(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 429 571**

(51) Int. CI.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 31/28 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61L 15/00 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2007 E 07789107 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2054030**

(54) Título: **Antimicrobianos**

(30) Prioridad:

04.08.2006 US 821423 P
01.12.2006 US 868130 P
22.06.2007 GB 0712287

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2013

(73) Titular/es:

UCL BUSINESS PLC (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB

(72) Inventor/es:

WILSON, MICHAEL;
PARKIN, IVAN P.;
NAIR, SEAN y
GIL-TOMAS, JESUS

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Antimicrobianos

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso no terapéutico y terapéutico de mezclas que comprenden nanopartículas metálicas estabilizadas por carga específicas y fotosensibilizadores específicos como antimicrobianos activados por la luz.

Antecedentes de la invención

Los fotosensibilizadores, tales como azul de toluidina O, actúan como agentes antimicrobianos activados por la luz. Aunque pueden no tener actividad antimicrobiana a concentraciones bajas en la oscuridad, cuando se irradian con luz de una cierta longitud de onda (tal como 633 nm para azul de toluidina O) pueden destruir una amplia variedad de microbios. Se cree que la destrucción se debe al oxígeno singlete producido tras la irradiación del compuesto. Existe un interés considerable en aumentar la actividad de los fotosensibilizadores existentes. La presente invención se centra en un método para conseguirlo.

El documento US 2005/0058713 describe que la producción de oxígeno singlete mediante un fotosensibilizador (ftalocianina de zinc) se incrementa uniéndolo de manera covalente a nanopartículas de oro (véase también Duncan C. Hone, Peter I. Walker, Richard Evans-Gowing, Simon FitzGerald, Andrew Beeby, Isabelle Chambrier, Michael J. Cook, y David A. Russell. Langmuir 2002, 18, 2985-7). Sin embargo, se ha informado que este incremento de la generación de oxígeno singlete se debe, al menos en parte, a la presencia de bromuro de tetraoctilamonio, un reactivo usado en la preparación de ftalocianina-nanooro. Los autores concluyeron, por lo tanto, que el sistema de generación de oxígeno singlete fue, de hecho, un sistema de tres componentes que consiste en nanooro, la ftalocianina y el bromuro de tetraoctilamonio. Aunque se descubrió que la ftalocianina/nanooro/bromuro de tetraoctilamonio incrementaba la generación de oxígeno singlete, no se demostró que estas partículas fueran capaces de destruir células de mamífero o microbios.

Las suspensiones de nanopartículas son intrínsecamente inestables, y las nanopartículas tienden a asociarse o agruparse entre sí. Se usan dos métodos para contrarrestar esto. Uno es la estabilización por ligandos, que se emplea, por ejemplo, en el documento US 2005/0058713. El otro es la estabilización por carga.

Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, la mezcla simple de nanopartículas metálicas estabilizadas por carga con un fotosensibilizador da como resultado un incremento de la actividad antimicrobiana.

El documento US 2006/159732 se refiere a materiales de vendaje de heridas que contienen un colorante antioxidante y opcionalmente una sal de plata. El documento WO 2006/074117 se refiere a disoluciones de plata antimicrobianas. El documento WO 02/48432 se refiere a un método para el crecimiento de nanopartículas metálicas. El documento WO 03/037297 se refiere al auto-ensamblaje de un fotosensibilizador sobre una nanopartícula. El documento US 2002/0103517 se refiere al uso de nanopartículas para inducir una hipertermia localizada o para el diagnóstico por imagen localizado.

Sumario de la invención

En un aspecto de la invención se proporciona el uso no terapéutico de una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en el que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6; verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, como antimicrobiano activado por la luz.

En otro aspecto se proporciona una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en la que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6; verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, para el uso como un antimicrobiano activado por la luz en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en la que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6; verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, y en la que la mezcla está en forma de una disolución, una suspensión en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, un gel, una pomada o una crema, o en la que la mezcla está dentro de un material plástico.

La fotodesinfección puede satisfacer la necesidad de tratar las infecciones y descolonizar los microbios que habitan en las cavidades corporales sin el uso de antibióticos.

El término "nanopartículas" se entiende que significa en general partículas que tienen un diámetro de 1 a 100 nm.

Preferiblemente, las nanopartículas usadas en la presente invención tienen un diámetro de 1 a 30 nm. En una realización, las nanopartículas tienen preferiblemente un diámetro de 2 a 5 nm. En otra realización, las nanopartículas tienen preferiblemente un diámetro de 10 a 25 nm, más preferiblemente 15 a 20 nm.

