

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 862**

51 Int. Cl.:

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2010 PCT/EP2010/067710**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2011 WO11061237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2010 E 10779550 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2501375**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas que contienen ácidos grasos libres**

30 Prioridad:

17.11.2009 IE 20090872

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

24.11.2017

73 Titular/es:

**FOLAN, MICHAEL ANTHONY (100.0%)
Westgate Lough Eske
County Donegal, Donegal Town, IE**

72 Inventor/es:

FOLAN, MICHAEL ANTHONY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 643 862 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 que contienen ácidos grasos libres

La presente invención se refiere a composiciones antimicrobianas que contienen ácidos grasos libres y a formulaciones farmacéuticas que contienen los mismos.

5 Los ácidos grasos libres son esencialmente insolubles en agua. Su insolubilidad y el hecho de que son incompatibles con muchos excipientes convencionales han restringido seriamente su uso medicinal hasta la fecha. Aunque las sales de ácidos grasos libres son solubles en agua, se sabe que tienen un efecto antimicrobiano muy reducido. Se han utilizado varios procedimientos para "solubilizar" ácidos grasos libres, incluyendo el uso de alcoholes y tensioactivos y la derivatización por reesterificación para formar mono-glicéridos y/o procedimientos de etoxilación y propoxilación.

10 Las propiedades antimicrobianas de los ácidos grasos libres se conocen desde hace muchos años (Kabara J. y col. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, julio de 1972; 2 (1): págs. 23 - 28).

Bergson y col. (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, noviembre de 2001, páginas 3209 - 3212), informaron que tanto el ácido cáprico como el ácido láurico eran eficaces para matar la levadura *Candida albicans*.

15 Sun y col. (*Chemico-Biological Interactions* 140 (2002), págs. 185-198), identificaron las propiedades superiores como microbicidas de los ácidos caprílico, cáprico y láurico, concluyendo que el láurico era el más potente contra las bacterias grampositivas mientras que el caprílico era óptimo contra organismos gramnegativos.

Las propiedades antivíricas de los ácidos grasos libres fueron notificadas por Halldor y col. (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, enero de 1987, págs. 27-31).

20 El documento WO 03/018049 desvela la actividad antimicrobiana de las apo-proteínas de suero de leche en combinación con ácidos grasos libres de grasa de leche. Se ilustra que las propiedades inhibitorias de la adhesión de extractos de leche son atribuibles exclusivamente a la fracción de proteína soluble en agua, y que el componente lipídico no contribuye a este efecto.

25 El documento WO 2009/072097 desvela propiedades de composiciones de ácidos grasos libres tales como la depresión del punto de fusión y el secuestro que afectan a la potencia antimicrobiana. También se desvelan procedimientos de emulsión utilizados para incorporar mezclas de ácidos grasos libres en un aislado de proteína de suero de leche.

30 Sprong y col. (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45, N.º 4, 2001, págs. 1298 - 1301), informa de los efectos microbicidas para la esfingosina y la esfingomielinina y un ligero efecto de la liso-fosfatidil etanolamina y la liso-fosfatidil colina, pero no se observó ningún efecto de ninguno de los fosfolípidos no modificados. Es notable que estos resultados se informan para tiempos de exposición superiores a 2 horas a 37 °C, al contrario que la presente invención en la que se muestran efectos microbicidas para combinaciones de lípidos de membrana y ácidos grasos libres, para tiempos de exposición de menos de 5 minutos.

35 Jones y col.: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2003, Vol. 55, N.º 1, págs. 43 - 52 desvela el uso de lecitina en combinación con colesterol como un recubrimiento de superficie para inhibir la formación de biopelículas en dispositivos médicos.

Es un objeto de la invención proporcionar composiciones antimicrobianas mejoradas que contienen ácidos grasos libres.

40 La invención proporciona una composición antimicrobiana en forma de emulsión, como se define en las reivindicaciones adjuntas a la descripción, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de infecciones microbianas en seres humanos o animales.

También se desvela en el presente documento una composición antimicrobiana que comprende:

- (a) uno o más ácidos grasos libres saturados o insaturados que tienen de 4 a 22, preferentemente de 6 a 18 o de 6 a 12, átomos de carbono o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos; y
- 45 (b) uno o más lípidos de membrana o un derivado hidrolizado del mismo, como agente emulsionante para el ácido graso libre o los ácidos grasos libres o la sal o éster de los mismos.

50 El ácido graso libre se puede seleccionar entre: ácido butírico (C4:0), valérico (C5:0), caproico (C6:0), heptanoico (C7:0), caprílico (C8:0), pelargónico (C9:0), cáprico (C10:0), undecanoico (C11:0), undecilénico (C11:0), láurico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), margárico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), araquidónico (C20:4) y eurístico (C22:1).

El ácido graso libre se selecciona preferentemente entre: ácidos valérico, caproico, caprílico, pelargónico, cáprico, undecanoico, undecilénico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico y mezclas de los mismos, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos. Se prefieren en particular los ácidos caprícos, caprílicos, pelargónicos, cápricos, undecilénicos y láuricos, especialmente el ácido caprílico.

- 5 Cuando se usan combinaciones de ácidos grasos que incluyen entidades de punto de fusión más alto tales como ácido láurico, se incluyen preferentemente entidades de punto de fusión inferior tales como caprílico u oleico para deprimir el punto de fusión de la combinación a temperaturas fisiológicas inferiores a las normales.

- 10 Los lípidos de la membrana son componentes ubicuos de todas las membranas celulares en los reinos vegetal y animal. Se caracterizan por estar constituidos por una o, en la mayoría de los casos, dos moléculas de hidrocarburo de cadena larga unidas a un grupo principal altamente polar, que es un derivado del glicerol-3-fosfato, un aminoalcohol de cadena larga (esfingosina), un azúcar, o un derivado de un esteroide (colesterol). Las propiedades de cada lípido de la membrana están dictadas principalmente por la variación en el grupo principal polar. Casi todos son anfóteros en la medida en que se comportan como ácido y como base y, lo que es más importante, son todos anfipáticos, teniendo un extremo hidrófilo y soluble en agua en el grupo principal polar y un extremo lipófilo soluble en grasa en la cola hidrocarbonada.

15 Las propiedades fisicoquímicas de los lípidos de membrana son bien conocidas y se puede encontrar una revisión adecuada de su aparición y propiedades biológicas en *Biochemistry*, 3ª edición: Mathews, Van Holde y Ahern: ISBN 0-8053-3066-6, a partir de las cuales se ha recopilado la Tabla 1.

Tabla 1:
Clases principales de lípidos de membrana.

Clases de lípidos de membrana	Grupo polar principal	Lípidos de membrana
Lecitina / Fosfolípidos / Glicerofosfolípidos	Glicerol	Ácido fosfatídico Fosfatidilcolina Fosfatidiletanolamina Fosfatidilglicerol Fosfatidilinositol Fosfatidilserina
Esfingolípidos y Glucoesfingolípidos	Esfingosina	Ceramida Esfingomielina
Glucoglicerolípidos	Sacárido	Glucolípidos Glucoesfingolípidos Cerebrósidos Gangliósidos Glucoglicerolípidos Diglicérido de mono-galactosilo
Colesterol	Esteroides	Lanosterol

- 20 De las cuatro clases principales de lípidos de membrana, los que contienen fosfato en el grupo polar principal son las más comunes. Descritos como glicerofosfolípidos, fosfoglicéridos o más frecuentemente como fosfolípidos, este grupo constituye la mayor parte de los lípidos de membrana en las bacterias, plantas y reinos animales. Todos los fosfolípidos se basan en un esqueleto de glicerol con dos cadenas laterales de acilo hidrófobas sobre los carbonos en sn1 y sn2 y un resto de fosfato en sn3. Las variaciones en la cabeza de fosfato diferencian seis tipos separados de fosfolípidos comunes, siendo el más sencillo el ácido fosfatídico y progresando con complejidad creciente a través de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y fosfatidil inositol, siendo la fosfatidilcolina la más prevalente en animales y bacterias.

- 25 Los seis fosfolípidos mencionados anteriormente se encuentran en la lecitina, un lípido de membrana comercial que se extrae a escala industrial de una diversidad de fuentes incluyendo, pero sin limitarse a, la soja, el girasol, la colza, el aceite de palma, la yema de huevo y la grasa de manteca. El término "lecitina" se utiliza con frecuencia sinónimo con el componente fosfolípido principal fosfatidilcolina, que puede purificarse a partir de lecitina pura, como es habitual cuando se requiere un control riguroso de calidad en aplicaciones farmacéuticas. También es posible modificar enzimáticamente la lecitina o cualquiera de sus componentes fosfolípidos mediante, por ejemplo, la eliminación de una de las cadenas laterales de hidrocarburo para formar "liso-fosfolípidos", todos los cuales son igualmente adecuados para su uso en la presente invención.

- 30 Los derivados hidrolizados de lípidos de membrana incluyen liso-fosfolípidos y liso-esfingolípidos que pueden producirse enzimáticamente usando fosfolipasas pancreáticas disponibles en Novozyme, Dinamarca. El

procedimiento implica la preparación de una dispersión acuosa de fosfolípidos o esfingolípido, la adición de la enzima fosfolipasa al 2 % en P/V y la incubación a una temperatura elevada de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 horas. El rendimiento de la membrana hidrolizada puede ser de hasta el 70 %, y el producto puede separarse de la mezcla por separación de agua sobre la base de una mayor hidrofilia del liso-derivado.

Los lípidos de membrana usados en la presente invención pueden extraerse de fuentes vegetales o animales incluyendo semillas oleaginosas, grasa animal, lana, leche y huevos.

La lecitina utilizada en la presente invención está deslipidizada. Como se utiliza en el presente documento, el término "deslipidizado" pretende significar que sustancialmente todo el material lipídico extraño conjugado, tal como aceite, grasa o material triglicérido, al que los lípidos de membrana se asocian normalmente en la naturaleza, se elimina. "Sustancialmente todo" en este contexto pretende significar que el lípido de membrana deslipidizado contiene menos del 10 %, preferentemente menos del 5 %, más preferentemente menos del 3 %, del material lipídico extraño conjugado.

El lípido de membrana desvelado en el presente documento se selecciona preferentemente entre uno o más de fosfolípidos, lecitina, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, glucoesfingolípidos, glucoglicerolípidos y colesterolos. Los lípidos de membrana adecuados incluyen lecitina, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ceramida, esfingomielina, glucolípidos, glucoesfingolípidos, cerebrósidos, gangliósidos, glucoglicerolípidos, mono-galactosil diglicérido, lanosterol o colesterol o cualquier combinación de los mismos. La lecitina se utiliza en las composiciones y composiciones farmacéuticas de la invención.

En la composición antimicrobiana de la invención, se prefiere particularmente una combinación de uno o más de los ácidos caproico, caprílico, pelargónico, cáprico, undecilénico y láurico con lecitina deslipidizada, especialmente ácido caprílico con lecitina que está deslipidizada.

La proporción de ácido graso libre o sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo con respecto al lípido de membrana puede ser de aproximadamente 0,25:1 a aproximadamente 10:1; o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 10:1, o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 5,0:1, o de aproximadamente 1,0:1 a aproximadamente 2,5:1, o de aproximadamente 1,25:1 a aproximadamente 2,5:1, en base peso/peso.

Los ácidos grasos libres se ven afectados negativamente cuando están en contacto con fluidos corporales, tales como sangre, suero o un ácido orgánico o una sal o éster del mismo y/o una sal de ácido inorgánico. De este modo, la composición antimicrobiana de la invención también puede comprender uno o más ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos; y/o una o más sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables.

El ácido orgánico se selecciona preferentemente entre los ácidos acético, pirúvico, propiónico, glicólico, oxálico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, maleico, ascórbico, fumárico, tartárico, malónico, giátrico, propenoico, cis o trans butenoico y cítrico y mezclas de los mismos, y sus sales y ésteres farmacéuticamente aceptables. La sal de ácido inorgánico se selecciona preferentemente entre cloruro, sulfato y nitrato.

Los ácidos orgánicos particularmente preferidos son los ácidos cítrico y láctico y las sales de sodio y potasio de los mismos, especialmente citrato de sodio.

La concentración molar del ácido orgánico es preferentemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 500 mM, más preferentemente de aproximadamente 50 mM a 250 mM, y más preferentemente de aproximadamente 50 mM a 150 mM. El pH de la sal de ácido orgánico está preferentemente entre 4,0 y 6,5, preferentemente entre 4,0 y 5,5 o entre 4,0 y 5,0.

En la composición antimicrobiana de la invención, la lecitina deslipidizada emulsiona el ácido graso, lo que la hace dispersable en agua. De este modo, la combinación lípido de membrana-ácido graso es una emulsión, preferentemente una emulsión de aceite-en-agua, aunque también es posible una emulsión de agua-en-aceite.

En una realización particularmente preferida, la composición de la invención comprende una emulsión de ácido caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 %, que se diluye a continuación hasta el 50 % de su concentración utilizando tampón de citrato de sodio 200 mM a pH 4,5, siendo la concentración final de ácido caprílico al 0,25 % emulsionado en lecitina deslipidizada al 0,2 % y dispersada en citrato sódico 100 mM a pH 4,5. Esta composición se denomina en lo sucesivo en el presente documento "formulación convencional" y puede usarse convenientemente para demostrar los efectos antimicrobianos de las composiciones de la invención.

Las composiciones antimicrobianas de la invención presentan un doble efecto antimicrobiano, en el sentido de que presentan inhibición de la adhesión microbiana a las superficies de la célula hospedadora y consiguen un efecto microbicida a través de la disolución de las membranas celulares microbianas.

Se ha encontrado inesperadamente que cuando se separan lípidos de membrana de restos lípidos conjugados, diferentes lípidos de membrana presentan sorprendentemente diferentes propiedades inhibitoras de la adhesión en células microbianas en cultivo planctónico. Aunque no se desea quedar ligado a teoría alguna, se sugiere que estas diferencias surgen de variables hidrófobas/hidrófilas características. Además, se ha descubierto que la misma variabilidad anfipática afecta a la tenacidad de emulsiones formadas con lípidos de membrana individuales y que estas diferencias pueden explotarse para manipular la velocidad de liberación de ácidos grasos libres microbicidas emulsionados, facilitando grandemente de este modo el diseño de formulaciones microbicidas de acción rápida o lenta con una utilidad superior en aplicaciones médicas.

Como se describe en el presente documento, se pueden obtener propiedades inhibitoras de adhesión superiores y ajustables usando lípidos de membrana, particularmente fosfolípidos, colectivamente descritos como lecitinas, después de haber sido extraídos y liberados de lípidos conjugados a los que están normalmente asociados en su estado natural ambiental de inhibición de la adhesión microbiana que requiere que el extremo lipófilo del lípido de membrana esté libre de orientarse y conjugarse con restos lipídicos sobre la superficie celular microbiana. Este procedimiento se impide si los sitios lipófilos están ocupados por lípidos no membranosos (triglicéridos por ejemplo).

Una utilidad particular proporcionada por las composiciones desveladas en el presente documento es el descubrimiento de que las diferentes clases y los diferentes miembros de cada clase de lípidos de membrana tienen diferentes características de liberación. La misma dosis del mismo ácido graso en la misma cantidad de lípido de membrana diferente proporcionará el mismo efecto microbicida durante un período más rápido o más lento dependiendo del lípido de membrana individual. Esta característica peculiar facilita el uso de combinaciones de diferentes emisiones de lípidos de la membrana del mismo ácido graso para conseguir un efecto de liberación sostenida durante relativamente períodos útiles.

Una característica de los ácidos grasos libres y particularmente del ácido graso saturado de cadena corta a media, tal como el ácido caprílico, es que se absorben rápidamente a través de las membranas de la piel y de la mucosa. La absorción rápida agota la dosis en la superficie epitelial y, en consecuencia, perjudica el efecto microbicida en esa superficie. Por esta razón, los lípidos de membrana que entregan el efecto microbicida más inmediato no son necesariamente los más eficaces en aplicaciones terapéuticas. Como se demuestra a continuación en el presente documento en el Ejemplo 9, ciertos lípidos de membrana individuales son más tenaces que otros, lo que restringe la disponibilidad de su ácido graso libre emulsionado, y por consiguiente restringe la velocidad de su efecto microbicida, que restringe igualmente su absorción en la superficie epitelial. Hay que señalar, sin embargo, que el efecto microbicida total (números logarítmicos de microorganismos muertos) no se ve afectado.

