

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 580**

51 Int. Cl.:

A01N 59/16 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)
A61K 8/20 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)
A61K 8/81 (2006.01)
A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2008 PCT/US2008/067406**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008 WO08157643**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2008 E 08780853 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2170081**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas**

30 Prioridad:

18.06.2007 US 936120 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

**SWISS-AMERICAN PRODUCTS INC (100.0%)
2055 Luna Road, Suite 126
Dallas, TX 75006, US**

72 Inventor/es:

**KLING, WILLIAM, O. y
LUO, ERIC, C.**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

Observaciones :

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

ES 2 623 580 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

Composiciones antimicrobianas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones antimicrobianas compuestas de iones de plata y partículas de sales de plata. Las composiciones pueden usarse para proporcionar terapia antimicrobiana a un sujeto de ensayo.

10 **Antecedentes de la invención**

Es bien sabido que determinadas preparaciones de plata tienen propiedades antimicrobianas. La plata se empleó como un germicida y como un antibiótico antes de haber desarrollado los antibióticos actuales. En los siglos anteriores, los usuarios raspaban partículas de plata y las añadían al agua potable, o sumergían trozos enteros de plata en el agua potable, para su ingestión al beber dicho agua. Probablemente parece que la práctica de comer con utensilios de plata (por ejemplo, cubiertos de plata) procedía de la creencia en las propiedades beneficiosas de la plata. Puede haber muchas razones por las que la administración de plata suspendida en solución mejore la salud de un individuo. Es posible que dicha solución actúe inhibiendo el crecimiento de bacterias, virus u otros organismos no deseados, así como erradicando dichas bacterias, virus y otros organismos existentes, y también por tener un efecto antiinflamatorio. Los documentos WO2004/017738 y WO2003/009810 describen ejemplos de dichas composiciones antimicrobianas que contienen plata.

Un objeto de la invención describe el uso de una composición de plata para tratar determinadas dolencias humanas. Una realización de la invención es una composición de plata que comprende partículas pequeñas de sal de plata e iones de plata libres.

Sumario de la invención

Una realización de la invención se obtiene proporcionando una composición antimicrobiana que comprende (a) una sal donadora de aniones; (b) una sal donadora de iones plata; (c) entre 90 % en peso y 98 % en peso de agua como disolvente; y (d) un polímero hidrófilo en la que la proporción molar de equivalentes de sal donadora de iones de plata con respecto a los equivalentes de sal donadora de aniones en la composición es mayor que 1, teniendo la composición un contenido de plata que varía de 0,0001 y 0,1 mol/litro y comprendiendo partículas de sal de plata e iones de plata libres.

Descripción de realizaciones preferidas

La siguiente descripción se proporciona para permitir a cualquier experto en la técnica preparar y usar la invención y expone los mejores modos contemplados por los inventores para llevar a cabo la invención. Sin embargo, diversas modificaciones seguirán siendo obvias para los expertos en la técnica, dados los principios generales de la presente invención que se han definido específicamente en el presente documento para proporcionar un producto de plata mejorado con capacidades significativas para destruir patógenos humanos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Generalmente, la presente invención representa una nueva estrategia para destruir o neutralizar microorganismos que son peligrosos para el ser humano, utilizando una composición que comprende partículas de sal de plata e iones de plata libres.

La composición de la presente invención comprende partículas de sal de plata e iones de plata libres, en la que el contenido de plata varía entre 0,0001 y 0,01 mol/litro, cuya composición destruye o neutraliza microorganismos que son peligrosos para el organismo humano.

Debe observarse que la especificación de la cantidad de plata total en una composición de partículas no especifica completamente el material. Dado que las partículas que comprende la composición son más pequeñas, una concentración determinada de plata representará un mayor número de partículas. Por tanto, el tamaño de partícula y el intervalo de tamaño de la partícula es un parámetro importante para definir una composición eficaz de la invención.

En una realización de la composición de la invención, más del 50 % de las partículas de plata tienen un tamaño máximo menor de 5 mm. Un intervalo preferido para el tamaño de las partículas de plata es de 0,1 a 1,0 mm.