Las nanopartículas, en general, pero no exclusivamente, comprenden metales. También pueden comprender aleaciones de dos o más metales, o estructuras más complejas tales como partículas núcleo-cubierta, varillas, estrellas, esferas o láminas. Una partícula núcleo-cubierta puede comprender en general un núcleo de una sustancia, tal como un metal u óxido de metal o sílice, rodeado por una cubierta de otra sustancia, tal como un metal, óxido de metal o seleniuro de metal. El término "metálico", tal como se usa en la presente memoria, pretende abarcar todas las estructuras que tienen una superficie externa metálica.

Las nanopartículas metálicas son nanopartículas de oro, plata o cobre, o aleaciones de dos o más de estos metales. Lo más preferiblemente, las nanopartículas son nanopartículas de oro.

Un fotosensibilizador es un compuesto que se puede excitar mediante luz de una longitud de onda específica. Así, dicho compuesto puede tener una banda de absorción en la porción ultravioleta, visible o infrarroja del espectro electromagnético y, cuando el compuesto absorbe radiación dentro de esa banda, genera especies citotóxicas, por lo que ejerce un efecto antimicrobiano. El efecto se puede deber a la creación de oxígeno singlete, pero la invención no se limita a los fotosensibilizadores que exhiben efectos antimicrobianos por medio de la creación de oxígeno singlete.

Sin desear limitarse por la teoría, se cree que el fotosensibilizador y las nanopartículas se asocian por medio de enlaces covalentes coordinados, en los que los electrones son proporcionados, por ejemplo, por los restos de S o N del fotosensibilizador.

El fotosensibilizador es atóxico para seres humanos y animales a las concentraciones empleadas en la presente invención. El fotosensibilizador muestra actividad antimicrobiana cuando se expone a la luz visible.

El fotosensibilizador se elige de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6, verde de indocianina o sulfato de azul Nilo. Más preferiblemente, el fotosensibilizador es azul de toluidina O, azul de metileno o cloruro de estaño e6. Lo más preferiblemente, el fotosensibilizador es azul de metileno o azul de toluidina O.

En una realización especialmente preferida, la mezcla comprende nanopartículas de oro y azul de metileno o azul de toluidina O.

A. Proceso para la Preparación de las Mezclas

En una realización, las mezclas de la presente invención están en forma de una disolución. Tal disolución se puede producir poniendo en contacto una disolución de nanopartículas metálicas estabilizadas por carga con una disolución de fotosensibilizador. Las mezclas se ponen en contacto a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre el punto de congelación y el punto de ebullición del disolvente empleado (o a una temperatura a la que ambas disoluciones son líquidas si se emplean disolventes diferentes). Sin embargo, si la temperatura es demasiado elevada, la disolución de nanopartículas se puede hacer inestable. Se prefiere que la disolución de nanopartículas permanezca en un estado estable. En una realización, las disoluciones se ponen en contacto a, o alrededor de, la temperatura ambiente.

En una realización, se mezcla una disolución de nanopartículas metálicas con una disolución de fotosensibilizador y se deja reposar a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos, preferiblemente entre 10 minutos y 1 hora, más preferiblemente entre 15 y 20 minutos.

En general, la disolución de nanopartículas metálicas y/o la disolución de fotosensibilizador es una disolución en un disolvente polar, preferiblemente una disolución acuosa, tal como en agua o solución salina tamponada con fosfato, en particular en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable. Más preferiblemente, las disoluciones de nanopartículas y de fotosensibilizador son acuosas.

El pH de las disoluciones pueden ser tal que no sea necesario ningún ajuste tras la mezcla, o el pH de la mezcla se puede controlar mediante el uso de un tampón adecuado. Por ejemplo, cuando la mezcla se va a aplicar al cuerpo, el pH de la mezcla no debería estar fuera del intervalo de pH fisiológico para el lugar. El intervalo de pH fisiológico depende del lugar en cuestión, p.ej., la piel intacta puede tener un pH tan bajo como 4,2.

Las dos disoluciones se pueden mezclar en cualquier proporción, de forma que se alcance la concentración deseada en la disolución mezclada. En una realización, las concentraciones iniciales de cada disolución se seleccionan según sea necesario, de forma que se alcance la concentración deseada en la disolución mezclada cuando se mezclen volúmenes iguales de la disolución de nanopartículas metálicas y de la disolución de fotosensibilizador.

