervalo que es inferior a aproximadamente un 2% v/v pero superior a aproximadamente un 0,125%. El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento en la presente memoria descriptiva se referirá a +/- 20% del valor indicado.

Los ejemplos del fotosensibilizador incluyen fotosensibilizadores que efectúan fotorreacciones tanto de Tipo I como de Tipo II, donde las reacciones de Tipo I producen reacciones de captación de electrones de tipo redox después de la aplicación de luz y las reacciones de Tipo II producen oxígeno atómico (a través de oxígeno molecular) después de la aplicación de luz. Las clases de compuestos adecuados que se pueden usar como el fotosensibilizador incluyen tetrapirroles o derivados de los mismos tales como porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, naftalocianinas, texafirinas, verdinas, purpurinas o feoforbidas, fenotiazinas, etc., tales como las que se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6.211.335; N° 6.583.117; y N° 6.607.522 y la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2003-0180224. Las fenotiazinas preferentes incluyen azul de metileno, azul de toluidina, y las que se analizan en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2004-0147508. Otro fotosensibilizador preferente es el verde de indocianina. La presente invención también contempla el uso de dos o más fotosensibilizadores, tales como azul de metileno y azul de toluidina o similares. Los fotosensibilizadores que se han mencionado anteriormente son ejemplos y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

El fotosensibilizador puede estar presente en la composición fotosensibilizadora en cualquier cantidad adecuada. Los ejemplos están entre aproximadamente un porcentaje de un 0,001 del peso total (% en peso) y aproximadamente un 10% en peso, entre aproximadamente un 0,005% en peso y aproximadamente un 5% en peso, entre aproximadamente un 0,01% en peso a aproximadamente un 1% en peso, entre aproximadamente un 0,01% en peso a aproximadamente un 0,1 % en peso, y no superior a aproximadamente un 1% en peso. El porcentaje de peso total (% en peso) también se puede convertir en porcentaje de peso total a volumen (% p/v) o en porcentaje de volumen total a volumen (% v/v). Para el fin de la presente memoria descriptiva, la concentración de fotosensibilizador se puede expresar en % en peso, % p/v, o % v/v y dicha expresión de la concentración pretende incluir sus equivalencias (por ejemplo, si se expresa en % en peso, pretende incluir la concentración equivalente medida en % p/v y en % v/v).

Como se muestra en el Ejemplo II que sigue a continuación, la clorhexidina potencia significativamente la eficacia antimicrobiana de la desinfección fotodinámica al reducir y/o eliminar los patógenos microbianos tales como MRSA, incluso a niveles bajos de concentración tales como entre aproximadamente un 0,1% v/v y aproximadamente un 1% v/v. A concentraciones de clorhexidina entre un 0,125% v/v y un 0,5% v/v, la actividad antibacteriana de la clorhexidina y la desinfección fotodinámica combinadas es mayor de lo que se podría esperar considerando solamente los efectos aditivos de los dos procedimientos antibacterianos por sí mismos. Esto indica una potenciación inesperada del efecto antibacteriano cuando la concentración baja de clorhexidina y la desinfección fotodinámica se administran simultáneamente. Esta potenciación incluso ocurre cuando se usa clorhexidina a una concentración inferior a la que normalmente se usa para la desinfección tópica de la piel. De este modo, la concentración más baja de clorhexidina reduce y/o elimina tanto la irritación como la sensibilidad asociadas

normalmente con la clorhexidina, y aún actúa para aumentar la capacidad antibacteriana de la reacción fotodinámica. Esto es especialmente importante en el tratamiento de MRSA localizado en la cavidad nasal debido a la sensibilidad de la mucosa nasal como un sitio de tratamiento y la necesidad de erradicar todos los organismos patógenos de MRSA para prevenir la recolonización.

5 La composición fotosensibilizadora de la presente invención incluye adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable es un diluyente, adyuvante, excipientes, o vehículo con el que se administran los otros componentes de la composición (por ejemplo, el fotosensibilizador y la clorhexidina, etc.). El vehículo farmacéuticamente aceptable está aprobado preferentemente mediante una agencia reguladora del gobierno Federal o de un estado, o se enumera en la Farmacopea de Estados Unidos u en otras farmacopeas reconocidas generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferentemente líquidos estériles. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a agua, solución salina, solución de dextrosa, solución de glicerol, solución salina tamponada con fosfato, etc.

10 Es adicionalmente preferente que el vehículo farmacéuticamente aceptable, cuando se combina con el fotosensibilizador y la clorhexidina, permita que la composición fotosensibilizadora tenga una viscosidad lo suficientemente baja como para fluir en el sitio de tratamiento mientras que también tiene una viscosidad lo suficientemente elevada como para mantener la composición dentro del sitio de tratamiento. Se contemplan las composiciones adicionales que se convierten en líquidas después de su aplicación en el sitio de tratamiento tales como las que se funden o entran en solución en el sitio de tratamiento. Como alternativa, la composición puede gelificar después de su aplicación al sitio de tratamiento en forma de un líquido; ésto permitiría que la composición cubriera el sitio de tratamiento de forma eficaz, al tiempo que también se mantendría la composición en el sitio de tratamiento.

15 La presente invención también proporciona un procedimiento de desinfección fotodinámica para el tratamiento de MRSA que comprende: aplicar la composición fotosensibilizadora de la presente invención que se ha descrito anteriormente a un sitio de tratamiento; y aplicar luz al sitio de tratamiento a una longitud de onda absorbida por la composición fotosensibilizadora para reducir MRSA en el sitio de tratamiento. El sitio de tratamiento para el procedimiento de la presente invención para tratar MRSA sería preferentemente la cavidad nasal (por ejemplo, la mucosa nasal) ya que generalmente se conoce como un sitio activo para MRSA. La desinfección fotodinámica de los orificios nasales anteriores de la cavidad nasal reduce y/o elimina MRSA.

20 Es preferente que antes de la aplicación de luz al sitio de tratamiento, la composición fotosensibilizadora se ponga en contacto con el sitio de tratamiento durante al menos aproximadamente 1 segundo, más preferentemente durante al menos aproximadamente 5 segundos, incluso más preferentemente durante al menos aproximadamente 10 segundos, y lo más preferentemente de aproximadamente 10 segundos a 30 segundos.