En una realización de la composición, la composición se forma mezclando una sal donadora de iones plata con una sal donadora de aniones. La mezcla produce una composición que comprende partículas de sal de plata en combinación con iones de plata. Una realización de la invención proporciona una composición antimicrobiana que comprende: una sal donadora de aniones; una sal donadora de iones de plata; un disolvente; y un polímero hidrófilo, en la que la proporción molar de equivalentes de sal donadora de iones de plata con respecto a los equivalentes de sal donadora de aniones es mayor que 1.

Una proporción preferida de equivalentes de sal donadora de iones plata con respecto a equivalentes de sal donadora de aniones es entre 1,1 a 1 y 2 a 1.

5 Otra realización de la invención proporciona una composición antimicrobiana que comprende aniones procedentes de una sal donadora de aniones, iones de plata procedentes de una sal donadora de iones de plata, un disolvente y un polímero hidrófilo, en la que la proporción molar de equivalentes de iones de plata con respecto a los equivalentes de aniones es mayor que 1. La mayor proporción de iones de plata con respecto a los aniones en la mezcla contribuye a la mayor eficacia de las composiciones de la invención, en comparación con composiciones que son conocidas de la técnica anterior. En determinadas realizaciones de la invención, la composición contiene
10 partículas de sal de plata que proceden de la reacción entre una sal donadora de aniones y una sal donadora de cationes.

El catión metálico de esta invención es ion de plata. Sin embargo, las enseñanzas de la presente invención son aplicables al uso de muchos otros cationes metálicos. Estos cationes metálicos incluyen todos los compuestos metálicos que son compuestos fisiológicos, antimicrobianos, en particular, compuestos metálicos que son "oligodinámicos". El término "oligodinámico" se usa para indicar un agente metálico, particularmente una sal metálica o un ion metálico que se produce después de la disociación, que tiene actividad antimicrobiana en cantidades muy pequeñas. Los metales "oligodinámicos" incluyen los metales preciosos, tales como plata, oro y platino, y otros metales tales como cobre, cinc, cerio y galio. El ion metálico oligodinámico preferido es el ion de plata.

20 La concentración preferida de iones de plata en la composición está en el intervalo de 0,00001 mol/litro a 0,0002 mol/litro.

Los iones de plata proceden de sales donadoras de iones de plata, tales como nitrato de plata, acetato de plata, citrato de plata y sulfato de plata.

Los aniones adecuados incluyen cloruro, bromuro, yoduro y tiocianato, siendo el anión más preferido para aplicaciones fisiológicas el cloruro. El cloruro se prefiere porque el ion cloruro es el anión más abundante en el organismo humano y tiene la toxicidad más baja.

30 Puede usarse cualquier fuente del anión para proporcionar una cantidad del mismo. Las fuentes de aniones adecuadas incluyen las sales inorgánicas que son fisiológicamente tolerables. Estas incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de potasio, cloruro de calcio, yoduro de potasio y tiocianato de sodio. Las fuentes de aniones preferidas son cloruro de sodio, ácido clorhídrico o una mezcla de los mismos.

La cantidad de aniones a añadir en la composición dependerá de la cantidad de cationes metálicos en la composición y del anión que se esté utilizando. La proporción de equivalentes de cationes metálicos con respecto a equivalentes de aniones es mayor que 1.

40 Una proporción preferida de equivalentes de iones de plata con respecto a equivalentes de aniones en las composiciones de la invención es entre 1,1 a 1 y 2 a 1.

En la composición de acuerdo con la invención puede haber una determinada cantidad de disolvente. Dicho disolvente se usa según convenga para promover la solvatación de las sales que proporcionan los cationes metálicos antimicrobianos y las sales utilizadas para suministrar los aniones, y estas sales se añaden normalmente como soluciones en el disolvente. Puede usarse cualquier disolvente que sea fisiológicamente compatible y también compatible con los cationes metálicos y las sales que proporcionan los aniones. Los disolventes preferidos son alcohol, acetona, agua y una mezcla de los mismos. El disolvente más preferido es el agua.