La concentración deseada de las nanopartículas en la mezcla depende de la concentración final deseada en el lugar a tratar. Esto puede variar, y una elección adecuada depende del tamaño de la nanopartícula y de la concentración de la disolución de fotosensibilizador. La concentración final de las nanopartículas en la mezcla es preferiblemente

de 1 x 10^{11} a 5 x 10^{15} partículas/ml, más preferiblemente de 3 x 10^{11} a 1 x 10^{15} partículas/ml. Para obtener tal concentración final, la concentración inicial de la disolución de nanopartículas es en general de 1 x 10^{12} a 1 x 10^{16} partículas/ml. Si la disolución de nanopartículas tal como se prepara, o como se obtiene comercialmente, es de una concentración mayor que esta, puede ser necesario diluir la disolución de nanopartículas antes de mezclarla con el fotosensibilizador. Por ejemplo, una disolución de nanopartículas original que contiene 1 x 10^{14} o 1 x 10^{15} partículas/ml se puede diluir 1:10 a 1:100, de forma que la concentración antes de mezclarla con la disolución de fotosensibilizador es de 1 x 10^{12} a 1 x 10^{14}.

La concentración inicial de la disolución de fotosensibilizador se elige preferiblemente de forma que cuando se mezcla con la disolución de nanopartículas, la concentración final del fotosensibilizador en el lugar de tratamiento es de 5 a 100 µM, más preferiblemente de 20 a 50 µM.

Se debería indicar que la concentración final en el lugar de tratamiento puede no corresponder necesariamente a la concentración en la disolución mezclada. Por ejemplo, en el tratamiento de bolsas periodontales y heridas, el lugar de tratamiento puede estar inundado con líquido corporal, tal como saliva o sangre. En tales casos, puede ser necesario, por tanto, aplicar la mezcla nanopartículas-fotosensibilizador a una concentración mayor para alcanzar una concentración eficaz tras la dilución con el líquido corporal.

B. Efecto Antimicrobiano de las Mezclas

Las mezclas de la presente invención tienen un efecto antimicrobiano, es decir, son capaces de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos, que incluyen bacterias, virus, hongos y priones, que pueden provocar enfermedades en seres humanos, animales o plantas. En una realización, las mezclas de la presente invención se usan para destruir o inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus*, como se usa en esta solicitud, también incluye *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina ("SARM"). Las mezclas de la presente invención se pueden usar también para destruir o inhibir el crecimiento de *Propionibacterium acnes.*

En otra realización, las mezclas de la presente invención se usan para destruir o prevenir el crecimiento de los microbios implicados en enfermedades orales, tales como enfermedad periodontal inflamatoria y caries, o en infecciones de heridas y en la desinfección o esterilización de heridas y otras lesiones de la cavidad oral. Así, las mezclas de la presente invención se pueden usar para destruir o inhibir el crecimiento de *Streptococcus sanguis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* y lactobacilos.

El efecto antimicrobiano de las mezclas se activa mediante la exposición a una fuente de luz. En una realización, la mezcla se puede exponer a una fuente de luz que comprende radiación que tiene una longitud de onda, o un intervalo de longitudes de onda, en el intervalo de longitudes de onda absorbido por el fotosensibilizador, preferiblemente cerca o que corresponde a la longitud de onda de absorción máxima del fotosensibilizador (λ_{max}). Como se describió anteriormente, se prefiere que el fotosensibilizador muestre actividad antimicrobiana cuando se expone a la luz visible, es decir, la λ_{max} está entre 380 y 780 nm. Por ejemplo, el azul de toluidina O muestra actividad antimicrobiana cuando se irradia con luz que tiene una longitud de onda de 633 nm.

En general, se puede usar cualquier fuente de luz que emita luz de una longitud de onda adecuada. La fuente de luz puede ser cualquier dispositivo o sistema biológico capaz de generar luz monocromática o policromática, luz coherente o incoherente, en especial luz blanca visible. Los ejemplos incluyen una fuente de luz fluorescente, láser, diodo emisor de luz, lámpara de arco, lámpara halógena, lámpara incandescente o un emisor de bioluminiscencia o quimioluminiscencia. En ciertas circunstancias, puede ser adecuada la luz solar. Preferiblemente, la longitud de onda de la luz emitida por la fuente de luz puede ser de 200 a 1060 nm, preferiblemente de 380 a 780 nm. Un láser adecuado puede tener una potencia de 1 a 100 W. Otros láseres adecuados pueden tener una potencia de 1 a 1000 mW y un diámetro del haz de 1 a 10 mm. La dosis de luz para la irradiación por láser es de manera adecuada de 5 a 333 J cm^{-2}, preferiblemente de 5 a 30 J cm^{-2} para la luz láser. Para la irradiación con luz blanca, una dosis adecuada es de 0,01 a 100 J/cm^2, preferiblemente de 0,1 a 20 J/cm^2, más preferiblemente de 3 a 10 J/cm^2. En una realización preferida, la mezcla se puede irradiar de manera adecuada mediante el uso de una fuente de luz blanca.