También se ha encontrado inesperadamente que las composiciones antimicrobianas de la invención se pueden usar para regular la velocidad de coagulación de la sangre. Mediante la variación de la relación de ácido graso libre a lecitina deslipidizada y/o por incorporación de sales farmacéuticamente aceptables de ácidos orgánicos o inorgánicos, u oligosacáridos u otros polímeros, las formulaciones o bien catalizarán la velocidad de coagulación de la sangre o bien la suprimirán por completo. Esta propiedad proporciona una gran ventaja en el uso como un agente antimicrobiano de contacto con la sangre.

Como se desvela en el presente documento, se añadió una dispersión acuosa de lípido de membrana deslipidizado a sangre de oveja fresca a un volumen del 20 %, lo que acelerará la velocidad normal de coagulación sanguínea, reduciendo el tiempo de coagulación de 6 minutos a menos de un minuto. La adición de un ácido graso, tal como ácido caprílico, mediante emulsión hasta una relación de aproximadamente 1,0 - 1,3 veces el peso del lípido de membrana deslipidizado, tal como la lecitina, reducirá adicionalmente el tiempo hasta la formación de coágulos, pero a continuación, a medida que la proporción de ácido graso aumenta, el tiempo de formación de coágulos aumenta y se observa un efecto anticoagulante cuando el peso del ácido graso emulsionado excede en aproximadamente 1,0 - 1,3 veces el peso del lípido de membrana deslipidizado. Un experto apreciará que el efecto regulador de la sangre dependerá no solo de la relación del ácido graso libre al lípido de membrana deslipidizado, sino también de la naturaleza del lípido de membrana y el ácido graso libre usado.

La presencia de una sal orgánica en la composición de la invención, que podría ser necesaria para la amplificación del efecto microbicida, destruirá también el efecto pro-coagulación y, como se ilustra en el presente documento, el uso de un agente de inducción de viscosidad, tal como el dextrano, extenderá los efectos anti-coagulación hasta el punto en el que sean comparables con una solución de heparina.

En una realización adicional, se puede usar una emulsión de ácido graso libre que no exceda de aproximadamente 1,0 - 1,3 veces el peso de lecitina deslipidizada para potenciar la velocidad de coagulación de la sangre y ejercer un efecto antimicrobiano en el sitio de sangrado, mientras que puede usarse una emulsión de ácido graso libre que excede de aproximadamente 1,0 - 1,3 veces el peso de lecitina deslipidizada con o sin sales añadidas de ácidos orgánicos para inhibir la formación de coágulos de sangre y ejercer un efecto microbicida en el sitio de sangrado.

Las composiciones de la invención que contienen ácidos grasos libres emulsionados de lecitina deslipidizada ejercen efectos antimicrobianos ampliamente superiores duales: tanto la inhibición de la adhesión como el efecto microbicida. Una de las ventajas significativas proporcionadas por el doble efecto antimicrobiano es que las propiedades inhibitoras de la adhesión prevalecen mucho después de que se haya agotado la carga microbicida. La mayoría de los microbicidas son reactivos químicamente con el organismo diana y la mayoría de las reacciones

microbicidas son irreversibles en condiciones fisiológicas; una dosis fija de un microbicida tiene por tanto una capacidad reactiva limitada. En combinación con una sustancia inhibidora de la adhesión, sin embargo, las propiedades inhibidoras de la adhesión persisten después de que el microbicida se ha agotado y se proporciona protección adicional contra cualquier patógeno residual viable.

- 5 Además de la inhibición superior y ajustable de la adhesión combinada con el microbicida superior y los efectos reguladores intrínsecos de la coagulación de la sangre, las composiciones de la invención son compatibles con la administración sistémica (contacto sanguíneo), en contraste con las composiciones de proteínas de la leche desveladas en los documentos WO 03/018049 y WO 2009/072097. Los lípidos de la membrana y los ácidos grasos libres son metabolitos naturales en el cuerpo humano y animal, sus efectos antimicrobianos dependen de la
10 concentración y cuando entran en la circulación sistémica se diluyen, se metabolizan y se excretan rápidamente como metabolitos naturales.

- El uso de lípidos de membrana en combinación con un agente antimicrobiano es contra-intuitivo, ya que la mayoría de los agentes antimicrobianos convencionales son inactivados por lecitina y lípidos de membrana relacionados; la lecitina figura como un agente neutralizante antiséptico aprobado para su uso en la norma europea EN 1499 y 1500
15 para evaluar el efecto microbicida de los jabones y geles de manos.

Las composiciones de la invención pueden usarse en el tratamiento o profilaxis de infecciones microbianas en seres humanos o animales. Debido al efecto regulador sobre la coagulación de la sangre, las composiciones pueden usarse, por ejemplo, en soluciones de bloqueo de catéter y en el cuidado de heridas.

- La invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas a la descripción, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para ello. La composición puede estar presente en la formulación farmacéutica en una cantidad de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 25 % (p/v); o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 % (p/v); o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,0 % (p/v).
20

- La formulación farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada para la administración a un ser humano o animal, incluyendo por ejemplo, formas adecuadas para administración oral, tópica, enteral, parenteral o mucosa.
25

La formulación de la invención puede usarse como un agente antimicrobiano tópico para la prevención y tratamiento de infecciones de la piel, pelo, uñas y membranas externas de los orificios corporales.

- La composición o formulación de la invención puede usarse en la construcción de un jabón líquido o gel de manos para la eliminación del estado de portador asintomático de bacterias potencialmente patógenas tales como Staphylococcus aureus resistente a la meticilina y otras especies comúnmente asociadas a infecciones nosocomiales u hospitalarias. Se puede utilizar como un gel para el tratamiento del acné. Puede usarse en forma de un ungüento para el tratamiento de hongos dermatofitos de los folículos pilosos incluyendo el causado por las especies Trychophyton comúnmente conocidas como tiña. Puede construirse en forma de una pulverización para su administración a la piel como un tratamiento para infecciones causadas por los virus envueltos incluyendo variedades de Herpes que provocan herpes labial y herpes. Puede prepararse en forma de gotas líquidas para el tratamiento de infecciones del ojo y el oído. Puede prepararse en una diversidad de sistemas de entrega farmacéuticamente aceptables para el tratamiento de infecciones de la mucosa incluyendo la mucosa, superficies de la nariz, boca, garganta, bronquiolos y pulmones y el tracto gastrointestinal y genitales. Puede prepararse, por ejemplo, en forma de una pasta de dientes y un enjuague bucal para facilitar la mejora de la higiene dental y eliminar la carga de organismos que causan caries dental, enfermedad de las encías, úlcera aftosa y halitosis. Puede prepararse en una forma adecuada como suplemento de saliva para el alivio de los síntomas de la xerostomía. Puede prepararse como una pulverización para la descolonización de la boca, la garganta y las membranas nasales, particularmente para la erradicación del porte asintomático de especies resistentes a los antibióticos. Puede prepararse en forma de un gel para la prevención y el tratamiento de infecciones microbianas de los genitales causadas por una diversidad de bacterias, levaduras y virus incluyendo aquellos conocidos por ser los agentes causales de la candidiasis, la vaginosis bacteriana no específica, el virus del herpes y el VIH. Puede prepararse en forma de un enema para la prevención y tratamiento de infecciones del intestino y del intestino inferior, incluyendo aquellas causadas por especies de Clostridium anaeróbicas y Desulfovibrio médicamente conocidas como colitis pseudomembranosa y reservoritis.
30
35
40
45

- Los ácidos grasos libres emulsionados en lípidos de membrana pueden usarse para preparar alimentos que ejercen un efecto antimicrobiano en el tracto gastrointestinal, sirviendo para proteger contra patógenos entéricos tales como Helicobacter, E. coli, Salmonella, Campylobacter, especies de Clostridium, protozoos y virus envueltos.
50

- Un vehículo alimentario adecuado para ácidos grasos libres emulsionados con lípidos de membrana es la leche fresca, preferentemente libre de grasa y más preferentemente leche en polvo desnatada tal como Marvel, disponible en el mercado en Premier International Foods (Reino Unido) Ltd, Spalding, Lincolnshire, Inglaterra.
55

Se pueden preparar emulsiones separadas de, por ejemplo, ácidos caprílico, cáprico y láurico como emulsiones al 5,0 % P/V en lecitina deslipidizada al 4,0 % P/V, como se describe en los procedimientos. Las emulsiones individuales pueden combinarse en una proporción de 1:1:1 o cualquier otra proporción adecuada tal como 1:2:3.

Pueden añadirse emulsiones de lípidos de membrana de otros ácidos grasos tales como butírico y/o emulsiones de aceites esenciales tales como menta o vainilla para transmitir aroma y mejorar el sabor.

5 La leche desnatada en polvo Marvel puede reconstituirse añadiendo la cantidad especificada a agua potable (4 cucharaditas llenas por aproximadamente medio litro). A esto se le puede añadir una cantidad de aproximadamente el 1 % P/V al 15 % P/V de una relación seleccionada de ácidos grasos libres emulsionados con lípidos de membrana y se mezclan por agitación. Preferentemente, la cantidad de ácido graso emulsionado será de aproximadamente el 1 % P/V al 10 % P/V y más preferentemente aproximadamente del 5 % P/V. Será evidente para un experto en la técnica que la leche desnatada en polvo puede reconstituirse en menos que el volumen óptimo de agua para su uso como leche, en cuyo caso se forma una crema concentrada de productos lácteos a la que se pueden añadir
10 cantidades de ácidos grasos emulsionados.

Alternativamente, se puede usar un aislado de proteína de suero lácteo como un vehículo alimentario adecuado: Provon 190 de Glanbia PLC es un aislador de proteína de suero adecuado. El aislado de proteína de suero de leche puede rehidratarse en agua potable en una cantidad de aproximadamente el 10 % P/V al 20 % P/V, preferentemente de aproximadamente el 15 % P/V. Una vez completamente hidratado, se puede añadir una cantidad de ácido graso libre emulsionado con lípidos de membrana o una mezcla de los mismos y mezclarse por agitación. Cuando el aislado de proteína de suero de leche se usa como vehículo, la cantidad de ácido graso libre emulsionado de lípidos de membrana añadida puede ser de aproximadamente el 1 % P/V al 20 % P/V, preferentemente de aproximadamente el 5 % P/V al 15 % P/V y más preferentemente aproximadamente el 10 % P/V.
15

Los productos de la invención tienen utilidad como agentes antimicrobianos de contacto con la sangre en los que su capacidad combinada de coagulación sanguínea o anticoagulación se combina con sus efectos antimicrobianos. Dichos usos incluyen riego quirúrgico, cuidado de heridas, soluciones de bloqueo de catéter, revestimiento de catéteres y otros dispositivos quirúrgicos tubulares para su inserción en un orificio o cavidad corporal y en seguridad alimentaria.
20

Una ventaja significativa de los productos de la invención es que se requieren tiempos de exposición muy cortos para conseguir un efecto antimicrobiano, generalmente inferior a 1 hora o inferior a 30 minutos o inferior a 10 minutos.
25

Como se usa en el presente documento y en el uso convencional, el término antimicrobiano se refiere a cualquier sustancia, componente o composición de componentes que presentan un efecto antagonista hacia protozoos, bacterias grampositivas y gramnegativas (aerobios y anaerobios), levaduras, hongos, micoplasmas y/o virus, y en particular aquellas especies microbianas que son capaces de causar enfermedades en seres humanos y animales. La enfermedad infecciosa surge de la entrada de especies microbianas patógenas (microorganismos) del medio externo o como resultado de un crecimiento aberrante de microorganismos que están normalmente presentes en la microflora natural de la piel, el cabello y las membranas mucosas del ojo, nariz, boca, tracto gastrointestinal y los genitales.
30

Ya sea exógena o endógena, se entiende ampliamente entre los profesionales de la salud que la primera etapa de la patogenia microbiana invoca la adhesión del microorganismo a la superficie del tejido humano o animal. Una vez adherido, la colonización tiene lugar a través de la proliferación y adherencia posterior, después de lo cual la producción de toxinas y la destrucción del tejido huésped dan lugar a los síntomas clásicos de la enfermedad infecciosa. También se acepta ampliamente que si se puede prevenir la adhesión, se puede inhibir la iniciación del proceso patógeno y muchas enfermedades infecciosas pueden prevenirse o al menos limitarse en el alcance de su proliferación.
35
40

Las propiedades novedosas de la membrana de los ácidos grasos libres emulsionados con lípidos de membrana presentan una gran utilidad en salud humana y animal. En aplicaciones de contacto con la sangre se incluyen fluidos de irrigación quirúrgicos, antimicrobianos hemostáticos en el cuidado de heridas, recubrimientos de catéter y soluciones de bloqueo de catéter para la prevención de bacteriemia relacionada con catéter; en la mucosa, pueden usarse para replicar el mecanismo antimicrobiano natural del moco sano; en el cuidado tópico de la piel, pueden utilizarse para amplificar las defensas antimicrobianas naturales de la piel; en la seguridad alimentaria porque son metabolitos naturales pueden aplicarse directamente a una superficie de alimentos para erradicar patógenos transmitidos por alimentos; y como alimentos medicinales pueden usarse para complementar una dieta para prevenir o tratar infecciones del tracto gastrointestinal.
45
50

Irrigación Quirúrgica y Cuidado de Heridas

Durante la intervención quirúrgica es práctica común emplear una diversidad de técnicas para minimizar la entrada de bacterias, levaduras, mohos y virus potencialmente patógenos. Un problema común y creciente es la infección potencial de una herida abierta por bacterias resistentes a los antibióticos tales como el Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA), y muchos otros incluyendo pero no limitado a especies de Enterococcus, Pseudomonas y la levadura Candida albicans. En muchos casos las heridas abiertas se irrigan para limpiarlas de tejido suelto, sangre y otros fluidos corporales y en muchos casos una solución de solución salina estéril está actualmente en uso, aunque esto no ofrece ningún efecto antimicrobiano. El uso de fluidos de irrigación quirúrgicos
55

que contienen antibióticos no se recomienda simplemente porque estos tienen el potencial para generar más especies resistentes a los antibióticos. Igualmente, muchos agentes antisépticos convencionales son inadecuados y potencialmente tóxicos en contacto sistémico directo con una herida abierta. Por lo tanto, existe una gran necesidad de un fluido de riego antimicrobiano seguro y eficaz, preferentemente uno que tenga las propiedades opcionales adicionales de inhibir la coagulación de la sangre durante la microcirugía y/o un producto complementario que pueda promover la coagulación sanguínea y la curación después de la cirugía. Las composiciones basadas en lípidos de membrana opcionalmente deslipidizados combinados con ácidos grasos libres y/o derivados de los mismos como se describen en el presente documento proporcionan dicha utilidad. También en el cuidado del traumatismo después de una lesión accidental o durante operaciones militares, las heridas frecuentemente son irregulares, están sucias y posiblemente sangren profusamente. Hay una gran necesidad de una intervención de emergencia con productos antimicrobianos que promuevan la coagulación de la sangre y que se puedan aplicar con seguridad a una herida abierta.

Prevención de la infección relacionada con el catéter

En términos simplistas, un catéter es un tubo insertado a través de la piel, en una arteria o vena o a través de un orificio natural con el fin de drenar fluidos corporales, o para la administración de fármacos o con el propósito de monitorizar la enfermedad o la manipulación de instrumentos quirúrgicos. Algunos catéteres permanecen durante períodos de tiempo relativamente largos y en muchos casos son susceptibles a la contaminación microbiana y originan una biopelícula en las superficies interiores y exteriores, lo que potencialmente conduce a la infección diseminada del paciente.

El catéter más común es un tubo del tracto urinario con un vaso colector para drenar la orina de la vejiga; estos son reconocidos como fuentes importantes de infección adquirida en el hospital. Un sistema más elaborado y complicado es un catéter venoso central (CVC) insertado ya sea a través de la vena yugular en el cuello y se introduce a través de la vena cava superior en el corazón, o se inserta a través de una vena periférica y se introduce a través de la misma vena que drena en el corazón. Los CVC están diseñados para dejarse durante períodos prolongados de hasta 90 días o más y están destinados a la administración repetitiva a largo plazo de fármacos y/o formulaciones nutricionales; en dichas aplicaciones se abren rutinariamente para su administración y se vuelven a cerrar durante períodos intermitentes durante los cuales el fluido en el lumen del catéter es estático y susceptible al crecimiento microbiano si está contaminado. La contaminación accidental de los CVC es relativamente común y frecuentemente da lugar a infecciones del flujo sanguíneo relacionadas con el catéter que son potencialmente mortales.