25 La luz a aplicar durante el procedimiento de la presente invención puede ser de cualquier longitud o longitudes de onda que puedan ser absorbidas por el fotosensibilizador o los fotosensibilizadores contenidos en la composición fotosensibilizadora. Las longitudes de onda son generalmente de entre aproximadamente 160 nm a 1600 nm, entre aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm, y entre aproximadamente 500 nm a aproximadamente 850 nm, aunque las longitudes de onda pueden variar dependiendo de la composición fotosensibilizadora usada en particular y la intensidad de la luz. Por ejemplo, si el fotosensibilizador es azul de metileno, entonces la longitud de onda varía preferentemente de aproximadamente 650 nm a 685 nm, más preferentemente de aproximadamente 660 nm a aproximadamente 680 nm, y lo más preferentemente de aproximadamente 665 nm a aproximadamente 675 nm.

30 La luz producida puede ser de una longitud de onda única o de longitudes de onda múltiples. La luz se puede producir mediante cualquier dispositivo de emisión de luz adecuado desvelado en la técnica tal como láseres, diodos emisores de luz ("LED"), fuentes incandescentes, fuentes fluorescentes, o similares. Es preferente que la luz se produzca mediante un láser o LED.

35 Dependiendo de la concentración del fotosensibilizador y de la potencia del dispositivo o dispositivos emisores de luz, la aplicación de luz al sitio de tratamiento puede necesitar solamente un corto período de tiempo tal como de aproximadamente 15 segundos a menos de aproximadamente 5 minutos, preferentemente de aproximadamente 15 segundos a aproximadamente dos minutos, más preferentemente durante aproximadamente 15 segundos a aproximadamente 90 segundos, y lo más preferentemente durante aproximadamente 30 segundos a 60 segundos.

40 Es preferente que la energía de la luz proporcionada durante cada ciclo de aplicación de luz varíe de aproximadamente 1 J/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 25 J/cm<sup>2</sup>, más preferentemente de aproximadamente 5 J/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 20 J/cm<sup>2</sup>, y lo más preferentemente de aproximadamente 6 J/cm<sup>2</sup> a aproximadamente 12 J/cm<sup>2</sup>.

45 Dependiendo de la naturaleza y de la extensión del MRSA localizado en el sitio de tratamiento, el médico puede aplicar ciclos múltiples de aplicaciones de luz (por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, etc.) al sitio de tratamiento dando como resultado por lo tanto una energía de luz acumulada total aplicada al sitio de tratamiento que puede ser básicamente superior a la de la energía de la luz proporcionada durante cada ciclo. De nuevo dependiendo de la naturaleza y de la extensión de los microbios localizados en el sitio de tratamiento, todo el procedimiento se puede repetir múltiples veces (por ejemplo,

de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, etc.) hasta que los efectos deseados se hayan alcanzado. Es preferente que las selecciones de la concentración de fotosensibilizador, longitud de onda, y/o energía de luz acumulada total aplicada al sitio de tratamiento permitan que el procedimiento de la presente invención se reduzca por encima de aproximadamente un 90%, más preferentemente por encima de un 95%, y lo más preferentemente por encima de un 99% del MRSA diana en el sitio de tratamiento. También es preferente que la aplicación de luz al sitio de tratamiento no cause daño fisiológico a los tejidos del huésped en y/o alrededor del sitio de tratamiento.

La composición fotosensibilizadora y el procedimiento de desinfección fotodinámica de la presente invención, que se ha analizado anteriormente, también se puede usar para reducir otros microbios relacionados con enfermedades tales como virus, hongos, y bacterias. Algunos ejemplos de dichos microbios incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ("*E. coli*"), *Enterococcus faecalis* ("*E. faecalis*"), *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus*, *Cándida*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter sp.*, y organismos patógenos Gram negativo que residen dentro de la cavidad oral (por ejemplo, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Tannerella*, *Actinobacillus*, *Selenomonas*, *Eikenella*, *Campylobacter*, *Wolinella*, etc.).

Las explicaciones y las ilustraciones presentadas en el presente documento tienen por objeto informar a otros expertos en la materia de la invención, sus principios, y su aplicación práctica. Los expertos en la materia pueden adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas, tal como pueda ser más adecuado para los requisitos de un uso en particular. En consecuencia, las realizaciones específicas de la presente invención, tal como se establece, no tienen por objeto ser exhaustivas o limitantes de la invención. El alcance de la invención se debería determinar, por lo tanto, no con referencia a la descripción anterior, sino que en su lugar se debería determinar con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con todo el alcance de los equivalentes a los que dichas reivindicaciones dan derecho. Las divulgaciones de todos los artículos y referencias, incluyendo solicitudes de patentes y publicaciones, se incorporan por referencia para todos los fines.

Los siguientes ejemplos proporcionados de acuerdo con la presente invención son solamente para fines ilustrativos y no pretenden ser exhaustivos o limitantes de la invención.

### Ejemplo I

Haciendo referencia a la Figura 1, se proporcionan los perfiles característicos de absorbancia de las tres composiciones siguientes: (a) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso en agua pura; (b) gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,5% v/v en agua pura; y (c) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,5% v/v en agua pura. La escala horizontal de la Figura 1 muestra la absorbancia por unidad de longitud (es decir, la densidad óptica). La escala vertical de la Figura 1 muestra la longitud de onda en nm. Las tres líneas (a, b, y c) en la Figura 1 representan los perfiles de absorbancia de estas tres composiciones. Los perfiles de absorbancia característicos que se muestran en la Figura 1 indican que la adición del gluconato de clorhexidina al 0,5% v/v a la composición de azul de metileno al 0,01% en peso no altera significativamente las características de absorbancia del azul de metileno en el intervalo de longitud de onda visible.