Sin limitaciones, lo siguiente son ejemplos de las fuentes de luz y sus longitudes de onda y/o potencias de salida ejemplares respectivas que pueden ser adecuadas para el uso en la presente invención:

Láser de gas helio-neón (HeNe) (p.ej. 633 nm)

Láser de colorante con bombeo de argón (p.ej. 500-700 nm, salida de 5 W)

Láser de colorante con bombeo de vapor de cobre (p.ej. 600-800 nm)

Láser de colorante con bombeo de excímero (p.ej. 400-700 nm)

Láser de vapor de oro (p.ej. 628 nm, salida de 10 W)

Láser de estado de sólido ajustable (p.ej. 532-1060 nm), que incluye Sd:YAG

Diodo emisor de luz (LED) (p.ej. 400-800 nm)

Láser de diodo (p.ej. 630-850 nm, salida de 25 W), p.ej. arseniuro de galio selenio

Lámpara de filamento de tungsteno

Fuente de luz fría halógena

Lámpara fluorescente (p.ej. 10 a 30 W)

La presente invención no se limita a los ejemplos anteriormente mencionados de fuentes de luz, longitudes de onda ejemplares y/o potencias de salida. Es completamente posible llevar a cabo la presente invención mediante el uso de otras fuentes de luz y/o las fuentes de luz anteriormente mencionadas con longitudes de onda y/o potencias de salida diferentes.

La duración de la exposición a la fuente de luz debería ser lo suficientemente larga como para asegurar una destrucción suficiente. Esto puede variar dependiendo de la elección del fotosensibilizador y de la fuente de luz. Por ejemplo, el azul de toluidina O puede necesitar una exposición durante entre 10 y 30 minutos para asegurar una destrucción eficaz de microbios mediante el uso de una lámpara fluorescente de 15 a 30 W, pero solamente 20 a 60 segundos mediante el uso de una fuente de luz blanca con fibra óptica. Otros fotosensibilizadores, tales como cloruro de estaño e6, pueden necesitar 10 a 30 minutos con una fuente de luz blanca con fibra óptica. En una realización, la duración de la irradiación es de manera adecuada de un segundo a 15 minutos, preferiblemente de 1 a 5 minutos. En otra realización, por ejemplo cuando la fuente de luz es de baja intensidad, tal como la exposición a la luz solar natural, la mezcla se expone a la fuente de luz durante un periodo de tiempo más largo, tal como durante varias horas, por ejemplo de 1 a 12 horas.

La luz se puede suministrar a la mezcla mediante exposición ambiental, o, si necesario o conveniente, mediante el uso de un medio dirigido tal como una fuente de luz con fibra óptica u otros dispositivos ópticos conocidos.

La eficacia de las mezclas como antimicrobianos depende de muchos factores. La elección del tipo de nanopartículas, la elección del fotosensibilizador, el tamaño de las nanopartículas, la concentración de las nanopartículas y la concentración del fotosensibilizador pueden influir en la actividad antimicrobiana. Así, las combinaciones individuales pueden tener efectos especialmente ventajosos. Por ejemplo y sin limitaciones, se ha descubierto que las siguientes combinaciones son especialmente eficaces contra *Staphylococcus aureus*:

- nanopartículas de oro de 2 nm de diámetro a una concentración de 4×10^{13} partículas/ml con azul de toluidina O a una concentración de 20 µM.

- nanopartículas de oro de 15 nm de diámetro a una concentración de 1×10^{14} a 1×10^{15} partículas/ml con azul de toluidina O a una concentración de 20 a 50 µM.

- nanopartículas de oro de 2 nm de diámetro a una concentración de 4×10^{11} a 4×10^{13} partículas/ml con azul de metileno a una concentración de 20 µM.

- nanopartículas de oro de 15 nm de diámetro a una concentración de 1×10^{13} a 1×10^{15} partículas/ml con azul de metileno a una concentración de 20 µM.

- nanopartículas de oro de 2 nm de diámetro a una concentración de 4×10^{11} partículas/ml con cloruro de estaño e6 a una concentración de 20 µg/ml.

- nanopartículas de oro de 2 nm a una concentración de 4×10^{13} partículas/ml con sulfato de azul Nilo a una concentración de 20 a 50 µM.