La sangre entra en el lumen de un CVC durante procedimientos médicos habituales, donde se aferra al interior y pueden coagular bloqueando el lumen. Un lumen CVC bloqueado requiere el reemplazo del catéter en cirugía, lo que aumenta considerablemente el tiempo, el coste y la mortalidad del paciente.

Una solución de bloqueo de catéter (CLS, del inglés *catheter locking solution*) es un volumen de fluido suficiente para llenar el lumen del catéter entre procedimientos médicos. Un CLS óptimo ejercerá un efecto antimicrobiano y anticoagulante. En la actualidad hay una serie de formulaciones CLS patentadas en el mercado que están diseñadas para lograr tanto la prevención de la coagulación de la sangre como un efecto antimicrobicida. La selección de ingredientes activos para construir estas formulaciones CLS está limitada por el riesgo de infusión intravenosa accidental. El volumen de vacío de un CVC puede ser de hasta 3,0 ml o más. En el caso de que un administrador médico se olvidara de que se había insertado una solución de bloqueo y se añadiera accidentalmente una segunda dosis, el primer volumen vacío se infundiría directamente en el torrente sanguíneo donde podría tener serias implicaciones toxicológicas para el paciente.

Las formulaciones de la presente invención pueden estar en forma de soluciones de bloqueo de catéter, que pueden lograr un efecto microbicida óptimo en menos de 1 hora y tienen propiedades anticoagulantes similares a la heparina sin el uso de ese material en la formulación. Las soluciones de bloqueo del catéter tienen preferentemente una viscosidad aproximándose a la de la sangre entera para minimizar el potencial de disolución y mezcla en la punta del catéter. La viscosidad deseada se puede conseguir usando agentes potenciadores de la viscosidad.

Los agentes potenciadores de la viscosidad utilizados habitualmente en preparaciones farmacéuticas incluyen una amplia gama de hidrogeles de origen natural o sintético. Entre estos se incluyen derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa. Otros polímeros naturales de origen vegetal incluyen dextrano, alginato, pectina, goma guar y goma arábiga; los polímeros sintéticos incluyen una gama de carbómeros (acrilatos/polímeros de acrilato de alquilo C10-30) y poloxámeros (copolímeros tribloque de polioxietileno y polioxipropileno). Por razones de toxicidad residual y eliminación metabólica, pocos de éstos están aprobados para el uso sistémico habitual en medicina humana. El Poloxámero, Pluronic F68 se ha utilizado en formulaciones nutricionales parenterales, pero el dextrano de origen natural ha logrado un uso más extenso en cirugía.

En las formulaciones de la invención, el dextrano es el agente potenciador de la viscosidad preferido. El dextrano es un polisacárido natural. Un complejo de glucano ramificado de monómeros de glucosa, que es producido por muchas bacterias, incluyendo la especie *Leuconstoc*, y se ha utilizado como un agente irrigador y anticoagulante en microcirugía. El dextrano está disponible en el mercado en una gama de pesos moleculares que van desde 10 Kilo daltons (Kd) hasta 150 Kd. En la invención, se prefiere el dextrano de 20 Kd a 60 Kd. Más preferentemente, el

dextrano de 40 Kd se usa para ajustar la viscosidad de un lípido de membrana/ácido graso libre solución de bloqueo del catéter para aproximarse a la de la sangre entera: 3,6 – 6,5 cP.

- 5 Cuando se usa dextrano de 40 Kd como agente potenciador de la viscosidad, su concentración en formulaciones debe ser preferentemente de aproximadamente el 5 % al 50 % en peso por volumen, más preferentemente de aproximadamente el 10 % al 40%, y más preferentemente de aproximadamente el 15 % al 30 % en peso por volumen sobre la base de la totalidad formulación.

La Tabla 2 a continuación proporciona un resumen de las formulaciones CLS patentadas más comunes actualmente en uso:

Tabla 2: Formulaciones patentadas de CLS actualmente en uso o en desarrollo		
Marca propietaria	Ingredientes activos conocidos	Eficacia reportada
Duralock MedComp, Filadelfia, EE.UU.	47,6 % de Citrato trisódico	Anticoagulante, microbioestático no microbicida
Zuragen Ash Access Technologies Lafayette, Indiana, Estados Unidos	7 % de citrato de sodio 0,05 % de azul de metileno 0,15 % de metil parabenos 0,015 % de propil parabenos	Anticoagulante Microbicida durante 12 horas
Taurolock Tauropharm AG, Waldebuttelbrunn Alemania	1,35 % de Taurolidina 4 % de citrato de sodio	Anticoagulante Microbicida durante 12 horas
Canusal Wockhardt UK LTD Wrexham Gales	0,9 % de solución salina 200 U.I. de heparina/ml	Anti-coagulante No microbicida

- 10 La mayoría de las soluciones de bloqueo en uso tienen actualmente un efecto microbicida relativamente bajo: reducción en la viabilidad microbiana de 3 - 4 en escala logarítmica en una exposición de más de una hora. Como se desvela en el presente documento, un CLS basado en ácidos grasos libres emulsionados de lípidos de membrana presenta un efecto antimicrobiano superior que erradica más de 6 en escala logarítmica en menos de 6 minutos. Los efectos óptimos de la anticoagulación se consiguen modificando la relación del lípido de la membrana y el ácido graso libre y el uso opcional de un agente que aumenta la viscosidad elimina la migración de sangre a la punta del catéter. Una mayor seguridad en caso de doble bloqueo accidental está asegurada por el hecho de que los componentes utilizados en la presente invención son metabolitos naturales.
- 15

Recubrimiento superficial antimicrobiano

- 20 Las composiciones de la presente invención se pueden usar para crear recubrimientos de superficie antiadherentes y antimicrobianos de doble acción atrapando una película de ácido graso libre, sobre cualquier superficie animada o inanimada, incluyendo pero sin limitarse a piel, plástico, caucho, metal o vidrio, donde ejercen un efecto microbicida en la superficie además de repeler la adhesión de especies microbianas.

- 25 Los recubrimientos activos de superficie antimicrobiana tienen una aplicación particular en el cuidado de la salud, para la prevención de la formación de biopelículas en instrumentos médicos y en superficies de catéter, y también como recubrimiento superficial para estaciones de trabajo, bandejas procedimentales y todas las superficies de contacto del paciente. De forma similar, los recubrimientos de superficie antimicrobianos activos tienen una aplicación extensa en la industria de productos alimenticios en la que se pueden aplicar a la preparación de alimentos ya las superficies de envasado para minimizar el transporte de patógenos transmitidos por alimentos tales como Salmonella, Campylobacter, Listeria y E. coli y como se demuestra en el presente documento, también pueden aplicarse a la superficie de productos alimenticios, carne, para erradicar estos patógenos en la fuente.

- 30 La antisepsia superficial convencional se consigue usando un paño antiséptico que puede contener triclosán, clorhexidina, compuestos de amonio cuaternario o una solución concentrada de alcohol. Sin embargo, la toxicidad residual de muchos antisépticos convencionales limita su uso en alimentos y superficies animadas.

Cuando se utiliza en aplicaciones de recubrimiento superficial, la composición de la invención puede aplicarse en un sistema de entrega farmacéuticamente aceptable, con o sin excipientes. Los sistemas de entrega

farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, disolventes orgánicos diseñados para evaporarse en la aplicación dejando un residuo seco, líquidos, cremas, geles, pastas, ungüentos, polvos o pulverizaciones e incluyen combinaciones de estos con materiales insolubles tales como toallitas fibrosas.

Fortificación mucosa:

5 Las membranas mucosas de los seres humanos y los animales son superficies característicamente húmedas en la interfaz de los orificios corporales naturales y el revestimiento del tracto gastrointestinal y los genitales, incluyen el ojo, la nariz, el oído interno, la boca, las superficies nasofaríngeas, tráquea, bronquiolos, esófago, estómago, intestino grueso e intestino delgado, recto, vagina y labios externos, los genitales y el revestimiento del tracto urinario. Además de estas superficies anatómicamente relacionadas, que son comunes a los seres humanos y animales, hay estructuras mucosas que son únicas a las especies particulares, tales como la bolsa gular en équidos.

15 Las membranas mucosas están cubiertas por una capa de moco, un hidrocoloide viscoso compuesto principalmente de mucinas, un grupo de proteínas de alto peso molecular altamente glucosiladas que actúan como una matriz dentro de la cual se dispersan muchos otros materiales biológicamente activos, incluyendo anticuerpos secretores y componentes del sistema inmunitario innato tales como histatinas y estaterinas en la saliva. Además de la hidratación y la lubricación, el moco es esencial para la prevención de la entrada de patógenos microbianos potenciales y para la prevención de la adhesión y colonización de las membranas mucosas.

20 El deterioro de la mucosa y la debilitación de la integridad del moco pueden surgir como consecuencia de una enfermedad, o como un efecto secundario de la intervención médica y/o farmacéutica o como consecuencia del estilo de vida. Cuando esto sucede, los afectados padecen una infección mucosa recurrente, incluyendo pero no limitado a caries dental, enfermedad periodontal, candidiasis, vaginitis de levadura, vaginosis bacteriana, enteritis y colitis infecciosa. La complejidad del moco ha desafiado todos los intentos de construir réplicas exactas que puedan usarse en la terapia de sustitución. Hay una serie de sustitutos comerciales, que están diseñados para aliviar los síntomas físicos predominantes de la sequedad oral. La mayoría de estos se basan en hidrogeles tales como la carboximetil celulosa y una composición de sales para efectuar el tamponamiento y la remineralización. Uno se basa en la mucina del intestino de cerdo (Saliva Orthana, AS Pharma, Eastbourne, Reino Unido), pero ninguno se aproxima a los aspectos naturales inhibitorios de la saliva y el moco en general. Las propiedades combinadas inhibitorias de la adhesión y microbicidas de las formulaciones de la invención, en particular formulaciones de liberación adaptadas como se desvelan en el presente documento, ofrecen una mimetización superior de las propiedades antimicrobianas del moco natural.

Desinfección tópica y cuidado de la piel

35 La piel, el pelo y las uñas de los mamíferos, que son las superficies externas del cuerpo están sujetos a una constante contaminación ambiental. La piel de mamífero helicoidal tiene propiedades antimicrobianas intrínsecas basadas en ácidos grasos libres naturales en la piel, y estos pueden ser ventajosamente fortificados por la aplicación tópica de ácidos grasos libres emulsionados con lípidos de membrana deslipidizados como se desvela en el presente documento.

40 Las bacterias que causan infección de la piel incluyen, pero no se limitan a, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, causando impétigo, Foliculitis, Erysipilis, Celulitis y Fascitis necrotizante. *Propionibacterium acne* es el agente causante del acné juvenil. Las infecciones de la piel por hongos son causadas principalmente por especies de *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton* y enfermedades conocidas colectivamente como Tiña (pedis, cruris, capitis, corporis y unguinum), que incluyen la dermatofitosis y las infecciones de las uñas. La levadura incluyendo *Candida albicans* causa intertrigo y Paroniquia; *Malassezia furfur* causa Tiña versicolor (dermatitis seborreica y caspa infecciosa) y es también una dolencia común en los oídos de los perros. Las infecciones por virus envueltos incluyen el herpes simple de tipo 1 que afecta a las regiones orofaciales y el de tipo 2 que afecta a las regiones genitales. El herpes zoster provoca herpes zóster y el poxvirus causa molusco contagioso. El estado de portador superficial asintomático de VIH, SARS, hepatitis, gripe porcina, gripe aviar y muchas otras infecciones zoonóticas virales también puede eliminarse usando las composiciones de la presente invención.

50 Existe una gran preocupación pública por la creciente incidencia de la infección adquirida en el hospital (IAH). Las IAH incluyen infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos tales como *Staphylococcus aureus* resistente a la Metilicina (MRSA) y *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) y otras especies resistentes a múltiples fármacos tales como *Clostridium difficile* y otros patógenos oportunistas menos conocidos, incluyendo *Pseudomonas* y *Candida*.

55 Es bien sabido que la antisepsia de las manos es crítica en la prevención de la contaminación cruzada entre los pacientes y el personal de atención al paciente. La mayoría de los establecimientos de cuidado de pacientes usan sistemáticamente un gel de alcohol para la antisepsia de las manos. El alcohol es un agente microbicida inmediato y potente. Sin embargo, se evapora en segundos, sin dejar ningún efecto persistente para proteger contra la contaminación accidental que podría ocurrir inmediatamente después de la evaporación. Las emulsiones de lípidos

de membrana de ácidos grasos libres pueden adaptarse de una manera que proporcione una liberación sostenida de efecto microbicida y cuando se formulan con alcohol, el efecto es inmediato y persistente.

Seguridad alimentaria

5 Es bien sabido que muchos animales alimentarios albergan patógenos transmitidos por alimentos, principalmente en su intestino, pero también en su piel debido a la contaminación con heces. Los antisépticos y antibióticos convencionales no son adecuados para la aplicación tópica o sistémica a los animales antes del sacrificio, o a su carne después del sacrificio. Sin embargo, los componentes individuales que constituyen los productos de la presente invención tienen la ventaja de utilizarse sistemáticamente en la nutrición parenteral; en construcciones separadas, por tanto, se ha considerado que no son tóxicos, y su idoneidad para su uso tópico en carne fresca se desvela en el presente documento.

15 Los patógenos transmitidos por alimentos incluyen especies de Salmonella, Escherichia, Campylobacter y Clostridium. La eficacia de los productos de la presente invención in vitro se demuestra en los ejemplos. Los procedimientos de erradicación de los patógenos transmitidos por los alimentos en el procesamiento primario de la carne incluyen el uso propuesto de lavado de las canales con un agente antimicrobiano adecuado. Otros procedimientos de aplicación que son relevantes para la inocuidad de los alimentos incluyen el uso de ácidos grasos libres emulsionados en lípidos de membrana como recubrimientos superficiales para el envasado de alimentos utilizando procedimientos similares a los descritos para la aplicación de recubrimientos de superficie antimicrobianos a dispositivos médicos.

Procedimientos y materiales:

20 Procedimientos de emulsión

Los ácidos grasos libres mayores de C6 son insolubles en medios acuosos. Los lípidos de membrana son igualmente insolubles en agua pero pueden estar dispersos en el mismo y, en condiciones apropiadas, pueden inducirse combinaciones de ácidos grasos libres y lípidos de membrana para formar emulsiones en agua. Estas son emulsiones de aceite en agua o agua en aceite, siendo esta última la concentración relativa más alta de ácido graso en peso.

30 Se puede preparar una emulsión de agua en aceite (ácidos grasos libres) disolviendo, por ejemplo, aproximadamente 1 gramo de lípido de membrana, tal como lecitina opcionalmente deslipidizada, en aproximadamente 2 gramos de ácido graso libre. Se agitan durante aproximadamente 10 minutos y después se añaden aproximadamente 2 gramos de agua destilada estéril, se agita vigorosamente agitando durante 30 segundos y se deja que se hidrate durante 30 minutos. Cuando está completamente hidratada, la emulsión tiene una consistencia cremosa espesa que se puede diluir adicionalmente con hasta 20 ml de agua, se añaden en alícuotas de 5 ml con agitación intermedia. Un exceso de agua añadido a esta emulsión hará que se rompa y se invierta en parte o en su totalidad y se convierta en inadecuada para el procesamiento adicional.

35 Las emulsiones de aceite en agua son más adecuadas para aplicaciones con alto contenido de agua, tales como vendajes para heridas, soluciones de bloqueo de catéter y desinfección de superficie, como se describe a continuación. Los procedimientos de preparación de emulsiones de aceite en agua son bien conocidos por los expertos en la técnica y se desvelan, por ejemplo, en el documento WO2009/072097.