50 Las composiciones de la invención pueden fabricarse en forma de soluciones, cremas, pomadas, pastas o hidrogeles. Cuando están en forma de una solución, una crema o una pomada, las composiciones antimicrobianas basadas en metales de la presente invención, pueden usarse por vía tópica en la piel, en heridas o en orificios corporales para el tratamiento o la prevención de diversas infecciones tópicas. Para el tratamiento o prevención de infecciones en heridas, las composiciones pueden aplicarse en el lugar de la herida por medios convencionales conocidos en la industria. Junto con la composición pueden usarse apósitos para heridas, como habitualmente se realiza en el tratamiento de infecciones tópicas. La composición ofrece protección antimicrobiana prolongada y ayuda a prevenir la deshidratación del lugar de la herida. En el tratamiento de infecciones oculares, la composición puede aplicarse en el párpado inferior del paciente usando técnicas convencionales o la composición puede estar en forma de un colirio y aplicarse usando técnicas convencionales. En el tratamiento de infecciones bucales, incluyendo gingivitis, la composición en forma de una solución o crema puede aplicarse usando un aplicador o un cepillo dental. Las composiciones de la invención también pueden estar en forma de una solución y usarse para infusión en una cavidad corporal y por lo tanto tratar la infección.

65 Las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones en forma de hidrogeles. Dichas composiciones tienen utilidad en aplicaciones tópicas, en las que se requiere un entorno húmedo en la herida. Hay tres formas

- disponibles: amorfa, impregnada en una gasa y en forma de lámina. Los hidrogeles amorfos vienen en tubos, en envases metálicos y en frascos pulverizadores. El hidrogel en la forma amorfa puede variar en grosor y viscosidad. Un hidrogel impregnado en gasa, que es un hidrogel amorfo impregnado en un apósito de gasa, puede usarse para llenar el espacio muerto en una herida grande. Los hidrogeles amorfos e impregnados en gasa no son adherentes.
- 5 Para mantener el hidrogel en su sitio puede aplicarse un apósito secundario. Los hidrogeles en forma de lámina consisten en una matriz polimérica hidrófila. El apósito puede cubrir piel intacta y generalmente sin dañarla. Los hidrogeles en forma de lámina pueden cortarse para ajustarse a la herida y típicamente no requieren un apósito secundario.
- 10 Las composiciones de la presente invención ofrecen diversas ventajas para la aplicación tópica de iones metálicos al paciente. En primer lugar, las composiciones no contienen ningún antibiótico al cual sea sensible el paciente. En segundo lugar, el riesgo de tener resistencia al desarrollo de bacterias contra un antibiótico - la creación de una cepa de microbio altamente resistente- está sustancialmente eliminado. Además, especialmente en el caso de iones de plata antimicrobianos, la composición no manchará la piel o la ropa del paciente, un problema que está asociado con
- 15 el uso de sales metálicas o composiciones basadas en metales de la técnica anterior.

Eficacia de una composición que contiene plata formulada como un hidrogel.