C. Aplicaciones de las Mezclas

Las propiedades antimicrobianas de las mezclas de la presente invención pueden tener aplicación en hospitales y otros lugares en los que es necesaria la limpieza microbiológica, por ejemplo instalaciones de procesamiento de alimentos, comedores o zonas de juego. También se prevé el uso en mataderos. Las mezclas se pueden aplicar a cualquier superficie adecuada para esterilizarla, por ejemplo superficies de trabajo, lavabos, inodoros, baldosas, picaportes de puertas o teclados de ordenador. En otra realización, la mezcla se puede aplicar a películas adherentes u otras películas o envases, tales como envases de alimentos, por ejemplo pulverizando o pintando una disolución de la mezcla sobre la película. Tal material de tipo película adherente se podría usar para envolver o cubrir instrumentos médicos/dentales, dispositivos de entrada informáticos, superficies, etc.

Las mezclas se pueden aplicar en forma de un revestimiento mediante pintura, extensión o pulverización, y se pueden secar o dejar secar de manera natural. También se pueden mezclar con un material plástico tal como acetato de celulosa para crear un plástico antimicrobiano. Tal material plástico se podría usar para fabricar artículos, tales como dispositivos de entrada informáticos, o cubiertas antimicrobianas para envolver o revestir la superficie del artículo a tratar. Así, en una realización, se podría revestir un artículo tal como un dispositivo de entrada informático

con una mezcla de acetato de celulosa, fotosensibilizador y nanopartículas.

En otra realización, las propiedades antimicrobianas de las mezclas de la presente invención pueden tener aplicación en la destrucción de los microbios implicados en enfermedades orales, como se mencionó anteriormente. Las mezclas de la presente invención también pueden tener uso en la destrucción o prevención del crecimiento de microbios en diversas cavidades corporales. La cavidad corporal puede significar cualquier cavidad del interior de un cuerpo, tal como la boca o cavidad oral, nariz, oído, vagina, pulmón, el tracto digestivo completo (p.ej., garganta, esófago, estómago, intestino, recto, etc.), vesícula biliar, vejiga, cualquier herida abierta o similares. La cavidad corporal puede estar en el interior de un cuerpo humano o de un cuerpo de otro animal.

Las mezclas de la presente invención se pueden aplicar también de manera tópica, por ejemplo en la piel, heridas o una superficie mucosa, para destruir o prevenir el crecimiento de microbios. Como ejemplo adicional, las mezclas de la presente invención pueden tener aplicación en la destrucción o prevención del crecimiento de hongos, por ejemplo en infecciones del lecho ungueal.

Para tales aplicaciones, la mezcla está de manera adecuada en forma de una disolución o una suspensión en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, pero puede estar en forma de un sólido tal como un polvo o un gel, una pomada o una crema. La composición se puede aplicar en el área infectada mediante pintura, extensión, pulverización, inyección o cualquier otra técnica convencional.

La presente invención también proporciona el uso de una mezcla de la presente invención en la fabricación de un medicamento para la destrucción o prevención del crecimiento de microbios, y un método para la desinfección o esterilización de un lugar en un sujeto, y el método comprende la administración en dicho lugar de una cantidad eficaz de una mezcla de la presente invención, seguido por la exposición de dicho lugar a una fuente de luz.

En un aspecto preferido, la invención proporciona el uso de una mezcla de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el uso en la desinfección o esterilización de tejidos de una cavidad corporal o una herida o lesión en una cavidad corporal (a) poniendo en contacto los tejidos, la herida o la lesión con la mezcla y (b) irradiando los tejidos, la herida o la lesión con luz a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador.

La herida o lesión tratada puede ser cualquier herida quirúrgica o inducida por un traumatismo, una lesión provocada por un microbio relacionado con una enfermedad, o una herida o lesión infectada con tal microbio. El tratamiento se puede aplicar para desinfectar o esterilizar una herida o lesión como precaución rutinaria contra la infección o como un tratamiento específico de una infección ya diagnosticada de una herida o lesión. En una realización, la cavidad corporal es la cavidad oral. Las mezclas de la presente invención se pueden usar también en otras cavidades corporales, tales como la nariz, recto, vagina, etc.

En otro aspecto preferido, la invención proporciona el uso de una mezcla de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el uso en la destrucción o prevención del crecimiento de microbios relacionados con una enfermedad en una cavidad corporal, tal como la cavidad oral, nariz, recto, vagina, etc. (a) poniendo en contacto los microbios con la mezcla y (b) irradiando los microbios con luz a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador.