40 Puede prepararse un ejemplo adecuado de una emulsión de aceite en agua de ácido graso libre en lípidos de membrana suspendiendo una cantidad adecuada de lípido de membrana, tal como lecitina opcionalmente deslipidizada, en agua destilada estéril, y agitando esto a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos con un agitador magnético para asegurar una dispersión uniforme. Utilizando un dispositivo de dispersión adecuado, se añade lentamente la cantidad deseada de ácido graso libre, tal como ácido capríco, o caprílico, o pelargónico, mientras se agita vigorosamente el volumen de lípido de membrana dispersada. La cantidad de lípido de membrana (por ejemplo, lecitina) es convenientemente de 0,4 g en 100 ml de agua, a la que se pueden añadir 45 0,5 g de ácido graso libre usando, por ejemplo, una jeringa o pipeta de 5 ml. Un procedimiento de agitación preferido es un homogeneizador de laboratorio tal como un Ultra-Turax Modelo T18 (IKA Works, Wilmington, NC 28405, EE.UU.) equipado con una herramienta de dispersión 518N-19G, operando a 6.000 a 8.000 rpm. La emulsión resultante es una suspensión líquida fina de color blanco de ácido graso libre, que es estable y se puede diluir muchas veces sin desestabilizar la emulsión.

50 Se puede usar un procedimiento similar para preparar una emulsión de aceite en agua de, por ejemplo, ácido capríco o ácido undecilénico, a condición de que los constituyentes se equilibren primero a 37 °C, o por encima de su punto de fusión. Una vez emulsionada, la emulsión permanece estable al enfriar por debajo del punto de fusión del ácido graso libre incorporado y puede diluirse adicionalmente para su uso en la formulación.

55 Se puede preparar una emulsión de lípido de membrana de ácido láurico de una manera similar siempre que todos los constituyentes se equilibren primero a 50 °C o por encima del punto de fusión del ácido láurico, y de nuevo esta emulsión permanecerá estable durante el enfriamiento y en disolución adicional para su uso en la formulación.

Los ácidos grasos libres tienen un efecto microbicida limitado a temperaturas por debajo de su punto de referencia individual. Este hecho tiene poca significación para aquellos ácidos con puntos de fusión por debajo de temperaturas fisiológicas normales (37 °C), excepto en situaciones en las que pueda ser necesario que dichas emulsiones presenten un efecto en condiciones hipotérmicas.

5 Las mezclas de ácidos grasos libres de punto de medición alto y bajo tienen puntos de fusión deprimidos debido al efecto disolvente del constituyente del punto de fusión inferior. Una combinación de ácido láurico con un punto de fusión de 44 °C y ácido caproico con un punto de fusión de -3,4 °C en una relación 50:50, presentará un punto de fusión combinado de 26 °C, y la mezcla se puede emulsionar como se ha descrito anteriormente a temperaturas superiores 26 °C.

10 Los ácidos grasos libres de mayor punto de fusión también pueden disolverse en mezclas de bajo punto de fusión de aceites esenciales u otros aceites neutrales para lograr una depresión del punto de fusión adecuado para el uso antimicrobiano en condiciones fisiológicas. Los aceites esenciales son constituyentes hidrófobos extraídos de muchas plantas diferentes por destilación o extracción con disolvente. Son ampliamente utilizados en el mercado como perfumes y en prácticas como la aromaterapia. Los ejemplos más notables incluyen aceite de clavo, naranja, limón, lavanda, enebro y rosa. Se sabe que muchos de ellos tienen un efecto microbicida por derecho propio; el aceite de bálsamo de limón, por ejemplo, se reconoce como un agente viricida eficaz y cuando se usa como disolvente para ácidos grasos de punto de fusión más alto tal como ácido láurico, el microbicida combinado y las propiedades viricidas proporcionan una mayor utilidad en aplicaciones médicas.

20 El aceite de bálsamo de limón se disolverá hasta un 40 % en peso de ácido láurico a 20 °C y la mezcla se puede emulsionar en lípidos de membrana tales como lecitina, como se ha descrito anteriormente.

25 Las emulsiones de aceite en agua de ácidos grasos libres o mezclas de los mismos pueden prepararse en concentraciones de lípido de membrana opcionalmente deslipidizado que oscila entre aproximadamente el 0,1 % y el 10 % y cargas de ácidos grasos libres emulsionadas del 0,1 al 10 %. La carga puede ser convenientemente del 4 % de lípido de membrana tal como lecitina, y el 5 % de ácido graso libre o una mezcla de los mismos. Más preferentemente, se utiliza una carga del 0,4 % de lecitina opcionalmente deslipidizada y el 0,5 % de ácido graso libre o una mezcla de los mismos, que puede diluirse adicionalmente para su uso en formulación.

30 La eficacia microbicida de cualquier emulsión de lípidos de membrana de ácido graso libre de acuerdo con la invención se amplifica aumentando el área superficial de la gotita emulsionada; el área superficial relativa aumenta al disminuir el tamaño de la gota. El tamaño de las gotitas es una función de la cantidad de energía transmitida por la herramienta de dispersión durante el procedimiento de emulsión. Generalmente, se pueden producir gotitas más finas usando velocidades de homogeneización más altas y el uso de una sonda ultrasónica adyacente al cabezal de emulsión también facilitará gotitas más pequeñas y un área de superficie aumentada.

Deslipidización de los lípidos de membrana

35 La deslipidización puede conseguirse suspendiendo el lípido de membrana o el derivado hidrolizado del mismo en un disolvente polar, tal como un alcohol o cetona, a una concentración de aproximadamente el 10 % p/v y agitando durante aproximadamente 30 minutos durante los cuales se disuelve el lípido extraño. Los lípidos de membrana son insolubles en disolventes polares y se asentarán fácilmente después de la agitación permitiendo que el disolvente polar con su lípido disuelto sea decantado. El disolvente residual se deja evaporar en, por ejemplo, una campana extractora. Los disolventes adecuados incluyen acetona y etanol.

40 Ensayo de Adhesión:

Un modelo adecuado de adhesión microbiana e inhibición de adhesión es proporcionado por la interacción entre la levadura *Candida albicans* y las células epiteliales bucales humanas recién recogidas desde el interior de la mejilla.

45 En el procedimiento de ensayo, una población normalizada de *Candida* fresca de fase logarítmica tardía se expone a una concentración variable de la sustancia de ensayo durante 10 minutos, después se combina con una relación fija de células epiteliales bucales (BEC, del inglés *Buccal Epithelial Cells*) durante 60 minutos, tiempo durante el cual la levadura se adhieren a las BEC en mayor o menor grado, dependiendo de la potencia de la sustancia inhibidora utilizada en el pretratamiento. Después del período de adhesión, la levadura combinada y las BEC se diluyen por un factor de 2X en tampón estéril y se agitan brevemente (5 segundos) en un vórtice de laboratorio. Las muestras de montaje húmedo de la mezcla se examinaron bajo un microscopio usando un aumento de 400X. Las células de levadura adheridas a BEC son claramente visibles y la enumeración de éstas se facilita usando condiciones de campo oscuro; el uso de un diafragma de hemocitómetro Neubauer facilita el recuento. En total se evalúan 100 BEC y el número total de levaduras adheridas se utiliza como el recuento de muestras. El control es equivalente al 100 % de adhesión y la reducción de este número en respuesta al artículo de ensayo o el blanco de proteína se indica como porcentaje de inhibición de la adhesión.

55 Las células epiteliales bucales se recogen de la mucosa de la mejilla interior de los voluntarios frotando un depresor lingual estéril de una manera circular y aclarando las células recogidas en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Las BEC se deben recoger preferentemente por la mañana antes de comer o cepillarse los

dientes. Se necesitan donaciones de 4-5 voluntarios para lograr cinco puntos de ensayo.

Las BEC se agrupan y se cuentan usando el recuento microscópico directo con un portaobjetos hemocitómetro; se puede conseguir un recuento de 500/ml (por ejemplo). La muestra agrupada se centrifuga a 1.500 rpm durante 3 minutos y se volvió a suspender en un volumen de PBS estéril, calculado para conseguir una concentración de 500 BEC por ml. Este concentrado se dividió en partes alícuotas de 5 ml en tubos de centrifuga de 10 ml y se centrifugó de nuevo a 1.500 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se desecha y los sedimentos de células se mantienen en hielo hasta que se utilicen en el resto del ensayo.

La levadura utilizada en estos ensayos es un aislado clínico fresco de *Candida albicans*; puede usarse ATCC 10231 como alternativa, pero todas las cepas de "tipo" de colección de cultivo han perdido cierta virulencia y no se adhieren tan bien como los aislados frescos.

Las células de levadura se mantienen en agar de peptona dextrosa de extracto de levadura (YEPD), y se usa un bucle completo de un cultivo puro para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 ml que contiene 100 ml de caldo YEPD estéril. Los matraces inoculados se incuban durante la noche (10-14 horas) a 37 °C en una incubadora orbital a 100 rpm. El YEPD es: 2 % de glucosa P/V, 1 % de extracto de levadura P/V, 1 % de peptona bacteriológica P/V, Agar cuando se requiere a 1-2 % P/V, todos de Oxoid, Reino Unido.

Las células de fase logarítmica tardía se cuentan con un portaobjetos hemocitómetro y la concentración se ajusta a 100X la concentración de ensayo de BEC (40.000/ml en estos ejemplos), usando tampón de lactato de sodio 50 mM pH 4,5. Se lavan alícuotas de 2,5 ml de la suspensión normalizada de levadura una vez por centrifugación con tampón de lactato sódico a 4000 rpm y se mantienen como un sedimento pendiente del procedimiento de ensayo como se describe a continuación. Se prepara una solución de sustancia de ensayo y blanco de proteína en la concentración requerida en tampón de lactato de sodio 50/100 mM pH 4,5 o tampón de citrato de sodio pH 4,5; a menos que se indique lo contrario, se usaron citratos o tampones de lactato por sí solos como controles para determinar la adhesión total. La albúmina sérica bovina (BSA) se usa como "blanco" de proteína, Sigma-Aldrich A7030; San Luis, Mo, EE.UU. El material es en bruto, «fraccionamiento inicial por choque térmico», ya que las fracciones sin choque térmico pueden contener inmunoglobulina sérica activa que puede contribuir a la inhibición de la adhesión.

Los sedimentos de levadura lavados anteriores se vuelven a suspender en volúmenes de 2,5 ml de soluciones de ensayo, blanco o control y se mantienen a 37 °C durante 10 minutos antes del tratamiento. Cada 2,5 ml de volumen de ensayo, blanco o control (con levadura en suspensión) se utiliza después para volver a suspender un sedimento de BEC lavado anterior. Las suspensiones combinadas se incuban a continuación con agitación suave a 37 °C durante 60 minutos. El uso de una incubadora orbital a 50 rpm proporciona un entorno adecuado.

Después de la incubación, se añaden 2,5 ml de tampón de lactato de sodio 50 mM a pH 4,5 a cada una de las soluciones de ensayo mezcladas y se someten a un pulso de 5 segundos en un vórtice de laboratorio. La finalidad de la disolución final y del vórtice es separar la levadura que se adhieren de forma débil y las células de levadura que están situadas adyacentes, pero no unidas a las BEC. Puede ser necesaria una disolución adicional para facilitar el recuento de la levadura adherente.

El ensayo se puede realizar como un pretratamiento de BEC invirtiendo el orden de resuspensión descrito anteriormente. Las BEC se resuspendieron primero en volúmenes de 2,5 ml de tampón de control, ensayo o proteína en blanco, mantenidos a 37 °C durante 10 minutos y después se utilizó para volver a suspender un sedimento de levadura lavada y el procedimiento se completó como se ha descrito anteriormente.

Ensayo del efecto microbicida/microbioestático:

El ensayo es un ensayo de suspensión microbiológico convencional, en el que las concentraciones conocidas de bacterias, levaduras u hongos en fase logarítmica tardía se inoculan en un volumen o peso fijo de una sustancia de ensayo, blanco o control. Después de un período de tiempo establecido se añade una solución neutralizante para detener el efecto antimicrobiano y la población residual de microorganismos viables se enumera por disolución en serie y placa de recuento. El procedimiento de recuento es un procedimiento microbiológico convencional y básico para enumerar microorganismos viables y es bien conocido por los expertos en la materia.

En su forma genérica, el procedimiento requiere la inoculación de 1 gramo o 1 ml de muestra de ensayo con 0,1 ml de 18 horas (fase logarítmica tardía) seguida de la agitación vigorosa para mezclar. Después de transcurrido el tiempo de exposición predeterminado, se añaden 9 ml de tampón de neutralización y se mezclan. Esto tiene el efecto de detener el efecto microbicida que permite hacer estimaciones confiables del porcentaje de destrucción conseguido por una muestra de ensayo en concreto en el período comprendido entre la inoculación y la neutralización. Normalmente, los períodos de exposición oscilarán entre 30 segundos y 30 minutos y pueden progresar hasta varias horas cuando se requiere ese período de tiempo para medir el efecto. Con el fin de enumerar las células viables residuales y para calcular el porcentaje de destrucción, se realizan disoluciones en serie y recuentos de placas en la muestra de 10 ml más tampón neutralizante.

En los ensayos de la presente invención, las soluciones madre de bacterias, levaduras y hongos se almacenan sistemáticamente en perlas en glicerol al 50 % a -80 °C. Cuando se requieren para el ensayo de

viabilidad/microbicida, se esparcen pequeñas alícuotas de estas poblaciones sobre un agar nutritivo apropiado, se cultivan y subcultivan para asegurar la pureza. Cuando se requieren cultivos de caldo, se inoculan matraces de Erlenmeyer de 250 ml que contienen 100 ml de caldo con un bucle de transferencia desde cultivos de agar puro y se incuban con agitación constante en una incubadora rotativa a 37 °C.

5 Las bacterias se cultivan sistemáticamente usando caldo de infusión de corazón y cerebro (BHI) y agar o agar de triptona de soja o caldo (TSB), los cuales pueden adquirirse en el mercado en Oxoid, Reino Unido. El TSB tiene los siguientes constituyentes: triptona al 1,5 % p/p (digestión pancreática de caseína), peptona al 0,5 % p/p (digestión papaica de harina de soja), 0,5 % p/p de cloruro sódico y agar al 1,5 % p/p cuando se requiere como medio sólido. Las levaduras se cultivan en agar o caldo YEPD (véase el procedimiento de ensayo de adhesión anteriormente en el presente documento).

10 Los tampones de disolución y neutralización utilizados en el presente procedimiento son solución salina tamponada con fosfato (PBS), que contiene cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM y fosfato 10 mM, a la que se le añade polisorbato Tween 80 al 3 % (tensoactivo aniónico), 0,3 % de lecitina y 0,5% de histidina como agentes neutralizantes. Estos agentes "neutralizantes" son los prescritos por las Directrices de la UE para la certificación ISO de la eficacia microbicida y se validaron como adecuados para neutralizar los ácidos grasos libres y la clorhexidina a las concentraciones utilizadas en el presente documento.

15 Algunas especies microbianas son extremadamente difíciles de cultivar, requiriendo medios especializados y/o anaeróbicos que no son fácilmente alcanzables en cultivo líquido. *Clostridium difficile* por ejemplo es un anaerobio y también aerointolerante, que muere rápidamente en presencia de oxígeno. Los patógenos fúngicos como las especies de *Trychophyton* crecen en modo hifas y no pueden ser enumerados usando el procedimiento convencional de disolución en serie. Con el fin de evaluar el efecto microbicida de la invención contra estas especies, se utilizaron técnicas de disolución en agar y se evaluó el cultivo en placa para encontrar la concentración inhibitoria mínima, es decir, la concentración de producto por encima de la cual no se observó crecimiento.

20 La técnica requiere la preparación de concentraciones 10X de la formulación de ensayo para la disolución en 9 volúmenes de agar. Se añadió una alícuota de 4 ml de este concentrado 10X a 16 ml de agar estéril enfriado y se dispensó a una placa de Petri - esto representaba la formulación de concentración completa (100 %) en el medio de agar, que puede expresarse entonces como el porcentaje de concentración de ácido graso microbicida en agar. Otras disoluciones del concentrado 10X con agua destilada estéril y el uso de alícuotas de 4 ml de estas disoluciones en 16 ml de agar enfriado permitieron la preparación de una serie de concentraciones decrecientes del producto en agar. Los organismos de ensayo se inocularon sobre estos agares con un ciclo estéril y la concentración inhibitoria mínima se determinó como la disolución más baja de la muestra en la que no se detectó crecimiento.