### Ejemplo II

Los experimentos in vitro se realizaron aplicando controles como se describe a continuación y varias combinaciones diferentes de composiciones de digluconato de clorhexidina y azul de metileno a cultivos planctónicos de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Metilina de ATCC® N° 33592™) a aproximadamente  $10^7$  UFC/ml. Como se muestra en la Figura 2, estas combinaciones consistían en los siguientes principios activos (a) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,001% v/v; (b) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,01% v/v; (c) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,125% v/v; (d) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,25% v/v; y (e) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso y gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,5% v/v. También se muestran en la Figura 2, las formulaciones de control consistían en (f) azul de metileno a una concentración de un 0,01% en peso solo; (g) gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,001% v/v solo; (h) gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,125% v/v solo; (i) gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,25% v/v solo; y (j) gluconato de clorhexidina a una concentración de un 0,5% v/v solo. Todos los cultivos de MRSA planctónicos que se han mencionado anteriormente se irradiaron mediante un láser de diodo no térmico con una potencia de salida de 220 mW a una longitud de onda de 670 nm durante 30 segundos (dosis de energía =  $10,3$  Joules/cm<sup>2</sup>).

Después de esto, se examinaron todos los cultivos de MRSA planctónicos y se recogieron los datos con respecto a las cantidades de las reducciones de MRSA planctónico. En la Figura 2, el número de composición, tal como se ha analizado anteriormente, se muestra en la columna "I"; la concentración de azul de metileno en cada uno de los cultivos se muestra en la columna "II"; la concentración de gluconato de clorhexidina en cada uno de los cultivos se muestra en la columna "III"; y la reducción en la viabilidad de MRSA planctónico (expresada como reducción de log<sub>10</sub> en el recuento de colonias viables frente al control sin tratar) para cada uno de los cultivos en comparación con un

cultivo de MRSA planctónico en agua purificada sin irradiación alguna ("Control") se muestra en la columna "IV". Las filas en la Figura 2 muestran el resultado de cada uno de los cultivos que se han analizado anteriormente. Como se muestra en la Figura 2, la reducción en la viabilidad de MRSA obtenida usando azul de metileno solo a una concentración de un 0,01% en peso (véase la fila "f") fue  $3,1 \log_{10}$  en comparación con el Control, mientras que las reducciones de la viabilidad de MRSA obtenidas después de la exposición a las composiciones solas de gluconato de clorhexidina (véanse las filas "g", "h", "i", y "j") fueron de 0 a  $2,7 \log_{10}$  (dependiendo de la concentración de gluconato de clorhexidina) en comparación con el Control. Los datos mostraron que la reducción en la viabilidad de MRSA obtenida después de la exposición a las composiciones combinadas de azul de metileno y de gluconato de clorhexidina en presencia de luz correspondían a un 100% de erradicación (reducción  $> 7,2 \log_{10}$ ) cuando la concentración de gluconato de clorhexidina era de un 0,25% v/v o de un 0,5% v.v. Cuando la concentración de gluconato de clorhexidina era de un 0,125% v/v, la reducción en la viabilidad de MRSA era  $> 99,999\%$  (reducción de  $5,7 \log_{10}$ ). A concentraciones de gluconato de clorhexidina de un 0,01% v/v o inferiores, las reducciones de MRSA eran equivalentes a las conseguidas usando azul de metileno iluminado solo, indicando que estas concentraciones de clorhexidina ya no estaban contribuyendo más a la eficacia antimicrobiana.

Los datos proporcionados en el Ejemplo II muestran que la combinación de gluconato de clorhexidina a baja concentración (por ejemplo, superior a un 0,01% v/v) con azul de metileno fotoactivado da como resultado un efecto antimicrobiano a corto plazo más potente de reducción de MRSA que usando azul de metileno fotoactivado solo. Se mostró que varias de las concentraciones de clorhexidina usadas en estos estudios tenían un efecto antimicrobiano mensurable de reducción de MRSA por sí mismas; sin embargo eran significativamente inferiores a las del procedimiento de desinfección fotodinámica de uso de la combinación a baja concentración de clorhexidina y azul de metileno.

### Ejemplo III

Los experimentos in vitro se realizaron aplicando un control de agua purificada o la siguiente Composición X a cultivos planctónicos de *S. aureus* (*Staphylococcus aureus* de ATCC® N° 25923™) de aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  CFU/ml. La Composición X contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. Los cultivos en agua purificada o la Composición X se dejaron en la oscuridad o se irradiaron usando un láser no térmico a 670 nm con una dosis de energía total de aproximadamente  $20,6 \text{ Joules/cm}^2$  (exposición de 60 segundos). Después de la exposición, todas las muestras se diluyeron y se sembraron en medios sólidos para observar el crecimiento posterior. La reducción en la viabilidad de *S. aureus* en cada condición experimental se comparó con una muestra de *S. aureus* planctónico en agua purificada que no recibió irradiación ("Control").

Los resultados mostraron eficacia antimicrobiana significativa frente a *S. aureus* después de la exposición a la Composición X irradiada. La Composición X irradiada consiguió una reducción de  $5,4 \log_{10}$  en la viabilidad de *S. aureus* en comparación con el Control. La exposición de la Composición X sin irradiar produjo poca reducción en la viabilidad de *S. aureus* planctónico, con aproximadamente una reducción de  $0,7 \log_{10}$  en comparación con el Control. Este resultado indica que, en ausencia de activación de luz de azul de metileno, la eficacia antimicrobiana de digluconato de clorhexidina al 0,25% después de una exposición de 60 segundos era insignificante. Además, las muestras en agua purificada que se irradiaron no mostraron reducción significativa en la viabilidad bacteriana en comparación con el Control que indicaba que el efecto de reducción no era debido a los efectos térmicos o de la luz a partir del tratamiento con láser solo. Estos resultados mostraron que la combinación de un fotosensibilizador (por ejemplo, una fenotiazina tal como azul de metileno) y digluconato de clorhexidina tenía un efecto sinérgico al proporcionar eficacia antimicrobiana significativamente potenciada cuando se usaba para desinfección fotodinámica.

### Ejemplo IV

Los experimentos in vitro se realizaron por exposición de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina de ATCC® N° 33592) de aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  UFC/ml a un control de agua purificada o de las siguientes composiciones. La Composición A contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. La composición B contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% en peso en agua purificada. La Composición C contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada.