Cuando la cavidad corporal es la cavidad oral, el tratamiento con la mezcla y la irradiación se aplican preferiblemente para (i) la destrucción de microbios relacionados con una enfermedad en una bolsa periodontal para tratar la periodontitis crónica; (ii) la destrucción de microbios relacionados con una enfermedad en la región entre el diente y la encía (surco gingival o margen gingival) para tratar o prevenir enfermedades periodontales inflamatorias, que incluyen periodontitis crónica, gingivitis y similares; (iii) la desinfección o esterilización de lesiones cariadas taladradas antes del relleno; (iv) la destrucción de microbios cariogénicos en una superficie dental para prevenir la caries dental; (v) la desinfección o esterilización de tejidos dentales y/o gingivales en otros procedimientos quirúrgicos dentales y (vi) el tratamiento de candidiasis oral en pacientes de SIDA, pacientes inmunodeprimidos o pacientes con estomatitis protésica.

Para las aplicaciones anteriores, la mezcla se usa de manera adecuada en forma de una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas y el fotosensibilizador en disolución en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más ingredientes secundarios seleccionados de tampones, sales para ajustar la tonicidad de la disolución, antioxidantes, conservantes, agentes gelificantes y agentes de remineralización.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la destrucción o prevención del crecimiento de microbios, que comprende la puesta en contacto con una mezcla según la presente invención, seguido de la exposición a una fuente de luz durante una cantidad de tiempo suficiente para destruir o prevenir el crecimiento de microbios. Como se describió anteriormente, la mezcla está a una concentración adecuada de forma que se alcanza un nivel deseado de actividad antimicrobiana en el sitio de tratamiento. Así, se prefieren las "concentraciones finales", como se describió anteriormente. Para la aplicación a superficies, la mezcla se puede aplicar directamente mediante cualquier medio adecuado, tal como un paño, pulverizador o lavado. Para aplicaciones orales o tópicas, se puede usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, es decir, pintura, extensión, pulverización, inyección o cualquier otra técnica convencional, para poner en contacto la mezcla con los microbios.

La mezcla se puede dejar en contacto con los microbios durante un periodo de tiempo. Esta duración del tiempo puede variar dependiendo del fotosensibilizador particular usado y de los microbios objetivo a destruir. Por ejemplo, puede ser de 1 segundo a 10 minutos. En una realización, la duración del tiempo es de 10 segundos a 2 minutos. En otra realización, la duración del tiempo es de alrededor de 30 segundos.

En un aspecto, la presente invención no se amplía al uso de las mezclas en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, o en métodos de diagnóstico llevados a cabo en el cuerpo humano o animal.

III. Ejemplos

Por favor obsérvese que estos ejemplos tienen fines de ilustración solamente, y no se deben considerar limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Se mezclaron nanopartículas de oro (2,0 nm de diámetro; British Biocell International) en agua (15×10^{13} partículas por ml) con un volumen igual de una disolución acuosa de azul de toluidina O (40 µM) y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 100 ul de la disolución de oro-AT a 100 µl de una suspensión de *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y esto se irradió con luz blanca de una lámpara blanca fluorescente durante 10 minutos. Los controles consistieron en:

(i) AT (concentración final = 10 µM) y bacterias, irradiadas durante el mismo periodo de tiempo,

(ii) nanooro (diluido 1:1 con agua) y bacterias, irradiadas durante el mismo periodo de tiempo,

(iii) bacterias sin AT ni nanooro, sin irradiar ("control").

Tras la irradiación, se determinó el número de bacterias supervivientes mediante un recuento de células viables. Los resultados de los experimentos (llevados a cabo dos veces con recuentos duplicados en cada ocasión) se muestran en la Tabla 1. Las nanopartículas de oro solas, cuando se irradiaron, no consiguieron una destrucción significativa de las bacterias. El AT-oro consiguió aproximadamente una destrucción mayor de una unidad logarítmica que el AT solo, 99,3 % de destrucción en vez de una destrucción del 93,7 %. Obsérvese que la concentración de AT y la dosis de energía luminosa usada se diseñaron para proporcionar destrucciones sub-óptimas de manera que se pudieran distinguir las diferencias de eficacia del AT y del AT-nanooro. Los experimentos preliminares mediante el uso de exposición a luz de 30 minutos consiguieron la destrucción total de las suspensiones bacterianas en ambos casos.

Tabla 1

Muestra[1]	*S. aureus* (ufc/ml)	% de Destrucción
Control	135000000	
Oro solamente	81000000	40,0
AT solamente	8570000	93,7
Mezcla (L+AT+O+)	983000	99,3
[1] Las muestras se irradiaron con luz de una lámpara blanca fluorescente de 28 W. La solicitud de EE.UU. número 60/821.423 menciona una lámpara de 18 W.		