Inhibición de la formación de biopelícula:

25 La biopelícula es una fijación y acreción de bacterias planctónicas, levaduras y/u hongos a superficies sólidas. La fijación se facilita generalmente a través de exopolisacáridos secretados por los microorganismos y los estudios sugieren que ocurre más fácilmente en superficies hidrófobas, tales como plástico, y menos fácilmente en superficies hidrófilas tales como acero. La formación de la biopelículas es altamente significativa en la ciencia médica, particularmente su formación en la superficie de los catéteres permanentes, donde puede ser la fuente de las infecciones relacionadas con el flujo sanguíneo del catéter. Muchas especies microbianas diferentes son capaces de forma biopelícula, en medicina. Sin embargo, los de mayor importancia son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura, *Candida albicans*.

30 El modo de formación de biopelícula utilizado en el presente documento se basa en el procedimiento de Christensen y col. *J. Clin. Microbiol.* 22: 996-1006, donde el crecimiento de un organismo seleccionado y su formación de biopelícula en pocillos de placa de microtitulación se mide mediante tinción con cristal violeta y medición de la intensidad (densidad óptica) de la biopelícula teñida en un lector de placa de microtitulación a una longitud de onda de 570 nm. La intensidad de la tinción es una medida de la extensión de la formación de biopelícula y su reducción en la presencia de sustancias inhibitorias se evalúa en base a la reducción de la intensidad de la tinción.

35 El organismo utilizado en este ensayo es *Staphylococcus aureus* RN4220, una variante de restricción deficiente derivada originalmente de NCTC 8325 conocida por su avidez por la formación de biopelícula, particularmente en presencia de niveles en exceso de cloruro de sodio que se añade al medio de cultivo para promover esta característica, el medio de cultivo es 3,7 % de BHI de Oxoid Reino Unido al que se añade un 4 % de NaCl P/V.

40 Se recubren pocillos de placa de microtitulación Nunc (Nunc International, Roskilde, Dinamarca) con la muestra de ensayo y se dispensan a cada pocillo de ensayo disoluciones 1:100 de bacterias en fase logarítmica tardía en BHI suplementado con solución salina fresca y se incuban durante 24 horas para facilitar la formación de biopelícula.

45 Al finalizar el período de incubación, los pocillos se aclaran tres veces con agua destilada estéril, y se secan durante una hora a 60 °C para fijar la biopelícula adherida. La tinción se consigue utilizando una solución al 0,4 % de cristal violeta que se añade a cada pocillo y se agita la placa durante 4 minutos. El exceso de tinte se retira y las placas se aclaran tres veces con agua destilada estéril y se secan. Cuando se seca, la intensidad de la tinción en cada pocillo

se mide utilizando una placa ASYS Hitech UVM-340 a 570 nm (ASYS, Eugendorf, Alemania).

Manipulación de la Hemostasia: Coagulación/Anticoagulación de la Sangre

5 La hemostasia es la capacidad inherente de la sangre para reaccionar a los daños traumáticos mediante la formación de un coágulo para tapar la herida y así prevenir la pérdida excesiva de sangre y facilitar la reparación de tejidos y la curación de la herida. La hemostasia también se refiere a la capacidad inherente de la sangre para permanecer líquida en los vasos sanguíneos no dañados y cumplir así sus funciones de transporte fisiológico primario. Ambos aspectos hemostáticos pueden volverse defectuosos en la enfermedad y ambos pueden desbordarse por daño traumático, ya sea accidentalmente o por defecto durante la intervención quirúrgica.

10 La capacidad de manipular el mecanismo hemostático amplificando la velocidad de coagulación para prevenir la pérdida de sangre después de un traumatismo accidental o prevenir la coagulación durante la reparación quirúrgica y/o para prevenir la formación de coágulos en instrumentos médicos insertados quirúrgicamente incluyendo catéteres, es de gran importancia en medicina. Para medir la velocidad de coagulación de la sangre en el presente documento, se utiliza un medidor de coagulación de sangre entera, Hemochron Signature 11, fabricado por ITC, International Technidyne Corporation, Edison, NJ, EE.UU. El medidor utiliza cubetas personalizadas en las que se puede añadir una gota de sangre fresca y el tiempo necesario para la formación de coágulos se mide ópticamente y se informa electrónicamente por el dispositivo.

20 En el ensayo de la presente invención, se usó sangre de oveja fresca, que se extrajo de una vena yugular usando un Aguja de calibre 18 y una jeringa de volumen adecuado. Las muestras de sangre frescas se mezclan inmediatamente con un volumen de material de ensayo a concentraciones variables y se inserta una gota en la cubeta. Se usa solución salina tamponada con fosfato estéril como blanco para obviar los efectos de la dilución y se usa heparina como un anticoagulante de control. La medición de los efectos anticoagulantes de los productos de la invención es evidente en segundos en comparación con la sangre entera no tratada, y se compara con el efecto anticoagulante de la heparina y otros productos anticoagulantes patentados. En una configuración óptima, los productos de la invención consiguen un efecto anticoagulante que dura más de 1000 segundos, que es comparable a 5.000 U.I. de heparina en condiciones de ensayo similares.

25 La medición del tiempo de coagulación acelerado (coagulación amplificada) no es posible usando el Hemocron como en la mayoría de los casos los productos de la invención alcanzan coagulación en menos de 60 segundos, lo que está "fuera de escala" para el medidor.

30 La medición comparativa de los tiempos de coagulación acelerados se consigue utilizando volúmenes apropiados de sangre fresca mezclada con un volumen de material de ensayo, donde los volúmenes combinados totalizaron 5 ml en cada uno de los casos en un tubo de centrifuga Greiner graduado de 15 ml (Greiner Bio-one, Carolina del Norte, EE.UU.). Inmediatamente después de la adición de sangre fresca, los tubos se invierten dos veces para mezclar y se dejan reposar sin agitación adicional. La formación de coágulos es visible cuando los tubos están ligeramente inclinados, y una vez que se formó un coágulo su integridad era tal que permanecería suspendido cuando los tubos se invertían. En cada ensayo se usa una muestra de 5 ml de sangre entera fresca (no diluida) como control.

Análisis del lípido de membrana y del ácido graso libre

40 La cromatografía líquida de alto rendimiento analítica habitual es un procedimiento adecuado para analizar los componentes lipídicos de la membrana individual en una composición tal como lecitina. El procedimiento es bien conocido por los expertos en la técnica de la cromatografía analítica. Se utiliza en el presente documento un sistema Waters 2420 ELSD HPLC de Waters Corporation, Milford, Massachusetts, EE.UU. Una columna Symmetry C8 (3,0 X 150 mm, una columna de 5 micrómetros es adecuada con un gradiente no lineal de metanol al 82 % en agua que contiene ácido trifluoroacético al 0,1 % y proporciona una separación adecuada de los componentes de lípido de membrana.

Viabilidad de células de mamífero.

45 La reducción en la viabilidad de las células de mamífero en presencia de ácidos grasos libres emulsionados con lípidos de membrana se evaluó utilizando linfocitos B de Raji cultivados en medio RPMI 1640 que contenía suero fetal de ternera al 10 % y suplemento antibiótico Gibco Penstrep 15140. Las células maduras se recogen por centrifugación a 1.000 rpm durante 3 minutos y se vuelven a suspender en RPMI 1640 sin suplementos con fines de ensayo. La toxicidad se evalúa con la absorción de colorante azul de tripano por las células muertas utilizando un contador Invitrogen Celi (Invitrogen inc., Carlsbad, California, EE.UU.). El procedimiento consiste en exponer una población de células B Raji a la solución de ensayo mezclando 100 µl de suspensión de ensayo y de células en un pocillo de placa de microtitulación. Después de un período de exposición predeterminado, se combinan 10 µl de células y mezcla de ensayo con 10 µl de azul de tripano al 0,4 % y 10 µl de esto se añadieron a la cámara de una cubeta citómetro de células y se evaluaron en el contador de células descrito anteriormente. Los resultados se proporcionan como un recuento total de células y los números de éstas que están vivas o muertas basándose en la absorción o exclusión del colorante; se calcula automáticamente un porcentaje de viabilidad.

Breve descripción de los dibujos:

- La figura 1 ilustra el efecto inhibitor antimicrobiano del suero sanguíneo y la acción contraria de este efecto en combinación con sales de ácidos orgánicos, como se describe en el Ejemplo 3.
- 5 La figura 2 ilustra las propiedades de coagulación sanguínea y anticoagulación de diversos componentes de un producto de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 5.
- La figura 3 ilustra las propiedades anticoagulación de una solución de bloqueo de catéter de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 7.
- 10 La figura 4 ilustra la potencia microbicida comparativa de una solución de bloqueo de catéter preparada de acuerdo con la invención y se compara con productos comerciales alternativos, como se describe en el Ejemplo 7.
- La figura 5 ilustra las propiedades inhibitoras de biopelícula de un producto de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 8.
- La figura 6 ilustra la liberación variable de efecto microbicida conseguida usando diferentes lípidos de membrana y productos de ácido caprílico de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 9.
- 15 La figura 7 ilustra la reducción en la viabilidad de *Candida albicans* en respuesta a la liberación adaptada de las características de los productos de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 10.
- La figura 8 ilustra la inhibición de la adhesión de *Candida albicans* por productos de liberación adaptados de acuerdo con la invención, como se describe en el Ejemplo 10.
- 20 La figura 9 ilustra la erradicación de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* de un modelo de herida ex vivo, como se describe en el Ejemplo 12.
- La figura 10 es una comparación de la eficacia ex vivo de un producto de la invención en citrato de sodio con antimicrobianos de cuidado de heridas convencionales, clorhexidina y sulfadiazina de plata, como se describe en el Ejemplo 12.
- 25 La figura 11 ilustra la erradicación comparativa de la biopelícula establecida y la eficacia superior de un producto de la invención sobre soluciones de bloqueo de catéter existentes disponibles en el mercado, como se describe en el Ejemplo 13.
- Las aplicaciones y beneficios prácticos de la presente invención se ilustran adicionalmente en los siguientes Ejemplos. A menos que se indique lo contrario, los lípidos de membrana usados en los Ejemplos se deslipidizan y contienen menos del 3 % de material lipídico extraño conjugado como se muestra por análisis por HPLC como se describe en los Procedimientos.
- 30

Ejemplo 1: Preparación de composiciones inhibitoras de adhesión de lípidos de membrana

Los siguientes lípidos de membrana se adquirieron de Sigma Aldrich, Poole, Dorset, Reino Unido.

Tabla 3: Lípidos de membrana			
Lípido de la Membrana	Compuesto/Componente	Fuente de origen	Código
Fosfolípido	Lecitina en bruto	Soja	LC
Fosfolípido	Fosfatidilcolina	Soja	PTC
Fosfolípido	Fosfatidiletanolamina	Soja	PTE
Fosfolípido	Fosfatidilglicerol	Soja	PTG
Fosfolípido	Fosfatidilinositol	Soja	PTI
Fosfolípido	Fosfatidilserina	Soja	PTS
Esfingolípido	Ceramida	Cerebro Bovino	C
Esfingolípido	Esfingomielina	Cerebro Bovino	SGM
Glucoglicerolípido	Diglicérido de mono-galactosilo	Harina de trigo	MGDG
Colesterol	Lanosterol	Lana de oveja	L

La lecitina en bruto se adquirió de GR Lane Ltd, Gloucester, Reino Unido.

Se prepararon dispersiones acuosas de cada uno de los lípidos de membrana anteriores suspendiendo 1,0 gramos en 100 ml de agua destilada estéril (10 mg/ml) y agitando durante 60 minutos con ayuda de un agitador magnético. La dispersión de ceramida, esfingomiélin y lanosterol se consiguió con la ayuda de ultrasonidos y agitación, mientras que la dispersión de todos los demás lípidos de membrana se logró relativamente fácil con agitación. Las dispersiones de fosfolípidos y glucoglicerolípidos eran relativamente estables, pero otras tenían una tendencia a separarse al reposar y por tanto todas las dispersiones se sometieron a 30 segundos de homogeneización utilizando un homogeneizador de laboratorio inmediatamente antes de su uso en el ensayo de inhibición de la adhesión. Un homogeneizador adecuado es un Modelo Ultra-Turax T18 (IKA Works, Wilmington, NC 28405, EE.UU.) equipado con una herramienta de dispersión S18N-19G, operando a 6000 a 8000 rpm.

Las propiedades inhibitoras de adhesión de cada fosfolípido se sometieron a ensayo como se describe en los procedimientos a concentraciones de 10, 5 y 2,5 mg/ml; las diluciones más bajas se consiguieron diluyendo la dispersión original con agua destilada estéril. Debido a las limitaciones logísticas de la recogida de suficientes células epiteliales bucales en un momento dado, los ensayos se realizaron en bloques de cinco lípidos de membrana individuales en días separados, y los resultados que se muestran en la Tabla 4 son un material compuesto de éstos; el control es la concentración cero del artículo de ensayo y la albúmina sérica bovina (BSA) se utiliza como blanco de proteína.

Tabla 4 Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales					
Código del artículo	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	% de inhibición a 2,5 mg/ml
LC	540	387	291	92	28
PTC	540	127	59	0	76
PTE	496	167	74	0	66
PTG	496	114	62	0	77
PTI	519	201	87	0	61
PTS	519	233	102	39	55
C	484	363	282	109	25
SGM	484	379	277	126	21
MGDG	540	261	128	66	51
L	519	306	236	133	41
BSA	496	400	379	303	19

En la evaluación preliminar de la lecitina pura de diversas fuentes (yema de huevo, soja y girasol), se observó que las propiedades inhibitoras de la adhesión variaban considerablemente, a pesar de que la pureza reportada era aproximadamente la misma. Se razonó que el material comprado podría contener grasa extraña o triglicérido y para eliminar esto, el material original se suspendió en acetona al 10 % P/V y se agitó durante 30 minutos, después de lo cual se dejó sedimentar el lípido de membrana insoluble y se decantó la acetona. La lecitina deslipidizada (DLL, por sus siglas en inglés) se secó en una campana extractora de humos y se evaluaron sus propiedades inhibitoras de adhesión como se ha descrito anteriormente. Los lípidos de membrana restantes enumerados en la Tabla 4 se deslipidizaron de la misma manera. Los lípidos de membrana deslipidizados se analizaron por HPLC como se describe en los Procedimientos, y se mostró que todos contenían menos del 3 % material de lípidos extraños conjugados. Los resultados se muestran en la Tabla 5 a continuación, incluyendo el aumento incremental en el efecto inhibitor de adhesión logrado por la deslipidización de lípidos de membrana individuales.