- 20 El cuidado actual de las heridas ha llegado a reconocer el hecho de que para una curación óptima, una herida debe mantenerse estéril y protegida de la deshidratación y de contaminantes ambientales. Los apósitos tradicionales son eficaces ya que proporcionan protección frente a contaminantes ambientales, pero son muy ineficaces para prevenir la deshidratación. Los apósitos pueden hacerse antimicrobianos mediante la adición de diversas sustancias desinfectantes, pero estas sustancias a menudo son agresivas y destruyen células del organismo además de
- 25 microbios. En los últimos años el cuidado de las heridas se ha revolucionado con materiales de hidrogel que se encuentran disponibles bien como un material semisólido (amorfo) o como un material de tipo lámina blanda. El hidrogel es hidrófilo y por tanto impide la deshidratación de la herida. El material de tipo lámina es eficaz ya que excluye contaminantes ambientales y debido a su carácter hidrófilo, el hidrogel puede realmente absorber el exceso de líquido exudado por la herida.
- 30 Los hidrogeles se forman combinando un polímero hidrófilo con otros ingredientes en una solución acuosa. La cantidad de polímero hidrófilo que se utiliza en las composiciones de la invención varía de 0,3 % en peso a 5 % en peso. El polímero forma un gel después de un cambio de pH, temperatura u otro suceso desencadenante. Aunque la composición puede ser un material semisólido amorfo o de tipo lámina más consistente, la inmensa mayoría del volumen tiende a estar ocupado por la solución acuosa en lugar de por el polímero hidrófilo. Los polímeros hidrófilos
- 35 que son apropiados para la producción de hidrogeles incluyen gelatina, carboximetilcelulosa (y otros derivados de celulosa), otros polímeros de hidratos de carbono de origen vegetal o de algas, tales como alginato, carragenano, goma xantana, goma de algarrobo, goma de tragacanto, goma guar, goma arábica y otras gomas vegetales, polímeros de ácido acrílico (tales como Carbopol™ o Carbomer™), poli(alcohol vinílico), poli(vinil pirrolidona), gliceril poliacrilato e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboxicelulosa de sodio, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa,
- 40 hidroxipropilcelulosa y otros derivados de alquilcelulosa y combinaciones de estos y polímeros hidrófilos similares.
- En determinadas realizaciones de la invención, puede usarse un agente potenciador de viscosidad en la preparación de una composición de hidrogel amorfa. Como ejemplos de agentes potenciadores de viscosidad que pueden usarse en las composiciones de la invención se incluyen polímero de ácido acrílico (tal como Carbopol™ o
- 45 Carbomer™), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboxicelulosa de sodio, carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y otros derivados de alquilcelulosa.
- Opcionalmente, el componente acuoso de los hidrogeles puede contener diversas sustancias aditivas que potencien las características físicas del hidrogel y/o que potencian la curación de la herida. Estas incluyen diversas vitaminas, aminoácidos y factores de crecimiento añadidos para potenciar la curación o reducir la formación de escaras para disminuir las cicatrices. También pueden incorporarse anestésicos habituales, tales como novocaína, lidocaína y derivados de los mismos, como aditivos para potenciar el confort. Dado que el mantenimiento de la herida estéril es un objetivo principal del apósito, se incluyen diversos agentes antimicrobianos o desinfectantes de manera ventajosa. Estos incluyen ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido acético diluido, ácido benzoico, ácido propiónico y ácido láctico. Alcoholes tales como isopropanol o etanol son útiles al igual que los desinfectantes orgánicos incluyendo compuestos fenólicos clorados tales como "TCP" (2,4,6 triclorofenol), biguanidas, clorhexidina (cuando se mezcla con cetrimida), gluconato de clorhexidina y acetato de clorhexidina. Pueden incluirse
- 55 tensioactivos desinfectantes, incluyendo tensioactivos anfotéricos y aldehídos, tales como formaldehído y glutaraldehído. Los desinfectantes halógenos, incluyendo yodo, yodóforos y povidona-yodada, son eficaces como lo son los peróxidos y otros oxigenadores tales como peróxido de hidrógeno. Otros ingredientes beneficiosos incluyen agentes astringentes de aluminio y cinc, derivados de furano y derivados de quinolina, tales como clioquinol. Aunque todos estos agentes antimicrobianos pueden ser beneficiosos, todos ellos tienden tener el defecto de que pueden dañar a los tejidos y/o los microbios pueden desarrollar fácilmente resistencia contra ellos.
- 60 En determinadas realizaciones de la invención, la composición que contiene plata de acuerdo con la invención comprende adicionalmente uno o más agentes activos. En una realización de la invención, el uno o más agentes

activos se seleccionan del grupo que consiste en agentes antimicrobianos, antibióticos, antivíricos, enzimas, proteínas y factores de crecimiento.