Los inóculos bacterianos de MRSA expuestos a azul de metileno (Composiciones A y B) o a agua purificada se irradiaron usando un láser no térmico a 670 nm a una dosis de energía total de  $10,3 \text{ Joules/cm}^2$  (aproximadamente 30 segundos de exposición). Los inóculos expuestos a digluconato de clorhexidina solo (Composición C) no recibieron irradiación pero se dejaron solos durante 30 segundos antes de neutralización de la clorhexidina usando caldo de Dey-Engley. La solución de neutralización detiene la actividad antimicrobiana de la clorhexidina permitiendo de este modo el tratamiento y/o los tiempos de exposición equivalentes para ensayar el agente a través de todas las muestras experimentales.

Después de la exposición, todas las muestras se diluyeron y se sembraron en medios sólidos para observar el

crecimiento posterior. La reducción en la viabilidad de MRSA en cada condición experimental se comparó con una muestra de MRSA planctónico en agua purificada que no recibió irradiación ("Control").

Los resultados mostraron que la Composición A (azul de metileno y digluconato de clorhexidina) era el tratamiento más eficaz para la erradicación de MRSA. La exposición de esta composición con irradiación produjo una reducción de 7,3  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA (erradicación de un 100%) en comparación con el Control. La irradiación en presencia de la Composición B (azul de metileno) produjo una reducción de 4,8  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la Composición C (digluconato de clorhexidina) produjo niveles insignificantes de erradicación con una reducción de 0,4  $\log_{10}$  solamente en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. Las muestras en agua purificada que se irradiaron no mostraron reducción significativa en la viabilidad bacteriana en comparación con el Control indicando que el efecto de reducción no se debía a los efectos térmicos o de la luz a partir del tratamiento con láser solo. En resumen, la eficacia antibacteriana del tratamiento combinado de azul de metileno y digluconato de clorhexidina con radiación de luz fue significativamente mejor que en el que se usa digluconato de clorhexidina o azul de metileno irradiado solo. Esto indica un efecto de potenciación después de la combinación de estos dos agentes que crea una acción antibacteriana más potente de lo que se podría esperar por la simple adición de los efectos de reducción observados con cada uno por separado.

### Ejemplo V

Los experimentos in vitro se realizaron por exposición de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Metilina de ATCC® N° 33592) de aproximadamente  $10^7$  a  $10^8$  CFU/ml a un control de agua purificada o de las siguientes composiciones. La Composición D contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% p/v. La Composición E contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,125% v/v en agua purificada. La Composición F contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. La Composición G contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% p/v y digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,125% v/v en agua purificada. La Composición H contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% p/v y digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada.

Todas las muestras que contenían azul de metileno (Composiciones D, G y H) se irradiaron usando un láser no térmico a 670 nm con una dosis de energía total de 10,3 Joules/cm<sup>2</sup> (aproximadamente 30 segundos de exposición). Las muestras en agua purificada y digluconato de clorhexidina solo (Composiciones E y F) no recibieron irradiación pero se dejaron solas durante 30 segundos antes de neutralización usando caldo de Dey-Engley. Esta solución de neutralización detiene la actividad antimicrobiana de la clorhexidina, permitiendo de este modo el tratamiento y/o los tiempos de exposición equivalentes para ensayar el agente a través de todas las muestras experimentales.

Después de la exposición, todas las muestras se diluyeron y se sembraron en medios sólidos para observar el crecimiento posterior. La reducción en la viabilidad de MRSA en cada condición experimental se comparó con una muestra de MRSA planctónico en agua purificada que no recibió irradiación ("Control").

Los resultados mostraron que MRSA expuesto a la Composición D (azul de metileno) con irradiación experimentó una reducción de 4,8  $\log_{10}$  en la viabilidad en comparación con el Control. La exposición a las composiciones E y F (digluconato de clorhexidina) no produjo reducciones significativas en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la composición G (azul de metileno y digluconato de clorhexidina al 0,125%) con irradiación produjo una reducción de 3,8  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la composición H (azul de metileno y digluconato de clorhexidina al 0,25%) con irradiación produjo el efecto antibacteriano más elevado frente a MRSA, con una reducción de 7,3  $\log_{10}$  en la viabilidad (erradicación de un 100%) en comparación con el Control.

En base a los datos que se han descrito anteriormente, la eficacia antimicrobiana de las composiciones que contienen tanto azul de metileno como digluconato de clorhexidina fue significativamente mejor que la conseguida con cada agente por separado. Además, la reducción en la viabilidad de MRSA para el tratamiento combinado fue mayor que la eficacia combinada de los dos tratamientos individuales, indicando un efecto de potenciación. Estos datos sugieren un verdadero efecto de potenciación, en oposición a la simple acción aditiva de dos agentes antibacterianos diferentes, ya que la concentración de digluconato de clorhexidina ensayada sola no tuvo efecto en la viabilidad de MRSA después de una exposición de 30 segundos.

Como se muestra en el Ejemplo I, el perfil de absorbancia óptica nativa del azul de metileno no se ve alterada en presencia de digluconato de clorhexidina. Por lo tanto, es poco probable que los dos componentes complejados o que se hicieron reaccionar significativamente cambien la estructura de uno o del otro. Es más probable que, ya que se conoce que la clorhexidina actúa sobre la membrana externa de organismos Gram-positivos, bajas concentraciones que no son bactericidas por sí solas permeabilicen la bacteria al fotosensibilizador. Esto permitiría el aumento de la agregación en la membrana e intracelular de las moléculas de azul de metileno. La fuerte erradicación de MRSA conseguida por la combinación de azul de metileno con concentraciones subletales de clorhexidina sugiere que esto pueda ser una formulación prometedora para la desinfección fotodinámica de MRSA.