Tabla 5: Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales					
Código del artículo	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	% de inhibición a 2,5 mg/ml
LC	540	387	291	92	28
DLL	489	138	48	0	71 (+43)
PTC DL	508	132	0	0	84 (+8)
PTE DL	515	139	0	0	73 (+7)
PTG DL	474	57	0	0	88 (+11)
PTI DL	519	68	0	0	77 (+16)
PTS DL	519	145	62	0	72 (17)
C DL	493	305	118	41	38 (+13)
SGM DL	511	301	133	44	41 (+20)
MGDG DL	516	206	116	0	60 (+9)
DLL	536	247	91	49	54 (+13)
BSA DL	513	431	393	329	16 (-3)

- La deslipidización por disolvente aumenta las propiedades inhibitoras de adhesión de los lípidos de la membrana, especialmente de lecitina por un factor de 2,5, lo que la hace coincidir con la de sus componentes individuales: PTC, PTE, PTG, PTI y PTS. La deslipidización adicional de los componentes individuales de la lecitina consigue una mejora adicional en las propiedades inhibitoras de la adhesión de éstos, aunque menos drástica en comparación con el efecto conseguido en la deslipidización de la lecitina en bruto. Se supone en el presente documento que el procedimiento comercial de aislamiento utilizado para extraer componentes individuales de lecitina da lugar a una deslipidización casi completa, por tanto, el efecto inhibitor óptimo de éstos en relación con la lecitina "en bruto" y el menor efecto incremental conseguido por la deslipidización adicional.
- 5 En muchas de las aplicaciones para el producto de la presente invención, la sustancia inhibitora de la adhesión estará en contacto con suero sanguíneo, moco y otros fluidos corporales. Se ha descubierto que las células deslipidizadas de lecitina y la mayoría de sus constituyentes pierden sus propiedades inhibitoras de adhesión en presencia de Albúmina sérica bovina (BSA). También se ha descubierto, sin embargo, que la adición de una sal de ácido orgánico contrarresta este efecto negativo y restaura la mayoría de las propiedades inhibitoras de la adhesión
- 10 al lípido de membrana combinado y BSA.
- 15 En este ejemplo, se usaron soluciones de 100 mM de lactato sódico y citrato sódico. Las sales se prepararon primero como soluciones 200 mM y el pH se ajustó a 4,5, y se usaron alícuotas de ambos para preparar soluciones al 1 % de albúmina sérica bovina (es decir, 1 % de BSA en 200 mM de sal sódica de citrato o lactato a pH 4,5). Las disoluciones salinas se utilizaron para diluir una suspensión al 1 % de lecitina deslipidizada (DLL) y una suspensión al 1 % de fosfatidilcolina (PTC), para conseguir preparaciones de DLL al 0,5 % y PTC al 0,5 % en lactato de sodio/citrato sódico 100 mM a pH 4,5 con BSA al 5 % en cada uno. Una dilución adicional de la suspensión lipídica de la membrana al 0,5 % con agua y el uso de ésta en diluciones a la mitad de solución salina que contenía BSA al 0,5 % proporcionaron una composición de lípido de membrana al 0,25 % en sal 100 mM con BSA al 0,25 %. Se usaron procedimientos similares para preparar soluciones de BSA al 0,25 % y al 0,5 % en agua y en solución de sal orgánica 100 mM: los resultados se presentan en la Tabla 6.
- 20
- 25

Tabla 6: Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales					
Código del artículo	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	% de inhibición a 5 mg/ml
LC: agua	540	387	291	92	46

(continuación)

Tabla 6: Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales					
Código del artículo	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	% de inhibición a 5 mg/ml
DLL: agua	489	138	489	0	90
DLL + BSA agua	396	320	280	ND	30
DLL + BSA Citrato de sodio	396	290	144	ND	63
DLL + BSA Lactato de sodio	396	340	164	ND	58
PTC: agua	540	127	59	0	90
PTC + BSA Agua	474	392	344	ND	28
PTC + BSA Citrato de sodio	474	273	162	ND	66
PTC + BSA Lactato de sodio	474	291	138	ND	70
BSA Citrato de sodio	474	393	369	ND	22
BSA Lactato de sodio	474	408	372	ND	21
BSA: agua	496	438	400	362	12

En este ejemplo, con la excepción de la lecitina en bruto, se demostró que todos los fosfolípidos de membrana sometidos a ensayo tienen propiedades inhibitorias superiores que inhiben la adhesión de *Candida albicans* a células epiteliales bucales. Cuando se deslipidiza con acetona, la lecitina en bruto es tan inhibitoria como sus componentes de fosfolípidos de membrana principales. En combinación con albúmina sérica bovina, el inhibidor de adhesión se elimina, pero se puede restaurar en presencia de soluciones de 100 mM de sales de ácidos orgánicos a pH ácido.

Ejemplo 2:

Preparación y ensayo de combinaciones microbicidas de lípido de membrana y ácido graso libre:

El efecto microbicida del ácido caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 %, preparado como se describe en los Procedimientos, frente a una gama de especies microbianas puede demostrarse usando el ensayo de suspensión microbicida descrito en los Procedimientos. La potencia de este material es tal que la erradicación completa de un inóculo en exceso de 6 en escala logarítmica se puede prever en menos de 6 minutos. Las especies gramnegativas son ligeramente más resistentes que las grampositivas, particularmente aquellas conocidas como productoras de limo, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, donde se cree que la capa de limo protege del contacto con el ácido graso durante algunos minutos adicionales.

La Tabla 7 a continuación ilustra la reducción en la viabilidad de una serie de bacterias y levaduras. Debido al hecho de que los inóculos varían, el último tiempo para alcanzar el 50 % de viabilidad del inóculo se proporciona en la última columna (U.T. 50 %), como medida comparativa de la potencia contra esa especie particular.

Tabla 7: Efecto microbicida: Caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 %									
Organismo	Gram	Tiempo de exposición							U.T. 50 %
		0	60	120	180	240	300	360	
Staph aureus RN4220	positivo	8,53	5,22	3,71	1,61	0	0	0	<120
Staph epidermidis NCTC 11047	positivo	8,27	4,96	2,67	0	0	0	0	<120
Strep pyogenes NCTC 8198	positivo	7,91	5,32	3,33	1,49	0	0	0	<120
Streptococcus faecalis NCTC 12697	positivo	8,11	4,98	2,54	1,66	0	0	0	<120
E. coli ATCC 11698	negativo	8,43	7,17	6,2	5,28	3,64	1,79	0	<240
Salmonella typhimurium NCTC 74	negativo	7,76	5,94	3,52	2,27	0	0	0	<120
Klebsiella aerogenes NCTC 9528	negativo	6,93	5,15	3,37	1,99	0	0	0	<120
A.C de Proteus mirabilis	negativo	7,41	6,61	5,89	3,75	1,59	0	0	<240
A.C de Enterobacter Cloacae	negativo	8,62	6,54	4,94	2,32	0	0	0	<180
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	negativo	8,33	7,13	5,48	4,78	2,92	1,23	0	<240
Pseudomonas fluorescens NCTC 10038	negativo	7,29	6,42	5,13	3,63	1,29	0	0	<240
A.C de Candida albicans	Levadura	6,86	4,39	2,96	0	0	0	0	<120
Candida glabrata NCPF 8750	Levadura	6,74	4,19	2,23	0	0	0	0	<120
A.C de Cryptosporidium neoformans	Levadura	5,97	4,11	2,96	0	0	0		<120
Nota A.C. = Aislado Clínico									
Nota: U.T. 50 % es el último tiempo para lograr una reducción del 50 % en la viabilidad en este ensayo									

Los datos numéricos que se presentan son números logarítmicos donde el número entero es el logaritmo y el decimal el recuento de colonias en ese logaritmo: $6,3 \times 10^5$ por ejemplo se presenta como 5,63 y esta convención se utilizará en todo este documento.

- 5 Por razones de dificultad en el cultivo o debido a requerimientos especiales de crecimiento, la potencia de la formulación frente a anaerobios se determina mediante el procedimiento de Concentración Inhibitoria Mínima como se describe en los Procedimientos y los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8: Concentración Inhibitoria Mínima del Caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 % contra anaerobios y patógenos fúngicos usando la técnica de dilución en agar: El valor de CIM es el % de ácido caprílico en la placa de ensayo		
Organismo	Notas	CIM
Clostridium perfringens ATCC 43150	Anaerobio gramnegativo	> 0,1
Clostridium difficile ATCC 43598	Anaerobio gramnegativo (aero intolerante)	> 0,1
Bacteroides fragilis ATCC 43859	Anaerobio obligado gramnegativo	> 0,2
Fusobacterium nucleatum NCTC 10652	Anaerobio gramnegativo: agar sangre de Columbia de 3 semanas	> 0,3
Desulfovibrio desulfuricans	Anaerobio gramnegativo	> 0,1
Porphyromonas gingivalis	Anaerobio obligado gramnegativo	> 0,1

(continuación)

Tabla 8:
Concentración Inhibitoria Mínima del Caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 % contra anaerobios y patógenos fúngicos usando la técnica de dilución en agar: El valor de CIM es el % de ácido caprílico en la placa de ensayo

Organismo	Notas	CIM
Campylobacter jejunii	Microaerófilo gramnegativo	> 0,075
Actinobacillus Actinomycetemcomitans	Microaerófilo gramnegativo	> 0,1
Corynebacterium diphtheriae	Anaerobio facultativo grampositivo	> 0,1
Treponema denticola	Anaerobio obligado	> 0,2
Mycobacterium tuberculosis	Bacilo de ácido aeróbico rápido de 6 semanas en medio de Lowenstein-Jensen	>0,2

Ejemplo 3: Antimicrobianos de lípidos de membrana en aplicaciones de contacto con sangre:

En común con el efecto negativo sobre las propiedades inhibitoras de adhesión, indicado en el Ejemplo 1, la presencia de albúmina sérica bovina también afecta al efecto microbicida. Sin embargo como en el Ejemplo 1, esto puede superarse mediante la incorporación de una sal de ácido orgánico, a pH ácido.

En este ejemplo se usa una emulsión de aceite en agua de ácido caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 %. Las soluciones 200 mM de ácidos glicólico, acético, láctico y cítrico se ajustaron a pH 4,5 usando hidróxido de sodio 200 mM. Se prepararon soluciones al 10% P/V de Albúmina sérica bovina en cada una de las sales de ácidos orgánicos y en agua como control. Se añadieron alícuotas de 5 ml de la emulsión caprílica al 0,5 % a alícuotas de 5 ml de cada solución salina con y sin BSA y en agua con y sin BSA, dando como resultado dispersiones de emulsión caprílica al 0,25 % en lecitina deslipidizada al 0,2 % dispersada en solución salina 100 mM a pH 4,5 en cada muestra de ensayo.

Se seleccionó E. coli para este Ejemplo, ya que se ha demostrado que es una de las especies más resistentes. La bacteria se cultivó en caldo de Infusión de Corazón y Cerebro durante 18 horas a 37 °C. Se inocularon fracciones de 10 ml de cada muestra de ensayo en el tiempo cero con 1,1 ml del cultivo durante la noche, y se retiraron 1,0 ml de las muestras a intervalos de 3 minutos para determinar la viabilidad de los residuos utilizando procedimientos de dilución en serie y recuento de placas.

Tabla 9: El efecto antimicrobiano se altera por los componentes sanguíneos y se restablece mediante la combinación con sales de ácidos orgánicos
Caprílico al 0,25 % en Lecitina deslipidizada al 0,2 % +Albúmina sérica bovina al 1 - 5 %

	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	tiempo de destrucción
Agua	8,37	4,97	2,23	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Agua + BSA	8,37	7,51	6,42	5,98	5,17	4,93	3,72	3,33	2,21	1,49	0	30
Glucolato	8,37	5,25	2,68	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Glucolato + BSA	8,37	6,62	5,35	3,79	2,41	1,56	0	0	0	0	0	18
Acetato	8,37	5,94	4,21	1,28	0	0	0	0	0	0	0	12
Acetato + BSA	8,37	7,41	6,93	5,24	4,53	3,47	2,18	1,34	0	0	0	24
Citrato	8,37	4,9	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Citrato + BSA	8,37	6,2	4,5	1,93	0	0	0	0	0	0	0	12
Lactato	8,37	5,29	3,19	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Lactato + BSA	8,37	7,1	4,9	1,8	0	0	0	0	0	0	0	12

En un diluyente acuoso el efecto de la BSA al 5 % P/V es reducir la potencia del ácido caprílico al 0,25 % por un factor de 3: el tiempo de destrucción se prolonga de 9 minutos a 27. En combinación con sales de sodio 100 mM de ácidos de citrato y lactato a pH 4,5, el tiempo de destrucción es de 12 minutos, el del glucolato es de 18 minutos y el del acetato es de 24. Los resultados de la combinación con citrato y sales de ácido de lactato con y sin BSA se presentan en la Tabla 9 anterior y se ilustran en la Figura 1.

Ejemplo 4: Uso en seguridad alimentaria

En este Ejemplo se contaminaron deliberadamente secciones de 1 cm³ de carne fresca con cultivos en fase logarítmica de Salmonella enterica y Escherichia coli O157:H7 a temperatura ambiente y se dejaron adherir allí durante 60 minutos. La confirmación de la contaminación se obtuvo mecánicamente macerando las secciones de carne en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y enumerando por dilución en serie y recuento de placas.

Se preparó un lavado de carcasa adecuado pero no óptimo utilizando ácido caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 % y diluyendo X2 con citrato de sodio 200 mM a pH 4,5 como se describe en el Ejemplo 3. El lavado se pulverizó sobre secciones contaminadas de carne vacuna fresca, y el efecto antimicrobiano se evaluó por maceración mecánica, dilución en serie y recuento de placas. Los resultados se presentan en la tabla 10 a continuación:

**Tabla 10:
Reducción de la viabilidad de patógenos en la carne vacuna**

Minutos	Escherichia coli		Salmonella enterica	
	Sin tratamiento	Tratada	Sin tratamiento	Tratada
0	7,14	6,96	6,91	6,61
30	6,98	5,61	6,37	4,59
60	6,56	3,89	6,71	7,73
90	6,82	2,19	6,52	1,29
120	6,69	ND	6,28	ND

Nota: ND = no detectado

Debe apreciarse que la velocidad de destrucción en una superficie porosa como la carne se prolonga debido a la naturaleza de la superficie y el tiempo requerido para permearla.

Ejemplo 5: Uso de lípidos de membrana para manipular el tiempo de coagulación de la sangre:

Como se describe en este Ejemplo, los productos de lípido de membrana usados pueden adaptarse para afectar a la velocidad de coagulación de la sangre además de contribuir con un efecto antimicrobiano significativo.

La velocidad de coagulación sanguínea se determinó usando sangre de oveja recién aspirada y un aparato y procedimientos descritos en la sección Procedimientos. Se usó un medidor de coagulación de sangre activado para medir los efectos anticoagulación y una comparación de tubo visual para evaluar tiempos de coagulación reducidos.

Se descubrió inesperadamente que una dispersión acuosa de lecitina deslipidizada (DLL) amplificará la velocidad de coagulación de la sangre de una manera dependiente de la concentración. Se prepararon concentraciones variables de dispersiones de DLL suspendiendo el peso requerido en un volumen de agua, agitando durante 30 minutos para hidratar y homogeneizando la suspensión con un homogeneizador de laboratorio.

La coagulación de la sangre y/o los efectos anticoagulación se evaluaron usando una proporción del 20 % del producto de ensayo a sangre fresca: en la práctica se añadieron 4,0 ml de sangre fresca de oveja a tubos que contenían 1,0 ml de producto de ensayo, se invirtieron dos veces mezclar y después se dejaron en reposo para la evaluación visual de la reducción del tiempo de coagulación o se aplicó una sola gota a la cubeta de un aparato activado de coagulación de la sangre para la evaluación de efecto anticoagulante (tiempo prolongado para la formación de coágulos).

A medida que aumenta la concentración de DLL en el artículo de ensayo, aumenta la velocidad observada de coagulación sanguínea, es decir, el tiempo de formación de coágulos disminuye de 360 segundos para la sangre entera a aproximadamente 60 segundos o menos a concentraciones de DLL superiores al 1 %.

La adición de ácido caprílico mediante emulsión en DLL también amplificará el efecto de coagulación hasta un punto en el que la concentración en peso es igual o ligeramente superior a la concentración de DLL en peso. A DLL al 0,5 % por sí sola, el tiempo de coagulación es de aproximadamente 125 segundos. La adición de ácido caprílico emulsionado hasta un 0,5 % no afecta significativamente el tiempo de coagulación. Entre el 0,5 % y el 0,75% de ácido caprílico hay una depresión adicional del tiempo de coagulación de 125 segundos a aproximadamente a 40 segundos (un 70 % menos). A continuación, sin embargo, el efecto anticoagulante se invierte y el tiempo de coagulación aumenta con la concentración creciente de ácido caprílico.

Cuando la concentración de DLL se reduce al 0,25 % con una concentración creciente de ácido caprílico, no hay una reducción significativa de la coagulación por encima de la atribuible a la DLL por sí sola. De hecho, a medida que la concentración de caprílico aumenta entre el 0,75 % y el 1,0 %, el tiempo de coagulación se restablece a la normalidad (360 segundos). Aumentar adicionalmente la proporción relativa de ácido caprílico en DLL al 0,25 %, tiene un efecto anticoagulante.

Usando una emulsión de ácido caprílico al 0,25 % en DLL al 0,25 % como patrón (STD, del inglés *standard*), también se puede observar que la adición de concentraciones crecientes de sales de citrato de sodio a pH 4,5 suprime el efecto anticoagulante de DLL en combinación con ácido caprílico. Con una concentración del 0,5 %, el efecto anticoagulante del ácido caprílico al 0,25 % en DLL al 0,25 % se ha suprimido completamente y el tiempo de coagulación se ha restablecido por encima de la normalidad (400 segundos). Un aumento adicional de citrato de sodio en esta composición tiene un efecto anticoagulante progresivamente creciente - hasta 600 segundos en citrato sódico al 2 % en caprilato al 0,25 % emulsionado en DLL al 0,25 %. Los resultados se ilustran en la Figura 2.