5 Como se demuestra más adelante, la composición de plata es muy eficaz desde el punto de vista antimicrobiano, es inofensiva para el tejido humano y es eficaz contra microbios que pueden ser resistentes a otros tipos de tratamientos. Por un lado, el hidrogel libera lentamente los iones de plata a medida que se va mezclando con el exudado de la herida. Los iones de plata pueden proceder de partículas de sal de plata formada por la reacción de la sal donadora de iones de plata con la donadora de aniones. Por otro lado, el hidrogel dona humedad al tejido y simultáneamente hace que la plata esté disponible en el lugar. Además, la presencia de iones de plata en la
10 composición potencia la función antimicrobiana de la misma.

Los dispositivos médicos son una fuente principal de infección porque los microbios colonizan sus superficies. Como resultado, los dispositivos médicos pueden actuar como focos de siembra de microbios en el cuerpo del paciente lo que conduce a infección. Si el material de un dispositivo médico puede hacerse resistente a infección, la seguridad
15 del dispositivo médico para el paciente se verá sustancialmente potenciada. Una realización de la invención proporciona un método para conferir protección antimicrobiana a un objeto mediante la aplicación tópica de las composiciones de la invención en la superficie del objeto, antes de poner en contacto dicho objeto con un sujeto. Un ejemplo de un objeto que puede tratarse con este método es un apósito para heridas.

20 A continuación se indican ejemplos de composiciones de la invención con posibles ingredientes y concentraciones.

Ejemplo 1

25 Se combinan 48 kg de agua con 1 kg de polímero hidrófilo, tal como Ultrez 21™, se mezcla cuidadosamente, se añade 1 kg de trietanolamina y se mezcla para formar una base de gel al 2 %.

Se combinan 59,984 kg de agua, 0,004 kg de NaCl y 0,012 kg de AgNO₃, se mezclan, se añaden 40 kg de base de gel al 2 %, se mezcla hasta obtener un gel homogéneo.

agua	93,384 %
NaCl	0,004 %
nitrate de plata	0,012 %
trietanolamina	0,800 %
polímero hidrófilo	0,800 %

30 Ejemplo 2

Se combinan 23 kg de agua con 1 kg de polímero hidrófilo, tal como Carbomer™, se mezcla cuidadosamente, se añade 1 kg de trietanolamina y se mezcla para formar una base de gel al 4 %.

35 Se combinan 74,987 kg de agua, 0,003 kg de NaCl y 0,01 kg de AgNO₃, se mezcla, se añaden 25 kg de base de gel al 4 % y se mezcla hasta que se obtiene un gel homogéneo.

agua	97,987 %
NaCl	0,003 %
nitrate de plata	0,010 %
polímero hidrófilo	1,000 %
trietanolamina	1,000 %

40 Ejemplo 3

Se combinan 21,5 kg de agua con 1 kg de polímero hidrófilo, tal como Carbomer™, se mezcla cuidadosamente, se añaden 2,5 kg de NaOH al 10 % y se mezcla para formar una base de gel al 4 %.

45 Se combinan 64,785 kg de agua, 0,003 kg de NaCl y 0,012 kg de AgNO₃, se mezcla, se añaden 10 kg de glicerina, se mezcla, se añaden 0,2 kg de alantoína, se mezcla, se añaden 25 kg de base de gel al 4 % y se mezcla hasta que se obtiene un gel homogéneo.

agua	88,535 %
NaCl	0,003 %
nitrate de plata	0,012 %
glicerina	10,000 %
alantoína	0,200 %
polímero hidrófilo	1,000 %
NaOH	0,250 %

Estudio 1 de índice de destrucción

Objetivo:

- 5 Demostrar que el producto de ensayo tiene las propiedades antimicrobianas de la reivindicación designada.

Organismos de ensayo:

10 Los cultivos de los siguientes microorganismos se mantuvieron como cultivos de reserva a partir de los cuales se prepararon inóculos de trabajo. Los microorganismos viables utilizados en este ensayo no deben haber pasado más de cinco pases retirados del cultivo de reserva original. Para los fines del ensayo, un pase se define como la transferencia de organismos desde un cultivo establecido a un medio reciente.