**Ejemplo VI**

Se realizó un estudio para determinar la eficacia de azul de metileno, digluconato de clorhexidina y combinaciones de los mismos para erradicar biopelículas de MRSA. Se cultivaron biopelículas en placas para cultivo de 96 pocillos de fondo plano mediante la siembra en cada pocillo con un inóculo de MRSA planctónico (*Staphylococcus aureus* resistente a Metilicina de ATCC® N° 33592) a aproximadamente  $10^8$  CFU/ml y se permitió el crecimiento durante 48 horas con agitación de 35 °C a 37 °C. Después de establecer las biopelículas bajo este protocolo, los medios líquidos se retiraron de los pocillos de ensayo y los pocillos se lavaron dos veces usando una solución salina tamponada con fosfato para retirar todos los organismos no asociados a biopelículas, planctónicos.

Se realizaron experimentos in vitro por aplicación de 200 µl de cada una de las siguientes composiciones a las biopelículas durante un periodo de aproximadamente 10 segundos. Un control de solución salina tamponada con fosfato. La Composición I que contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. La Composición J contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v en agua purificada. La Composición K contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. La Composición L contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,50% v/v en agua purificada. La Composición M contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,125% v/v en agua purificada. La Composición N contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,50% v/v en agua purificada. La Composición O contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,125% v/v en agua purificada.

Después de 10 segundos, todas las composiciones se retiraron de sus respectivos pocillos con biopelícula. Los pocillos con biopelícula tratados con azul de metileno (Composiciones I, J, N y O) se irradiaron con un láser de diodo no térmico a 670 nm con una dosis de energía total de aproximadamente 7 Joules/cm<sup>2</sup> (aproximadamente 20 segundos de exposición). Los pocillos con biopelícula que se expusieron a la composición de agua purificada o a una de las composiciones de digluconato de clorhexidina solas (Composiciones K, L y M) se dejaron solos en la oscuridad durante 20 segundos sin irradiación alguna. Inmediatamente después de los 20 segundos (con o sin irradiación), una solución neutralizante de caldo de Dey-Engley se añadió a todos los pocillos con biopelícula tanto en las condiciones del ensayo como en las del control. Una vez que todas las biopelículas se habían expuesto a la solución neutralizante, la placa de pocillos se transfirió a un ultrasonificador a un ajuste elevado durante 30 minutos. Después de la ultrasonificación, muestras líquidas de cada pocillo se sembraron en medios sólidos para permitir el crecimiento de organismos supervivientes. Posteriormente se realizaron recuentos de colonias de placas para determinar la erradicación de MRSA en comparación con el control sin irradiar de solución salina tamponada con fosfato ("Control").

Los resultados mostraron que la exposición a la Composición J (azul de metileno) con irradiación produjo una reducción de 2,4 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la composición L (digluconato de clorhexidina al 0,50% v/v) produjo una reducción de 1,3 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la composición K (digluconato de clorhexidina al 0,25% v/v) produjo una reducción de 1,1 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La exposición a la composición M (digluconato de clorhexidina al 0,125% v/v) produjo una reducción de 0,6 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. De este modo, para las composiciones de digluconato de clorhexidina solo (Composiciones L, K y M), los datos mostraron una eficacia antimicrobiana decreciente frente a las biopelículas de MRSA a medida que la concentración de digluconato de clorhexidina disminuía de un 0,5% v/v a un 0,125% v/v.

Los resultados después de la exposición a azul de metileno y digluconato de clorhexidina con irradiación fueron los que siguen a continuación. La composición I (azul de metileno y digluconato de clorhexidina al 0,25% v/v) produjeron una reducción de 4,2 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La composición M (azul de metileno y digluconato de clorhexidina al 0,50% v/v) produjeron una reducción de 4,5 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. La composición O (azul de metileno y digluconato de clorhexidina al 0,125% v/v) produjeron una reducción de 4,3 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. Estos resultados mostraron que las composiciones combinadas de azul de metileno con digluconato de clorhexidina (Composiciones I, N y O) produjeron una eficacia antimicrobiana superior en comparación con las composiciones que contenían azul de metileno solo o digluconato de clorhexidina solo. Además, las reducciones en la viabilidad conseguidas usando las composiciones de la combinación fueron, en cierto modo, mayores que el efecto antibacteriano aditivo de los componentes individuales, sugiriendo por lo tanto un efecto de potenciación. Además, la eficacia antimicrobiana para las composiciones combinadas de azul de metileno con digluconato de clorhexidina (Composiciones I, N y O) disminuyó solo ligeramente a medida que la concentración de digluconato de clorhexidina disminuía de un 0,5% v/v a un 0,125% v/v.

**Ejemplo VII**

Este estudio se diseñó para evaluar la eficacia antibacteriana de la desinfección fotodinámica, usando diversas



composiciones de fotosensibilizador, en cultivos de piel humana de espesor total colonizados sobre la superficie epitelial con altos niveles de MRSA.

5 Los viales de reserva de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina de ATCC® N° 33592) se mantuvieron congelados a - 80 °C antes de su uso. Después de la descongelación, los cultivos se sembraron en agar de soja triptico (Hardy Diagnostics ubicado en Santa Maria, CA) y se cultivaron a 37 °C hasta que las colonias fueron visibles. Éstas se subcultivaron para asegurar la fase de crecimiento y se usaron para crear inóculos de  $\sim 10^9$  CFU/ml para la colonización de superficies de piel.

10 El modelo de cultivo de piel humana usado para este estudio fue el Modelo de Piel de Espesor Completo EpiDerm FT™ (MatTek™ Corporation ubicada en Ashland, MA). Este producto consiste en queratinocitos epidémicos de origen humano y fibroblastos dérmicos de origen humano cultivados en una superficie de contacto de aire/medios para formar un modelo intacto, estratificado (epidermis y dermis) de piel humana epitelializada de espesor completo. Se ha mostrado que estas estructuras presentan marcadores de diferenciación, perfiles de lípidos, y estructura de la membrana basal característica de la situación *in vivo* y se han usado ampliamente para estudiar los efectos de agentes/tratamientos en piel humana. Las muestras de piel se recibieron en insertos de cultivo celular en placas de 6 pocillos a partir del fabricante, y se colocaron en cultivo a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%) durante 24 horas después del transporte para permitir el equilibrio antes de su uso. Un pequeño volumen (25 µl) de inóculos de MRSA, preparados como se ha descrito anteriormente, se pipeteó sobre la superficie apical de la muestra de cultivo, teniendo cuidado de no rebosar por los lados del inserto, y se incubaron durante una noche a 37 °C (CO<sub>2</sub> al 5%). Se usaron hisopos estériles con punta de algodón para muestrear las superficies del tejido inoculado cada 24 horas durante 5 días después de la inoculación para confirmar la colonización estable. Los datos mostraron que la inoculación de la superficie epitelial de los cultivos de piel humana con  $10^9$  CFU/ml de MRSA dieron como resultado una colonización estable de  $\sim 10^7$  UFC/ml (organismos recuperables después del muestreo de frotis) durante un período de 5 días.