20 **Ejemplo 6: Uso de lípidos de membrana antimicrobianos en la coagulación amplificada para el cuidado de heridas**

La capacidad combinada antimicrobiana y de formación de coágulos de los productos de la invención se demuestra en este ejemplo. Puede seleccionarse un ejemplo adecuado de una preparación de lípidos de membrana antimicrobianos con propiedades de formación de coágulos mejorados entre las combinaciones preparadas en el Ejemplo 3. Se usó en el presente documento una dispersión al 0,5 % de DLL en agua destilada estéril con ácido caprílico al 1,0 %. Se observará que no se incluye ninguna sal de ácido orgánico en este ejemplo y se observa además que la ausencia del mismo reduce la potencia antimicrobiana pero no limita el efecto de coagulación. El uso de una carga de ácido caprílico relativamente alta compensa la interferencia de los componentes sanguíneos con el efecto antimicrobiano.

30 Se cultivó un inóculo bacteriano de *E. coli* en caldo de Infusión de Corazón y Cerebro durante 18 horas y se sedimentó un volumen de 10 ml de éste por centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos, el sedimento se suspendió en 1,0 ml del sobrenadante (concentración X10).

35 Dos muestras de sangre fresca de 4,0 ml se dispensaron a dos tubos de centrífuga de 15 ml de Greiner y se inocularon ambos con 0,1 ml de suspensión concentrada de *E. coli*, se inoculó al mismo tiempo una muestra de 5,0 ml de albúmina sérica bovina al 5 % en agua destilada estéril.

Un 1,0 ml de volumen de heparina 400 U.I. y estreptoquinasa 500 U.I. en agua se añadió al primer tubo, y 1,0 ml de preparación de ensayo al segundo. Ambos tubos se mezclaron por inversión y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos. El tubo que contenía la preparación de ensayo se coaguló en aproximadamente 60 segundos; no se detectó coágulo en el tubo de heparina/estreptoquinasa después de 45 minutos.

40 Al final de la incubación de 45 minutos, se añadió 1,0 ml de volumen de heparina 400 U.I. y estreptoquinasa 500 U.I. en agua al tubo coagulado con la preparación de ensayo y se añadió 1,0 ml de agua destilada estéril al segundo. Ambas muestras se homogeneizaron a 1000 rpm durante 2 minutos utilizando un homogeneizador Ultra Turax. El procedimiento de interrupción del coágulo duró aproximadamente 15 minutos (60 minutos de exposición total), después de lo cual se utilizaron procedimientos de disolución en serie y recuento de placas para enumerar la viabilidad bacteriana residual en los tres tubos.

45 El blanco de BSA contenía $6,4 \times 10^7$ células de *E. coli* viables por ml, la muestra de sangre de control (heparina/estreptoquinasa tratada) contenía $8,3 \times 10^5$, y no se recuperaron bacterias viables de la muestra de ensayo.

50 Será evidente para los expertos en la materia que preparaciones tales como las descritas en este Ejemplo pueden aplicarse a heridas en forma de un líquido, pulverización, gel, polvo o vendaje húmedo. También será evidente para los expertos en la materia que las preparaciones descritas pueden añadirse a otros procoagulantes tales como quitina, caolín o alginato para aumentar su efecto procoagulante y añadir un efecto microbicida.

Ejemplo 7: Uso de lípidos de membrana antimicrobianos con efecto anticoagulante en procedimientos quirúrgicos:

55 El ingreso de agentes potencialmente infecciosos durante procedimientos quirúrgicos es una causa de preocupación de máxima importancia entre los profesionales de la salud. El uso de fluidos de irrigación con efectos

antimicrobianos facilita la prevención de esto. Existen también muchos procedimientos quirúrgicos en los que la capacidad para prevenir la coagulación de la sangre es ventajosa, procedimientos de microcirugía, por ejemplo, donde la coagulación preventiva puede ser exacerbada por los implementos utilizados y donde el uso de una solución de irrigación para lavar sangre y fluidos corporales para evitar la oclusión del sitio es deseable. Una aplicación especializada es el uso de anticoagulantes líquidos para llenar el volumen vacío de los catéteres permanentes durante los períodos en que el catéter no está en uso.

En este ejemplo, se prepara una dispersión de lecitina deslipidizada (DLL) al 0,4 % con ácido caprílico al 0,5 % en la misma, como se describe en los Procedimientos. La emulsión se diluye hasta el 50 % de su concentración inicial con citrato de sodio 200 mM a pH 4,5, siendo el resultado ácido caprílico al 0,25 %, DLL al 0,2 % en citrato sódico 100 mM o aproximadamente sal sódica al 2,5% P/V de ácido cítrico a pH 4,5. El citrato sódico se prepara ajustando el pH de ácido cítrico 200 mM con hidróxido sódico 200 mM a 4,5; esto no es lo mismo que el "citrato trisódico" que se usa habitualmente como un agente anticoagulante, porque no todos los residuos de ácido carboxílico han precipitado por adición de sal.

Como se ha descrito anteriormente, el uso de un agente potenciador de la viscosidad para ajustar la viscosidad de la formulación para aproximarse a la de la sangre entera proporciona una ventaja distinta en la prevención de la disolución de una solución de bloqueo del catéter en la punta del catéter debido a la turbulencia del flujo sanguíneo. El dextrano 40 se usa en el presente documento como un agente potenciador de la viscosidad donde se ha encontrado que la inclusión al 20 % P/V proporciona una viscosidad de aproximadamente 4 cP, siendo la viscosidad de la sangre humana entre 3,6 y 6 cP.

La solución emulsionada de bloqueo de catéter de ácido graso libre/lípido de membrana usada en el presente documento (ML CLS, del inglés *membrane lipid catheter locking solution*) tiene los siguientes constituyentes: lecitina deslipidizada al 0,2 % P/V; ácido caprílico al 0,25%; dextrano 40 al 20 %, en citrato de sodio 100 mM (2,5 % P/V), pH 4,5. Se dispensaron alícuotas de esta formulación a tubos de centrifuga Greiner de 15 ml en las siguientes cantidades: cantidades de 0, 0,25, 0,5, 0,75 y 1,0 ml. A cada una de estas alícuotas se les añadieron 5,0, 4,75, 4,5 y 4,25 ml de sangre de oveja fresca, respectivamente. Cada tubo se evaluó consecutivamente con sangre fresca añadida inmediatamente después de ser aspirada. Las respectivas disoluciones en volumen representan el 0, el 5 %, el 10 %, el 15 % y el 20 % en volumen de sangre. Inmediatamente después de la adición de sangre, los tubos se invirtieron dos veces para mezclar y se añadió una sola gota al pocillo de ensayo de un medidor de coagulación de sangre activado por firma de Hemochron.

Se adoptó un procedimiento similar utilizando una solución de 25.000 U.I. de heparina, que al 5 %, 10, 15 % y 20 % proporcionó concentraciones de muestra de 1.250, 2.500, 3.750 y 5.000 unidades por ml de volumen de ensayo.

También se sometieron a ensayo una solución de bloqueo de catéter disponible en el mercado, Duralock de MedComp, que contenía citrato de sodio al 47 % solamente y una composición de azul de metileno al 0,05 %, metil parabenos al 0,15 % y propil parabenos al 0,015 % en citrato de sodio al 7 % (0,24 M), que es una réplica de la formulación informada para Zuragen; y Taurolock de Tauropharm AG que comprendía Taurolidina al 1,35 % en citrato de sodio al 4 % (véase la Tabla 2). Se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control de dilución.

Debe señalarse en el presente documento que el sistema de coagulación sanguínea de Hemochron se basa en un procedimiento de activación de coágulos que acelera el tiempo de formación de coágulos; la sangre entera sin aditivos se coagula en menos de 200 segundos en este aparato. Los tiempos en este experimento no son directamente comparables por tanto con los tiempos de coagulación informados en el Ejemplo 5 donde el valor basal para el tiempo de coagulación normal se muestra como 360 segundos siendo el tiempo observado para la coagulación normal (no activada). También hay que señalar en el presente documento que el medidor Hemochron se va 'fuera del intervalo' a 1.000 segundos de tiempo de coagulación activada y no hay disponibles más registros de tiempo prolongado.

Los resultados se notifican en la tabla 11 a continuación y se ilustran en la figura 3.

Tabla 11: Tiempos de coagulación de sangre activada para diversas soluciones de bloqueo de catéter					
	% de Incorporación en sangre entera				
	0 %	5 %	10 %	15 %	20 %
ML CLS	159	347	537	769	1018
Heparina	159	284	423	601	1023
Duralock	159	300	364	484	722
Zuragen	159	219	265	394	614

(continuación)

Tabla 11: Tiempos de coagulación de sangre activada para diversas soluciones de bloqueo de catéter					
	% de Incorporación en sangre entera				
Taurolock	159	230	310	380	510
Control de PBS	159	163	165	233	296

Nota 1: Las concentraciones de heparina oscilan entre 1.250 U.I. al 5 % y 5.000 U.I. por ml al 20 %

5 En términos de efecto anticoagulante medido, el producto de la invención de este Ejemplo es mejor que 25.000 U.I. de Heparina y considerablemente mejor que Duralock, Zuragen o Taurolock. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se trata de tiempos de coagulación "activados". En la práctica, ninguna de las muestras tratadas -aparte del control de PBS- mostraron ningún signo visual de coagulación incluso después de varias horas.

El efecto antimicrobiano de la formulación en este Ejemplo se sometió a ensayo usando procedimientos similares a los usados en el Ejemplo 6, con la excepción de que los agentes disruptores de coágulos, heparina y estreptoquinasa, se usaron para romper los coágulos en las sangres no tratadas de control.

10 Se concentraron cultivos de caldo de Infusión de Corazón Cerebro de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Escherichia coli* de 18 h y un cultivo de *Candida albicans* de 18 horas cultivado en caldo de extracto de levadura Peptona Dextrosa, X10 mediante centrifugación y se volvieron a suspender en un décimo de volumen de sobrenadante.

15 Se utilizaron alícuotas de 2,5 ml de los concentrados bacterianos para inocular 22,5 ml de volumen de sangre de oveja recién aspirada, se mezcló y la sangre se dispuso como volúmenes de 5,0 ml, 4,75 ml, 4,5 ml, 4,25 ml y 4,0 ml a tubos de centrifuga Greiner que contenían 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml y 1,0 ml de la formulación de ensayo de este Ejemplo.

20 Los tubos inoculados se incubaron durante 45 minutos a 37 °C después de lo cual se añadió 1,0 ml de volumen de heparina 400 U.I. y estreptoquinasa 500 U.I. en agua a todos los tubos y cada uno se sometió a homogeneización a velocidad lenta a 1.000 rpm durante 2 minutos: la única coagulación visible estaba en los tubos de control. Inmediatamente después de que hubieran transcurrido 60 minutos, la disolución en serie y los procedimientos de recuento de placas se utilizaron para evaluar la viabilidad residual en todas las muestras. Con fines comparativos, se repitió el mismo procedimiento con Taurolock, Duralock, Zuragen y Heparina a una carga de dosis máxima de 1,0 ml en 4,0 ml de sangre solamente. Los resultados se presentan en la Tabla 12 y se ilustran en la Figura 4.

Tabla 12: Efecto microbicida comparativo de soluciones de bloqueo del catéter en sangre entera				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>
Tiempo cero	7,69	8,71	8,12	6,67
Tiempo de blanco 60 min	8,19	8,9	8,51	6,33
ML CLS al 5%	4,83	3,62	4,17	3,9
ML CLS al 10%	2,58	1,44	1,97	0
ML CLS al 15%	1,62	0	0	0
ML CLS al 20%	0	0	0	0
Taurolock al 20%	6,53	4,15	4,72	5,72
Duralock al 20%	6,97	6,49	7,78	6,54
Zuragen al 20%	5,56	4,91	5,73	4,28
Heparina 25.000 U.I. al 20%	7,92	8,39	8,22	6,94

5 En este ensayo, el 20 % en volumen de ML CLS de acuerdo con la invención consiguió la erradicación completa de E. coli (8 en escala logarítmica), Staph aureus (8 en escala logarítmica), Strep epidermidis (8 en escala logarítmica) y Candida albicans (6 en escala logarítmica) en una hora en sangre entera: un volumen del 5 % logró una reducción de aproximadamente 4 en escala logarítmica de los inóculos de ensayo al mismo tiempo. De las cuatro preparaciones comparativas (Duralock, Taurolock, Zuragen o Heparina), solo Zuragen y Taurolock tuvieron un efecto microbicida apreciable logrando una reducción de entre 3 y 4 en escala logarítmica en la viabilidad del inóculo de ensayo en una hora; Duralock parece tener un efecto microbioestático mientras que no pudo atribuirse ninguna inhibición microbiana a la heparina.

10 Por lo tanto, la solución de bloqueo de catéter anterior de acuerdo con la invención presenta un mejor efecto de coagulación y un efecto microbicida mucho mayor que los productos convencionales existentes.

Ejemplo 8: Uso de lípidos de membrana en el recubrimiento de superficies antimicrobiano:

15 Un procedimiento adecuado para aplicar un recubrimiento persistente de un producto de acuerdo con la invención implica la emulsión de ácido caprílico al 1 % en lecitina deslipidizada al 0,8 % preparada como se describe en los Procedimientos. Se añade a la emulsión un volumen equivalente de tampón citrato de sodio 100 mM pH 4,5 para obtener una concentración final de ácido caprílico al 0,5 %, lecitina deslipidizada al 0,4 % en citrato de sodio 50 mM. Después se añaden lentamente ocho volúmenes de etanol absoluto a dos volúmenes de la emulsión con agitación vigorosa constante para fabricar el material de recubrimiento en etanol al 80 %.

20 Con el fin de recubrir una superficie de plástico es de preferencia utilizar alguna forma de acondicionamiento superficial que pueda incluir un procedimiento conocido como la descarga corona en la que se genera un campo eléctrico a través de la superficie que imparte una carga residual que facilita la adhesión del recubrimiento aplicado. Después del tratamiento corona, la disolución de etanol descrita anteriormente se pulveriza sobre la superficie y se seca en condiciones de aire forzado a 60 °C. Se pueden aplicar varias capas para construir una capa de recubrimiento antimicrobiano.

25 Puede aplicarse primero una capa base de lípido de membrana a una superficie inerte, y una vez secada y recocida se utiliza para "anclar" una segunda capa de ácido graso libre emulsionado con lípido de membrana deslipidizado de acuerdo con la invención.

30 En este Ejemplo se aplica una disolución en disolvente orgánico de un lípido de membrana a la superficie de un pocillo de placa de microtitulación, se seca y se fija calentando a 60 °C seguido de una aplicación adicional de una suspensión acuosa de ácido caprílico emulsionada en lecitina deslipidizada preparada como se describe en los Procedimientos. La emulsión de lecitina deslipidizada se secó y se recoció al primer recubrimiento de lecitina por calentamiento a 60 °C durante 3 horas. Las placas tratadas con lecitina deslipidizada, sin ácido caprílico se usaron como control y se usaron placas no tratadas para determinar la formación óptima de biopelícula.

35 Se preparó una capa base de lecitina deslipidizada (DLL) suspendiendo DLL al 5 % en peso en etanol al 80 %: agua y dispensando alícuotas de 100 µl de ésta a los pocillos de ensayo. Los pocillos para la determinación de la biopelícula óptima se dejaron sin tratar. Las fracciones de etanol se secaron en una campana de humos y se recocieron a 60 °C durante una hora en un horno. Se preparó una dispersión al 1% P/V de lecitina deslipidizada en agua destilada estéril como se ha descrito en el Ejemplo 1, y se usó un volumen de ésta para emulsionar ácido caprílico al 0,25 %. Se transfirieron alícuotas de 100 µl de DLL o DLL + caprílico al 0,25 %, a pocillos previamente recubiertos con DLL y se secaron en un horno a 60 °C durante 3 horas.

40 Un cultivo de 10 horas de Staphylococcus aureus RN 4220 cultivado en caldo de Infusión de Corazón y Cerebro (BHI), suplementado con cloruro sódico al 4 % se usó como inóculo. El cultivo en fase logarítmica intermedia se diluyó al 1 % con BHI suplementado con cloruro de sodio fresco y 200 µl de éste se añadieron a los pocillos de la placa de microtitulación, se cubrieron y se incubaron.