- 15 A. *Escherichia coli* (ATCC N.º 8739, Quality Technologies, Inc.)
 B. *Staphylococcus aureus* (ATCC N.º 6538, Quality Technologies, Inc.)

Materiales:

- 20 A. Tubos de ensayo con cierres
 B. Copas para especímenes
 C. Pipetas, 10,0 ml y 1,0 ml serológicas
 25 D. Placas de Petri, asas de cultivo y otros utensilios utilizados en microbiología

Medios:

- 30 A. Agar de soja triptico con lecitina y tween 80
 B. Caldo neutralizante DE
 C. Solución salina tamponada con fosfato estéril

35 **Procedimiento:**

A. Preparación del inóculo:

1.	Inocular la superficie de un volumen adecuado de medio agar sólido de un cultivo de reserva de crecimiento reciente de cada uno de los microorganismos especificados. Incubar los cultivos bacterianos a 35 °C +/-2 °C durante 24-48 horas e incubar a 25 °C +/-2 °C durante 2-4 días más.
2.	Determinar el número de microorganismos viables en cada milímetro de las suspensiones del inóculo por dilución en serie en solución salina tamponada con fosfato estéril.
3.	Sembrar en placas diluciones de 10 ⁻⁷ y 10 ⁻⁸ para los organismos de ensayo.
4.	Cubrir con aproximadamente 20 ml de agar de soja triptico a 45 °C con lecitina y tween 80.
5.	Incubar durante 24-48 horas a 35 °C +/-2 °C los organismos aerobios.
6.	Incubar durante 2-4 días más a 25 °C +/-2 °C.
7.	Contar los organismos de ensayo.
8.	Calcular el número de organismos como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) o inóculo de la siguiente manera:

40
$$\frac{ufc / ml(0,1 ml)}{9,9 gm} = ufc / gm \text{ de producto}$$

B. Preparación de las muestras de ensayo:

1.	Pipetear o pesar con precisión 9,9 ml (gm) de producto en un tubo de ensayo o una copa de espécimen codificado o marcado apropiadamente.
2.	Guardar las muestras de ensayo a temperatura ambiente.

45 C. Inoculación y siembra en placa de las muestras:

1.	Transferir asépticamente 0,1 ml del organismo de ensayo en la muestra de material de ensayo de 9,9 ml (gm) apropiadamente marcada. Mezclar cuidadosamente o agitar todas las muestras
----	---

2.	Permitir que las muestras reposen durante seis y veinticuatro horas.
3.	Retirar alícuotas de un mililitro o de un gramo en los tiempos indicados y transferir a 9,0 ml de caldo neutralizante DE estéril.
4.	Realizar diluciones en serie de 10^{-1} a 10^{-5} por duplicado.
5.	Transferir 1,0 ml de cada dilución en una placa de Petri de 100 x 15 mm.
6.	Cubrir con aproximadamente 20 ml de agar de soja tríptico a 45 °C con lecitina y tween 80.
7.	Girar suavemente las placas y permitir la solidificación.
8.	Incubar las placas durante 24-48 horas a 35 °C +/-2 °C para los organismos aerobios y 2-4 días más a 25 °C +/-2 °C.

D. Evaluación de las muestras:

1.	Leer las placas y registrar los resultados en hojas de datos adecuadas.
2.	Utilizar la concentración de inóculo calculada para cada microorganismo de ensayo, calcular la reducción logarítmica para cada microorganismo para determinar el índice tasa de destrucción.

5 E. Registros e informes:

1.	El laboratorio mantendrá una copia permanente de los datos registrados durante un periodo no inferior a tres años.
2.	Se redactará un informe escrito después de finalizar el estudio.