25 Se realizaron experimentos mediante la aplicación de un control de agua purificada o de una de las siguientes composiciones a la superficie epitelial de estructuras de piel colonizadas con MRSA. Cada una de las muestras de estructuras de piel recibieron una alícuota de 50 µl de una de las siguientes composiciones: (i) un control de agua purificada ("Control"); (ii) la composición P contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada; (iii) la composición Q contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% en peso en agua purificada; y (iv) la composición R contenía el principio activo de digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada.

35 Después de la aplicación de agua purificada, la Composición P, la Composición Q o la Composición R, las estructuras de piel se colocaron directamente en un sistema de láser con fibra ópticamente acoplada a 670 nm, el cual estaba rematado con un conector de tipo SMA y se suspendió usando un pie/elemento de sujeción de laboratorio. El tejido de cada muestra se colocó a una distancia de 7 cm a partir del extremo terminal de la fuente de fibra óptica para producir una densidad de potencia en la superficie del tejido equivalente a la de la superficie de la punta difusora de luz MRSAid™ fabricada por Ondine Biopharma Corp. ubicada en Vancouver, B.C., Canadá (- 400 mW/cm<sup>2</sup>). Las muestras se irradiaron mediante un láser de diodo no térmico a 670 nm usando esta densidad de potencia durante aproximadamente 120 segundos (dosis total de energía = aproximadamente 48 Joules/cm<sup>2</sup>). Este procedimiento de irradiación era necesario ya que la punta difusora de luz MR-SAid™ en sí misma no se pudo colocar en el inserto de cultivo celular debido a incompatibilidades en tamaño y forma.

40 Después de 120 segundos, las muestras recibieron otra aplicación de 50 µl de su composición respectiva (es decir, agua purificada, la Composición P, la Composición Q, o la Composición R) y otra ronda de irradiación durante 120 segundos (dosis total de energía = aproximadamente 48 Joules/cm<sup>2</sup>) usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente. De este modo, las muestras recibieron una dosis total de energía de 96 Joules/cm<sup>2</sup> a partir de las dos rondas de irradiación.

50 Inmediatamente después de la segunda ronda de irradiación, se retiró el exceso de composición a partir de la superficie tratada de las muestras. Se usaron hisopos estériles con punta de algodón para muestrear la superficie del tejido, y éstos se neutralizaron para inhibir la acción del digluconato de clorhexidina usando una solución salina al 0,45% v/v que contenía tween-80 al 3% y lecitina al 0,75%. Los experimentos preliminares confirmaron que esta solución neutralizaba de forma eficaz cualquier digluconato de clorhexidina presente sobre el hisopo antes de la siembra para la evaluación de la viabilidad. Los hisopos se colocaron en medios líquidos de recuperación y las muestras se sembraron en medios sólidos para observar el crecimiento posterior. La reducción en la viabilidad de MRSA en cada condición experimental se comparó con una muestra de MRSA planctónico en agua purificada que no recibió irradiación ("Control")

55 La mitad de las estructuras de piel tratadas se muestreó inmediatamente después del tratamiento y la otra mitad se incubó durante 24 horas antes de la toma de muestras. Los datos a partir de las muestras tomadas inmediatamente después del tratamiento mostraron: (i) La exposición a la composición Q (azul de metileno) con irradiación dio como resultado una reducción de 0,2 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control; (ii) La exposición a la composición C (digluconato de clorhexidina) produjo una reducción de 1,1 log<sub>10</sub> en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control; y (iii) La exposición a la composición P (azul de metileno y digluconato de clorhexidina)

5 dio como resultado una reducción de 5,1  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control. Estos datos inmediatos del muestreo mostraron que la combinación de azul de metileno y digluconato de clorhexidina (Composición P) dio como resultado una reducción significativa y rápida en la viabilidad de MRSA cuando se irradió. En contraste, la aplicación de azul de metileno solo (Composición Q) o ligeramente solo (control irradiado con agua purificada) no dio como resultado reducciones significativas en la viabilidad en comparación con el Control inmediatamente después del tratamiento.

10 Los datos a partir de muestras tomadas 24 horas después del tratamiento mostraron: (i) La exposición a la composición Q (azul de metileno) era equivalente a la del Control inmediatamente después del tratamiento; (ii) La exposición a la composición R (digluconato de clorhexidina) produjo una reducción de 4,3  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control, la cual era significativamente mayor de la observada inmediatamente después del tratamiento; y (iii) La exposición a la composición P (azul de metileno y digluconato de clorhexidina) dio como resultado una reducción de 5,9  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el Control, lo que representaba la erradicación casi total de todo MRSA colonizado en esa superficie de tejido.

15 Estos resultados indican que la Composición P, que contiene tanto azul de metileno como digluconato de clorhexidina, era más eficaz en la reducción de la colonización de MRSA en superficies de piel que las composiciones del ingrediente individual tanto inmediatamente después de tratamiento como 24 horas después del tratamiento. La combinación de un fotosensibilizador (por ejemplo, una fenotiazina tal como azul de metileno) y digluconato de clorhexidina potenció el efecto de reducción en comparación con la suma del que se consigue con cualquiera de los agentes solos.