Ejemplo 2

Producción de nanopartículas de oro solubles en agua

Se disolvió $HAuCl_4.3H_2O$ (42 mg, 0,11 mmol) en agua desionizada (25 ml) para formar una disolución A (~5 mM). Se disolvió $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ (125 mg, 0,43 mmol) en agua desionizada (25 ml) para proporcionar una disolución B (~20 mM). La disolución A (1 ml) se agitó con agua desionizada (18 ml) y se hizo hervir durante 2 min. Después se añadió la disolución B (1 ml) gota a gota a lo largo de un periodo de aproximadamente 50 seg, lo que provocó el cambio de color de transparente a azul a rosa/púrpura. Después de 1 min más de calentamiento, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se usaron dos lotes de nanopartículas de oro para los ensayos antibacterianos posteriores, denominados NN1 y NN2. El espectro de absorción de NN2 demostró que la longitud de onda de absorción máxima, λ_{max}, fue 527 nm. El lote NN1 tuvo una λ_{max} de 522 nm. El análisis del tamaño de las partículas (posición de la banda de absorción del plasmón UV medida mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión) del lote NN1

proporcionó un diámetro medio de 14,76 ± 2,34 nm.

Efecto de la concentración del fotosensibilizador

Se mezclaron nanopartículas de oro de aproximadamente 15 nm de diámetro (lotes NN1 y NN2 anteriores) con un volumen igual de azul de toluidina O (AT) acuoso y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se usó AT a una concentración final de 1, 5, 10, 20 ó 50 µM. Se añadieron 100 µl de la mezcla AT-oro a 100 µl de una suspensión de *Staphylococcus aureus* NCTC 6571 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (ajustada a una densidad óptica de 0,05), y las muestras se irradiaron con una luz blanca fluorescente (28 W) durante 10 minutos. Se usó *S. aureus* + AT solamente, y *S. aureus* + PBS, sin fotosensibilizador o nanooro como controles. La concentración final de nanooro usada fue 1 x 10^{15} partículas/ml. Tras la irradiación, se enumeró la cantidad de bacterias supervivientes mediante el recuento de células viables. Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante.

En el caso del nanooro de 15 nm, hubo poco incremento de la fotosensibilización letal (en comparación con la conseguida cuando se usó AT en ausencia de nanooro) cuando la concentración de AT fue 1 µM, mientras el incremento fue evidente mediante el uso de concentraciones mayores de AT de 5, 10 y 20 µM. El incremento fue mayor con el uso de AT 10 y 20 µM. El incremento parece depender de la proporción del AT respecto del nanooro. Hubo poco incremento de la fotosensibilización letal cuando la concentración de AT fue 10 ó 100 µM, mientras el incremento fue mayor con el uso de concentraciones de AT de 20 y 50 µM.

Ejemplo 3

El método del Ejemplo 2 se repitió mediante el uso de nanopartículas de oro de 2 nm de diámetro (British Biocell International). La concentración final de nanooro usada fue 4 x 10^{13} partículas/ml. AT se usó a una concentración final de 10, 20 ó 50 µM. Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. Cuando se usaron las partículas de nanooro de 2 nm, el incremento de la fotosensibilización letal fue evidente con el uso de AT 20 µM, pero no cuando se usó AT 10 µM o 50 µM.

Ejemplo 4

Efecto de la concentración de nanopartículas de oro

Los experimentos se llevaron a cabo como para el Ejemplo 3, con las siguientes modificaciones. Antes de mezclarlas con el fotosensibilizador, las nanopartículas de oro se dejaron sin diluir, o diluidas 1 en 10 ó 1 en 100 en agua destilada estéril. Las nanopartículas se añadieron después a AT (concentración final 20 µM). Las muestras se iluminaron después durante 30 segundos mediante el uso de una fuente de luz blanca con fibra óptica (Schott KL200). Las bacterias supervivientes se enumeraron mediante recuento de células viables como se mencionó anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. Cuando las nanopartículas se diluyeron 1 en 10, se alcanzó un incremento mayor en comparación con el obtenido mediante el uso de nanooro sin diluir.

Ejemplo 5

El Ejemplo 4 se repitió mediante el uso de azul de metileno (AM; 20 µM) como fotosensibilizador. Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. El incremento alcanzado mediante el nanooro con un tamaño de partícula mayor (15 nm) no se incrementó cuando disminuyó la concentración de nanooro

Ejemplo 6

El Ejemplo 5 se repitió mediante el uso de nanopartículas de oro de 2 nm (British Biocell International). Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. La dilución de las nanopartículas de oro de 2 nm incrementó la destrucción de *S. aureus* ligeramente cuando se usó en combinación con azul de metileno.