Resultados:

	Organismos	Nivel de inóculo	Promedio	Reducción logarítmica
	<i>E. coli</i> 6 horas	$7,07 \times 10^5$	6.000	2,07
	<i>E. coli</i> 24 horas	$7,07 \times 10^5$	Sin crecimiento	5,85
	<i>S. aureus</i> 6 horas	$2,02 \times 10^5$	2.653	1,88
	<i>S. aureus</i> 24 horas	$2,02 \times 10^5$	Sin crecimiento	5,31

10 En las condiciones de este estudio, el artículo de ensayo demostró reducción de crecimiento y destrucción de organismos importantes desde el punto de vista médico a las 24 horas.

Estudio 2 de índice de destrucción

15

Objetivo:

Demostrar que el producto de ensayo tiene las propiedades antimicrobianas de la reivindicación designada.

20 **Organismos de ensayo:**

Los cultivos de los siguientes microorganismos se mantuvieron como cultivos de reserva a partir de los cuales se prepararon inóculos de trabajo. Los microorganismos viables utilizados en este ensayo no deben haber pasado más de cinco pases retirados del cultivo de reserva original. Para los fines del ensayo, un pase se define como la transferencia de organismos desde un cultivo establecido a un medio reciente.

25

A. *Aspergillus niger* (ATCC N.º 1604, Quality Technologies, Inc.)

B. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (RM) (ATCC N.º 33591, Quality Technologies, Inc.)

30

C. *Candida albicans* (ATCC N.º 10231, Quality Technologies, Inc.)

Materiales:

35

A. Tubos de ensayo con cierres

B. Copas de espécimen

C. Pipetas, 10,0 ml y 1,0 ml serológicas

40

D. Placas de Petri, asas de cultivo y otros utensilios utilizados en microbiología

Medios:

A. Agar de soja triptico con lecitina y tween 80

5 B. Caldo neutralizante DE

C. Solución salina tamponada con fosfato estéril

Procedimiento:

10

A. Preparación del inóculo:

1.	Inocular la superficie de un volumen adecuado de medio agar sólido de un cultivo de reserva de crecimiento reciente de cada uno de los microorganismos especificados. Incubar los cultivos bacterianos a 35 °C +/-2 °C durante 24-48 horas e incubar a 25 °C +/-2 °C durante 2-4 días más.
2.	Determinar el número de microorganismos viables en cada milímetro de las suspensiones del inóculo por dilución en serie en solución salina tamponada con fosfato estéril.
3.	Sembrar en placas diluciones de 10 ⁻⁷ y 10 ⁻⁸ para los organismos de ensayo.
4.	Cubrir con aproximadamente 20 ml de agar de soja triptico a 45 °C con lecitina y tween 80.
5.	Incubar durante 24-48 horas a 35 °C +/-2 °C los organismos aerobios.
6.	Incubar durante 2-4 días más a 25 °C +/-2 °C.
7.	Contar los organismos de ensayo.
8.	Calcular el número de organismos como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml) o inóculo de la siguiente manera:

$$\frac{ufc / ml(0,1 ml)}{9,9 gm} = ufc / gm \text{ de producto}$$

15

B. Preparación de las muestras de ensayo:

1.	Pipetear o pesar con precisión 9,9 ml (gm) de producto en un tubo de ensayo o una copa de espécimen codificado o marcado apropiadamente.
2.	Guardar las muestras de ensayo a temperatura ambiente.

C. Inoculación y siembra en placa de las muestras:

20

1.	Transferir asépticamente 0,1 ml del organismo de ensayo en la muestra de material de ensayo de 9,9 ml (gm) apropiadamente marcada. Mezclar cuidadosamente o agitar todas las muestras
2.	Permitir que las muestras reposen durante seis y veinticuatro horas.
3.	Retirar alícuotas de un mililitro o de un gramo en los tiempos indicados y transferir a 9,0 ml de caldo neutralizante DE estéril.
4.	Realizar diluciones en serie de 10 ⁻¹ a 10 ⁻⁵ por duplicado.
5.	Transferir 1,0 ml de cada dilución en una placa de Petri de 100 x 15 mm.
6.	Cubrir con aproximadamente 20 ml de agar de soja triptico a 45 °C con lecitina y tween 80.
7.	Girar suavemente las placas y permitir la solidificación.
8.	Incubar las placas durante 24-48 horas a 35 °C +/-2 °C para los organismos aerobios y 2-4 días más a 25 °C +/-2 °C.