## 20 EJEMPLO VIII

25 Se realizó un segundo estudio usando el modelo de cultivo de piel que se ha descrito en el Ejemplo VII para determinar la supresión a largo plazo del crecimiento de MRSA. Un control de agua purificada o la Composición S que contenía los principios activos de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina a una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada se aplicaron a muestras de piel colonizadas con MRSA y se trataron usando la misma aplicación, irradiación, y protocolos y procedimientos de toma de muestras que se han descrito en el EJEMPLO VII. Se tomaron muestras de la superficie del hisopo a las 24 horas, 48 horas y 120 horas después del tratamiento. Debido a limitaciones en el número de muestras disponibles para el ensayo, las muestras de frotis no se tomaron inmediatamente después del tratamiento para este estudio.

30 A las 24 horas después del tratamiento, la exposición a la composición S con irradiación dio como resultado una reducción de 3,6  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con el control sin irradiar (agua purificada). A las 48 horas después del tratamiento y a las 120 horas después del tratamiento, la exposición a la composición S dio como resultado una erradicación total de MRSA. En los controles sin tratar correspondientes a esos puntos temporales, la viabilidad bacteriana permaneció en el intervalo de  $10^7 - 10^8$  UFC/ml. Esto mostró que la pérdida de viabilidad bacteriana en la condición del tratamiento no se debía a la pérdida natural de colonización o a la disminución en la viabilidad del tejido en los cultivos.

## 35 EJEMPLO IX

40 Un tercer estudio se realizó usando el modelo de cultivo de piel que se ha descrito en el Ejemplo VII para determinar la supresión a largo plazo del crecimiento de MRSA. Un control de agua purificada o una de las siguientes composiciones se aplicaron a muestras de piel y se trataron usando la misma aplicación, irradiación, y protocolos y procedimientos de toma de muestras que se han descrito en el EJEMPLO VII. La composición T contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v y digluconato de clorhexidina en una concentración de aproximadamente un 0,25% v/v en agua purificada. La composición U contenía el principio activo de azul de metileno a una concentración de aproximadamente un 0,01% v/v en agua purificada. Las muestras con el hisopo se tomaron (i) inmediatamente después del tratamiento de desinfección fotodinámica como se ha descrito en el EJEMPLO VII; (ii) a las 24 horas después del tratamiento; y (iii) a las 48 horas después de tratamiento.

45 Los resultados mostraron que para las muestras tomadas inmediatamente después del tratamiento, la exposición a la composición T (azul de metileno y digluconato de clorhexidina) con irradiación producía una reducción de 1,1  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con su control comparable sin irradiar. Para las muestras a las 24 horas después del tratamiento, la exposición a la composición T con irradiación produjo una reducción de 3,1  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con su control comparable sin irradiar. Para las muestras a las 48 horas después del tratamiento, la exposición a la composición T con irradiación produjo una reducción de 3,5  $\log_{10}$  en la viabilidad de MRSA en comparación con su control comparable sin irradiar.

50 Además, en los controles sin irradiar, los recuentos de MRSA colonizado aumentaron con el tiempo con recuentos de  $\log_{10}$  de (i) 6,8 para las muestras inmediatamente después del tratamiento; (ii) 7,8 para las muestras a las 24 horas después del tratamiento; y (iii) 8,4 para las muestras a las 48 horas después del tratamiento.

Finalmente, los resultados mostraron que la exposición a la composición U (azul de metileno) con irradiación no dieron como resultado una reducción significativa del MRSA en comparación con los controles sin irradiar en

cualquier punto temporal ensayado. Estos resultados mostraron que la combinación de un azul de metileno y digluconato de clorhexidina tenía un efecto de potenciación que proporcionaba una eficacia antimicrobiana significativamente potenciada; suprimiendo el crecimiento de MRSA durante un periodo de 48 horas.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición adecuada para reducir microbios que causan enfermedades que comprende:
  - 5 un fotosensibilizador;
  - digluconato de clorhexidina, siendo la concentración del digluconato de clorhexidina superior a un 0,01% e inferior a un 2% v/v; y
  - un vehículo farmacéuticamente aceptable;
  - estando destinada la composición a la desinfección fotodinámica de un sitio de tratamiento que contiene los microbios.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el fotosensibilizador es fenotiazina.
- 10 3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la que el fotosensibilizador es azul de metileno.
4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la concentración del digluconato de clorhexidina está entre un 0,125% v/v y un 1,5% v/v.
- 15 5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la concentración del digluconato de clorhexidina está entre un 0,125% v/v y un 1% v/v.
6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la concentración del fotosensibilizador no es superior a un 1% en peso.
7. Una composición para su uso en la reducción de enfermedades que causan MRSA que comprende:
  - 20 un fotosensibilizador;
  - digluconato de clorhexidina, siendo la concentración del digluconato de clorhexidina superior a un 0,01% e inferior a un 2% v/v; y
  - un vehículo farmacéuticamente aceptable;
  - usándose la composición para desinfección fotodinámica de un sitio de tratamiento que contiene MRSA.
8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el fotosensibilizador es fenotiazina.
- 25 9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el fotosensibilizador es azul de metileno.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el sitio de tratamiento es la cavidad nasal.
- 30 11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 en la que el sitio de tratamiento son los orificios nasales anteriores.
12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la que los microbios están seleccionados entre el grupo constituido por *Staphylococcus aureus* resistente a Metilicina, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus*, *Cándida*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus epidermidis*, *Acinetobacter sp.*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Husobacterium*, *Tannerella*, *Actinobacillus*, *Selenomonas*, *Eikenella*, *Campylobacter*, *Wolinella* y una combinación de los mismos.
- 35 13. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en la que el uso comprende aplicar la composición a un sitio de tratamiento que contiene MRSA y aplicar luz al sitio de tratamiento a una longitud de onda absorbida por la fenotiazina para reducir el MRSA en el sitio de tratamiento.
- 40 14. Uso de una composición fotosensibilizadora para la fabricación de un medicamento para reducir microbios que causan enfermedades, comprendiendo dicha composición:
  - un fotosensibilizador;
  - digluconato de clorhexidina, siendo la concentración del digluconato de clorhexidina superior a un 0,01% e inferior a un 2% v/v; y
  - un vehículo farmacéuticamente aceptable;
  - 45 en el que la composición se aplica al sitio de tratamiento y la luz se aplica a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que los microbios son *Staphylococcus aureus* resistentes a Metilicina.
16. Una composición que comprende:
  - 50 un fotosensibilizador;

clorhexidina; y  
un vehículo farmacéuticamente aceptable; composición que se usa para desinfección fotodinámica de un sitio de tratamiento que contiene MRSA; con la condición de que la composición no esté constituida por la composición I) o II) definida como:

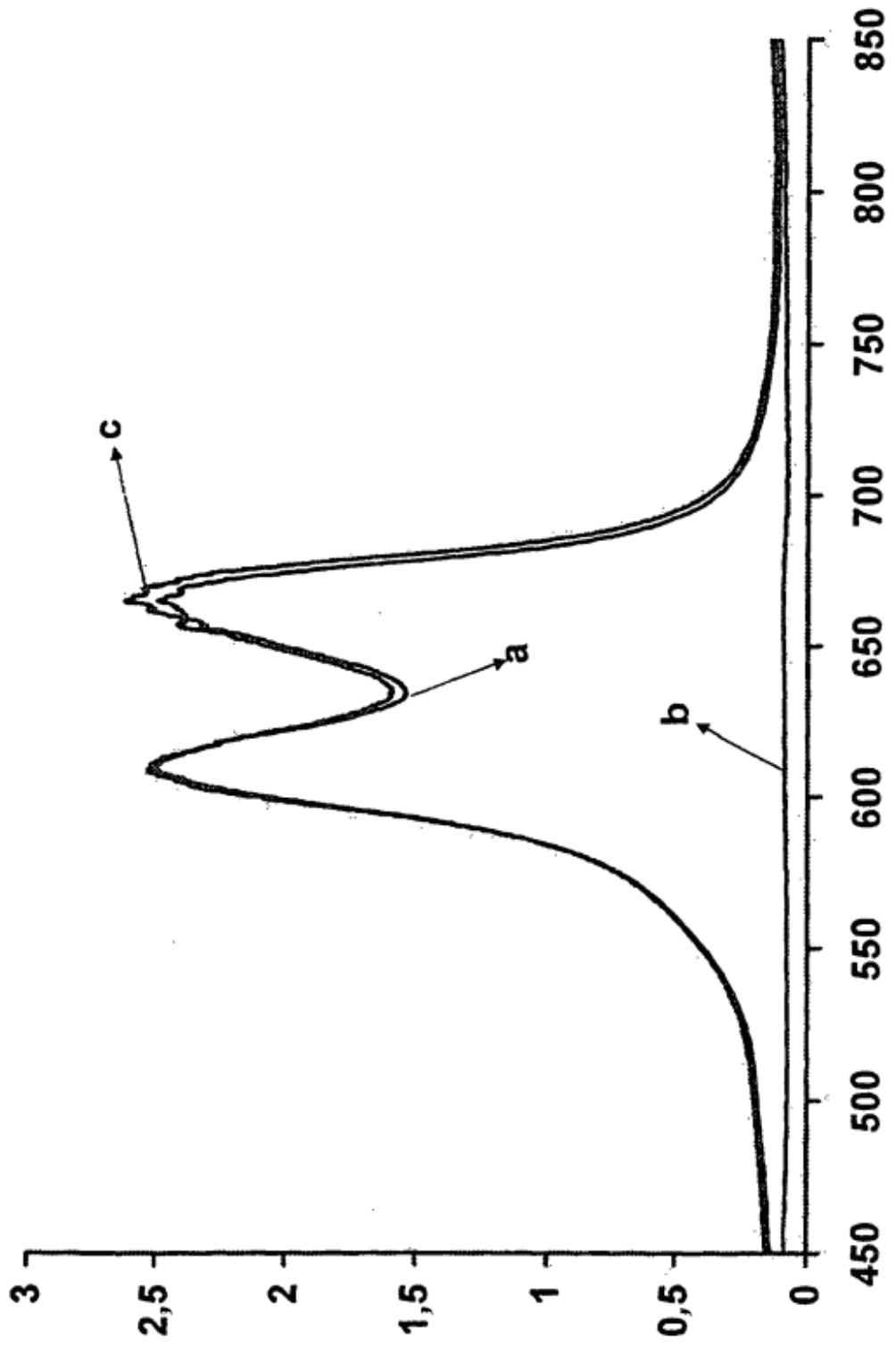
5 Composición I)

10 agua destilada en una cantidad de un 95,97%;  
un tensioactivo no iónico que es Tergitol 15-S-7 en una cantidad de un 0,20%;  
un alquil poliglucósido que es Triton CG-110 en una cantidad de un 0,55%;  
un fluorotensioactivo (2,56%) en una cantidad de un 1,10%;  
gluconato de clorhexidina en una cantidad de un 2,17%; y  
cloruro de azul de metileno (1%) en una cantidad de un 0,01%;

Composición ii)

15 agua destilada en una cantidad de un 97,99%;  
gluconato de clorhexidina en una cantidad de un 2,00%; y  
cloruro de azul de metileno (1%) en una cantidad de un 0,01%;

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16 que comprende azul de metileno, clorhexidina a un nivel de un 0,01 % e inferior a un 2% v/v; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.



**FIG.1**

<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>a</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.001%</b>	<b>2.2</b>
<b>b</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.01%</b>	<b>3.0</b>
<b>c</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.125%</b>	<b>5.7</b>
<b>d</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.25%</b>	<b>7.3</b>
<b>e</b>	<b>0.01%</b>	<b>0.5%</b>	<b>7.1</b>
<b>f</b>	<b>0.01%</b>		<b>3.1</b>
<b>g</b>		<b>0.001%</b>	<b>0.0</b>
<b>h</b>		<b>0.01%</b>	<b>1.9</b>
<b>i</b>		<b>0.125%</b>	<b>1.7</b>
<b>j</b>		<b>0.25%</b>	<b>0.4</b>
<b>k</b>		<b>0.5%</b>	<b>2.7</b>

**FIG. 2**