Ejemplo 7

El Ejemplo 6 se repitió mediante el uso de cloruro de estaño e6 (SnCl e6; 20 µg/ml) como fotosensibilizador. El tiempo de iluminación fue de 10 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 2 más adelante. La dilución de las nanopartículas de oro de 2 nm incrementó la destrucción de *S. aureus* cuando se usó en combinación con cloruro de estaño e6.

Ejemplo 8

El Ejemplo 3 se repitió mediante el uso de sulfato de azul Nilo como fotosensibilizador. Las muestras se iluminaron durante 30 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Ej.	Fotosensibilizador	Concentración de fotosensibilizador[1] (µM)	Tamaño de las nanopartículas (nm)	Concentración de las nanopartículas[1] (partículas/ml)	Resultado[2]
2	Azul de toluidina	1	15	$1x10^{15}$	-
		5			*
		10			**/***
		20			****
		50			****
		100			**
3	Azul de toluidina	10	2	4×10^{13}	*
		20			****
		50			*
4	Azul de toluidina	20	15	$1x10^{15}$	***
				$1x10^{14}$	****
5	Azul de metileno	20	15	$1x10^{15}$	****
				$1x10^{14}$	****
				$1x10^{13}$	****
6	Azul de metileno	20	2	$4x10^{13}$	****
				$4x10^{12}$	****
				$4x10^{11}$	****
7	Cloruro de estaño e6	20[3]	2	$4x10^{13}$	-
				$4x10^{12}$	**
				$4x10^{11}$	***
8	Sulfato de azul Nilo	10	2	$4x10^{13}$	***
		20			****
		50			****

[1] concentración en la disolución mezclada

[2] clave: - menos del 50% de destrucción; * 50-90% de destrucción; ** 90-95% de destrucción; *** 95-99% de destrucción; **** 99-100% de destrucción

[3] concentración en µ/ml

REIVINDICACIONES

1. El uso no terapéutico de una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en el que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6, verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, como un antimicrobiano activado por la luz.

2. Una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en la que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6, verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, para el uso como un antimicrobiano activado por la luz en el tratamiento del cuerpo humano o animal.

3. Una mezcla para el uso según la reivindicación 2, en la que las nanopartículas metálicas son nanopartículas de oro y el fotosensibilizador es azul de toluidina O, azul de metileno o cloruro de estaño e6.

4. Una mezcla para el uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, para el uso en la destrucción o prevención del crecimiento de microbios implicados en enfermedades orales o en una cavidad corporal.

5. Una mezcla para el uso según la reivindicación 5, para el uso en la destrucción o prevención del crecimiento de microbios relacionados con una enfermedad en una cavidad corporal, (a) poniendo en contacto los microbios con la mezcla y (b) irradiando los microbios con luz a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador.

6. Una mezcla para el uso según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, para el uso en la desinfección o esterilización de tejidos de una cavidad corporal o una herida o lesión en una cavidad corporal (a) poniendo en contacto los tejidos, la herida o la lesión con la mezcla y (b) irradiando los tejidos, la herida o la lesión con luz a una longitud de onda absorbida por el fotosensibilizador.

7. Una mezcla para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la concentración de fotosensibilizador en el sitio de tratamiento es de 5 a 100 µM.

8. Una mezcla para el uso según la reivindicación 7, en la que la concentración de fotosensibilizador en el sitio de tratamiento es de 20 a 50 µM.

9. Una mezcla que comprende nanopartículas metálicas estabilizadas por carga y un fotosensibilizador, en la que las nanopartículas metálicas se seleccionan de oro, plata, cobre o aleaciones de dos o más de los mismos, y el fotosensibilizador se selecciona de azul de toluidina O, azul de metileno, cloruro de estaño e6, verde de indocianina o sulfato de azul Nilo, y en la que la mezcla está en forma de una disolución, una suspensión en un vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable, un gel, una pomada o una crema, o en la que la mezcla está dentro de un material plástico.

10. Una mezcla según la reivindicación 9, en la que las nanopartículas metálicas son nanopartículas de oro y el fotosensibilizador es azul de toluidina O, azul de metileno o cloruro de estaño e6.

11. Una mezcla según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en la que la concentración de nanopartículas en la mezcla es de $1x10^{11}$ a $5x10^{15}$ partículas/ml.

12. Una mezcla según la reivindicación 11, en la que la concentración de fotosensibilizador en la mezcla es de 5 a 100 µM.