D. Evaluación de las muestras:

1.	Leer las placas y registrar los resultados en hojas de datos adecuadas.
2.	Utilizar la concentración de inóculo calculada para cada microorganismo de ensayo, calcular la reducción logarítmica para cada microorganismo para determinar el índice tasa de destrucción.

25 E. Registros e informes:

1.	El laboratorio mantendrá una copia permanente de los datos registrados durante un periodo no inferior a tres años.
2.	Se redactará un informe escrito después de finalizar el estudio.

Resultados:

	Organismos	Nivel de inóculo	Promedio	Reducción logarítmica
	<i>C. albicans</i> 6 horas	1,47 X 10 ⁶	948	3,19
	<i>C. albicans</i> 24 horas	1,47 X 10 ⁶	240	3,82
	<i>S. aureus</i> RM 6 horas	1,36 X 10 ⁶	750.000	0,26
	<i>S. aureus</i> RM 24 horas	1,36 X 10 ⁶	Sin crecimiento	6,13
	<i>A. niger</i> 6 horas	3,31 X 10 ⁵	22.000	1,18
	<i>A. niger</i> 24 horas	3,31 X 10 ⁵	210	3,20

5 En las condiciones de este estudio, el artículo de ensayo demostró reducción de crecimiento y destrucción de organismos importantes desde el punto de vista médico a las 24 horas.

Comparación de las composiciones

Proporción molar de iones de plata con respecto a iones de cloruro	Índice de destrucción/reducción logarítmica de <i>E. coli</i>	Índice de destrucción/reducción logarítmica de <i>S. aureus</i>	Índice de destrucción/reducción logarítmica de <i>P. aeruginosa</i>
Mayor que 1	5,93	6,09	5,61
Menor que 1	2,84	-0,55	5,66

10 Ensayo de biocompatibilidad

15 Se realizó un estudio en cobayas para evaluar el potencial de sensibilización de contracción dérmica retardada de un artículo de ensayo. El estudio se realizó basándose en los requisitos de la Organización Internacional de Normalización 10993: Evaluación Biológica de Dispositivos Médicos, parte 10: Ensayos de Irritación e Hipersensibilidad retardada.

20 El artículo de ensayo fue poner oclusivamente un parche durante 6 a 8 horas en la piel intacta de diez cobayas, tres veces por semana, durante un total de nueve tratamientos de inducción durante un periodo de 3 semanas. El artículo de control fue poner de manera similar un parche a cinco cobayas. Después de un periodo de recuperación, los diez animales de ensayo y los cinco animales de control recibieron un parche del artículo de ensayo expuesto. Todos los sitios se observaron para buscar pruebas de reacciones dérmicas a las 24 y 48 horas después de la retirada del parche.

25 En las condiciones de este estudio, el artículo de ensayo no mostró pruebas de causar sensibilización de contracción dérmica retardada en la cobaya.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición antimicrobiana que comprende: (a) una sal donadora de aniones; (b) una sal donadora de iones de plata; (c) entre 90 % en peso y 98 % en peso de agua como un disolvente; y (d) un polímero hidrófilo, en la que la proporción molar de equivalentes de sal donadora de iones de plata con respecto a los equivalentes de sal donadora de aniones en la composición es mayor que 1, teniendo la composición un contenido de plata que varía de 0,0001 y 0,01 mol/litro y que comprende partículas de sal de plata e iones de plata libres.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la sal donadora de iones de plata se selecciona del grupo que consiste en nitrato de plata, acetato de plata, citrato de plata y sulfato de plata.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que adicionalmente comprende uno o más agentes activos.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el uno o más agentes activos se seleccionan del grupo que consiste en agentes antimicrobianos, antibióticos, antivíricos, enzimas, proteínas y factores de crecimiento.