45 En cada punto de muestreo, se transfirieron 100 µl de cada pocillo a una placa recién preparada para la evaluación de crecimiento por densidad óptica a 570 nm y la placa después se decantó y se lavó con volúmenes copiosos de agua destilada estéril, se secó y se recoció en un horno a 60 °C.

50 Cuando se secó, se añadieron 100 µl de cristal violeta al 0,4 % a cada pocillo, incluyendo controles no tratados. Después de 4 minutos, se eliminó el exceso de cristal y las placas se lavaron de nuevo con volúmenes copiosos de agua para eliminar el exceso de colorante y se secaron de nuevo con la ayuda de un horno a 60 °C. Los resultados se presentan en la tabla 13 y se ilustran en la Figura 5.

TABLA 13: Inhibición de la formación de biopelícula: cultivo de 24 horas	
	Densidad óptica a 570 nm
Crecimiento de control	2,8
Crecimiento planctónico recubierto	2,4

(continuación)

	Densidad óptica a 570 nm
Biopelícula no recubierta	0,9
Biopelícula recubierta con DLL	0,7
DLL + biopelícula inhibida por Cap	0,1

El crecimiento planctónico no recubierto no se ve afectado por el recubrimiento de DLL inhibidora + ácido caprílico. Los pocillos recubiertos con DLL solo (biopelícula revestida con DLL) están ligeramente reducidos, pero en comparación, los pocillos recubiertos con el producto de la presente invención (DLL + Biopelícula inhibida por Cap) están esencialmente libres de cualquier biopelícula: el recubrimiento por sí mismo capta algo del colorante cristal violeta lo que explica un pequeño aumento en la Densidad Óptica en los pocillos de DLL + Cap.

Ejemplo 9: Uso de lípidos de membrana para lograr la liberación sostenida de ácidos grasos libres microbicidas

En aplicaciones terapéuticas se puede obtener una ventaja considerable del uso de combinaciones de emulsiones de lípidos de membrana con características de liberación "adaptadas", lo que facilita un efecto microbicida sostenido en la superficie epitelial.

En este Ejemplo se seleccionaron lípidos de membrana individuales de cada una de las cuatro clases presentadas en la Tabla 1 y fueron los mismos que los usados en los estudios inhibidores de la adhesión en el Ejemplo 1. Se prepararon dispersiones acuosas al 0,4 % de cada uno y se emulsionó caprílico al 0,2 % en cada uno de los procedimientos descritos en los Procedimientos para la lecitina deslipidizada (DLL). También se realizó una muestra de DLL al 0,4 % con caprílico al 0,2 %. Cada una de las preparaciones de lípidos de membrana se diluyó hasta el 50 % de su volumen con citrato de sodio 200 mM a pH 4,5 y, por tanto, cada preparación consistió entonces en ácido caprílico al 0,1 % y lípido de membrana al 0,2 % en citrato de sodio 100 mM a pH 4,5. Debe observarse en el presente documento que esto es menor que la mitad del contenido de ácido caprílico microbicida del elemento de ensayo usado en el Ejemplo 3, Tabla 9.

Se usó la levadura *Candida albicans* en este Ejemplo, y el inóculo se preparó como un cultivo en caldo YEPD de 18 horas como se describe en los Procedimientos. El cultivo de fase logarítmica tardía se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y se volvió a suspender en un décimo de volumen de sobrenadante para concentrarlo X 10.

Se dispensaron muestras de 12,0 gramos de cada preparación de ensayo a tubos de Sterilin y cada uno de ellos se inoculó con alícuotas de 1,2 ml de cultivo de levadura concentrado. Se retiraron muestras de volumen 1,0 ml de estos tubos inoculados a intervalos temporizados durante el transcurso de una hora y se añadieron a 9,0 ml de tampón de dilución que contenía Tween 80 al 3 % para neutralizar. Se realizaron disoluciones en serie y el recuento de placas para enumerar la viabilidad residual como se describe en los Procedimientos. Los resultados se presentan en la Tabla 14 a continuación e ilustran en la Figura 6.

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Blanco	7,13	6,92	6,86	6,69	7,19	6,67	6,93	7,21	6,73	7,17	6,89	6,78	6,84
DLL	6,39	5,64	4,53	3,21	1,96	0							
PTC	6,5	4,84	2,57	1,22	0	0							
PTE	7,32	5,41	3,67	1,88	0								
PTG	6,76	5,93	5,17	4,53	3,68	2,82	1,95	1,14	0				
PTI	7,41	6,11	4,83	3,79	2,32	1,16	0						
PTS	6,8	6,36	5,85	5,23	4,53	3,79	3,13	2,61	1,88	1,1	0		
C	7,24	7,28	6,89	6,54	6,14	5,96	5,32	4,97	4,65	4,29	3,87	3,74	3,32
SGM	6,84	6,55	6,12	5,85	5,42	4,87	4,22	3,76	3,13	2,79	2,22	1,84	1,33

(continuación)

Tabla 14:
Características de liberación variable de los lípidos de membrana: tiempo de destrucción para > 6 en escala logarítmica; Candida albicans

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
MGDG	7,3	6,66	6,1	5,16	4,34	3,32	1,84	0					
L	7,39	6,45	5,86	5,34	4,78	4,21	3,67	2,98	2,33	1,74	1,17	0	

Es evidente a partir de los resultados que las emulsiones de acción más lentas son las de Ceramida y Esfingomielina seguidas de las de Lanosterol, Fosfatidilserina y Fosfatidilglicerol; las emulsiones de acción más rápida son las de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y la combinación de fosfolípidos en lecitina deslipidizada (DLL).

Ejemplo 10: El uso de combinaciones de emulsiones de lípidos de membrana antimicrobianos para fortificar el moco y conseguir un efecto microbicida "adaptado" en la superficie mucosa:

La fortificación mucosa implica la hidratación complementaria, la lubricación y el efecto antimicrobiano potenciado de las secreciones mucosas del ojo, la nariz, la boca, las superficies nasofaríngeas, el tracto gastrointestinal y los genitales. Este Ejemplo describe una preparación adecuada para la fortificación de las secreciones mucosas de la boca y la vagina y más particularmente adecuada para su uso por individuos susceptibles a la candidiasis oral y/o vaginal recurrente) y a otras infecciones bacterianas y víricas comunes que responden a los productos de la presente invención.

Ejemplos de Fortificantes de Mucosa:

Parte A: Una emulsión de lípidos de membrana de acción rápida de ácido caprílico (Cap) se basa en Fosfatidilcolina (PTC) al 0,2 % P/V dispersada en agua destilada estéril, hidratada y homogeneizada como se describe en los Procedimientos y utilizada para emulsionar ácido caprílico al 0,25 % P/V por el procedimiento descrito.

Parte B: Una emulsión de lípido de membrana de acción lenta de ácido caprílico (Cap) se basa en Esfingomielina (SGM) al 0,2 %, dispersada, hidratada y homogeneizada como se describe y después utilizada para emulsionar ácido caprílico al 0,25 % P/V como se describe en los procedimientos.

Parte C: Se ajusta una solución 200 mM de ácido cítrico a pH 4,5 con hidróxido sódico 200 mM. Se agrañadeega un agente de aumento de la viscosidad basado en celulosa (hidroxipropilmetilcelulosa, Methocel E4M de Dow GmbH, Alemania) al 1 % P/V: el polímero se tamiza mientras se agita vigorosamente la solución de citrato sódico y se deja hidratar durante 30 minutos.

Se preparó una preparación de ensayo de PTC + ácido caprílico (PTC + Cap) mezclando cantidades iguales de la Parte A y la Parte C, produciendo una emulsión de ácido caprílico al 0,125 % con PTC al 0,1 % en citrato de sodio 100 mM que contiene Methocel al 0,5 % P/V.

Se preparó una preparación de ensayo de ácido SGM + caprílico (SGM + Cap) mezclando cantidades iguales de la parte B y la parte C, produciendo una emulsión de ácido caprílico al 0,125 % con SGM al 0,1 % en citrato de sodio 100 mM que contenía Methocel al 0,5 % P/V.

Se preparó una preparación de combinación de ensayo que comprendía emulsiones de acción rápida y lenta mezclando PTC + Cap al 30 % con SGM + Cap al 70 % y combinándolo con un volumen igual de parte C (mezcla 30:70), La mezcla 30:70 es una emulsión de ácido caprílico al 0,03 % en PTC al 0,075 % combinado con ácido caprílico al 0,07 % en SGM al 0,0875 % en citrato de sodio 100 mM que contiene Methocel al 0,5 %.

Las propiedades microbicidas y de inhibición de adhesión de las tres preparaciones de ensayo se evaluaron usando el ensayo convencional de viabilidad y de inhibición de adhesión descrito en los Procedimientos. El inóculo para ambos ensayos fue un cultivo de caldo de Candida albicans de 18 horas, cultivado en medio YEPD y concentrado X 10 por centrifugación y resuspensión en un décimo volumen de sobrenadante.

Se dispensaron muestras de 12,0 gramos de cada preparación de ensayo a tubos Sterilin y cada una de ellas se inoculó con alícuotas de 1,2 ml de cultivo de levadura concentrado. Se retiraron muestras de volumen 1,0 ml de estos tubos inoculados a intervalos temporizados durante el transcurso de una hora y se añadieron a 9,0 ml de tampón de dilución que contenía Tween 80 al 3 % para neutralizar. Se realizaron disoluciones en serie y el recuento de placas para enumerar la viabilidad residual como se describe en los Procedimientos. Los resultados se presentan en la Tabla 15 y se ilustran en la Figura 7.

Tabla 15:
Fortificación mucosa: viabilidad de *Candida albicans* en preparaciones de liberación adaptada

Minutos	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55
Blanco	6,81	6,92	6,79	6,85	6,97	6,76	6,84	6,99	6,69	6,95	6,78	6,9
PTC + Cap	6,5	4,84	3,13	1,72	0							
SGM + Cap	6,84	6,55	6,12	5,85	5,42	4,87	4,22	3,76	3,13	2,79	2,22	1,8 4
Mezcla 30:70	6,73	5,21	4,14	3,56	3,12	2,8	2,42	2,16	1,89	1,55	1,33	0,89

El PTC + Cap de acción rápida se comportó como se esperaba reduciendo la viabilidad a cero células detectables en 20 minutos. El SGM + Cap de actuación lenta también fue como se esperaba, con la viabilidad reducida en 5 en escala logarítmica en 55 minutos. La mezcla 30:70 de combinación proporciona un buen ejemplo de un perfil de liberación adaptada, la viabilidad se redujo en más de 2 en escala logarítmica en 10 minutos, una velocidad que era paralela a la de PTC + Cap de acción rápida, a partir de entonces la velocidad microbiciada se ralentizó considerablemente, y se aproximó a la de la SGM + Cap de acción lenta. La mezcla, sin embargo, había logrado una reducción de 1 en escala logarítmica en la viabilidad a los 55 minutos en comparación con el SGM + Cap solamente.

La evaluación de las propiedades inhibitoras de la adhesión de las tres preparaciones se realizó usando el modelo de ensayo de células epiteliales bucales descrito en los Procedimientos y utilizado en el Ejemplo 1. Para la comparación, también se prepararon preparaciones de los dos lípidos de membrana, PTC y SGM, al 0,1 % en tampón de citrato de sodio 100 mM pH 4,5 con Methocel al 0,5 % y se incluyeron en el procedimiento de ensayo.

Los sedimentos de células de levadura lavadas se volvieron a suspender en volúmenes de 2,5 ml de las preparaciones de ensayo (PTC, PTC + Cap, SGM, SGM + Cap, mezcla 30:70 descrita anteriormente y blanco de BSA). Se usó citrato de sodio 100 mM a pH 4,5 para la determinación de la adhesión de control. Después de 10 minutos de pre-exposición, las suspensiones de levadura se utilizaron para volver a suspender los sedimentos de células epiteliales bucales lavadas que se habían recogido y preparado como se describe en los Procedimientos. La levadura y la célula epitelial bucal combinadas en el ensayo, el blanco o el control se incubaron con agitación suave durante 60 minutos a 37 °C, después de lo cual se utilizaron recuentos microscópicos directos usando un portaobjetos hemocitómetro para enumerar el número de levaduras adheridas a 100 células epiteliales bucales: Los resultados se presentan en la Tabla 16 y se ilustran en la Figura 8.

Tabla 16
Fortalecimiento de la mucosa: Inhibición de la adhesión en Preparaciones de liberación adaptada: *Candida albicans* a Célula Epitelial Bucal

	Recuento/100 BEC	% de adhesión	% de inhibición
Blanco	509	100	0
PTC	239	47	53
SGM	374	73	27
PTC + Cap	20	4	96
SGM + Cap	266	52	48
Mezcla 30:70	88	17	83
BSA al 0,5 %	425	83	17

Las propiedades inhibitoras de adhesión de PTC al 0,1 % por sí solo y con ácido caprílico al 0,125 % son considerablemente mejores que las de las preparaciones equivalentes de SGM: como era de esperar la mezcla 30:70 se encuentra a mitad de camino entre los dos.

A partir de los datos de la Tabla 16 también es evidente que el ácido graso emulsionado tiene un efecto sinérgico sobre las propiedades inhibitoras de la adhesión del lípido de la membrana. El porcentaje de reducción en la

adherencia alcanzado con PTC solo (53 %), se reduce en un 43 % adicional en combinación con ácido caprílico.

Debe observarse que, de acuerdo con los datos de viabilidad de la Tabla 16 y como se ilustra en la Figura 7, ninguna de las células de levadura en PTC + Cap es viable después de 20 minutos de exposición y aproximadamente del 50 % al 60 % de las de las otras dos muestras están muertas. Bajo el microscopio, sin embargo, las células de la levadura parecen estar intactas y aunque se han reducido enormemente hay todavía unas pocas evidentes que se adhieren a las Células epiteliales bucales, lo que sugiere que las células muertas son capaces de adhesión y formación de biopelícula.

Ejemplo 11: El uso de lípidos de membrana en la antisepsia de la piel y la prevención de la contaminación cruzada en hospitales y establecimientos de atención a pacientes:

Los procedimientos para evaluar los agentes antisépticos de la piel en formulaciones de lavado y gel están bien establecidos y se describen completamente en los procedimientos oficiales de la UE para la certificación ISO a tenor de EN 1500 (gel para manos) y EN 1499 (jabón líquido).

En este Ejemplo, se usó la *Escherichia coli* relativamente no patógena K12 NCTC 10538 (The National Collections of Industrial and Marine Bacteria Ltd, Reino Unido: *Catalogue of Type Strains* ISBN N.º O9510269 3 3). La bacteria se cultiva de forma habitual y se mantiene en agar o caldo de triptona soja (TSB), que puede adquirirse en el mercado de Oxoid, Reino Unido y tiene los siguientes constituyentes: triptona al 1,5 % p/p (digestión pancreática de caseína), peptona al 0,5 % p/p (digestión papaica de la harina de soja), cloruro de sodio al 0,5 % P/P y agar al 1,5 % P/P cuando se requiere como medio sólido.

Antes de la prueba, los voluntarios se lavan las manos con un jabón suave no antiséptico; un producto adecuado es E45 Emollient Wash Cream de Boots Healthcare, Reino Unido. Después de lavar y secar, se sumergen las manos en un vaso de precipitados de 2 litros que contiene 1 litro de cultivo de *E. coli* de 24 horas en TSB y que contiene no menos de 2×10^8 células viables por ml como se confirmó mediante dilución en serie y recuento de placas. Ambas manos se sumergen en la suspensión contaminante hasta los metacarpianos medianos y se mantienen allí durante 5 segundos, y después se retiran. Se deja escurrir el exceso de fluido contaminante y después se secan al aire las manos en posición horizontal durante 3 minutos.

Para asegurar una contaminación adecuada y establecer un valor previo para enumerar la reducción, las manos se muestrean sumergiendo las puntas de los dedos y el pulgar de cada mano en 10 ml de PBS estéril en una placa de Petri y se frota contra la base de la placa durante 1 minuto. Después del muestreo, se tratan las manos con el producto de la presente invención o Spirigel; se aplican 4 ml de cualquiera de las preparaciones a las manos y se manipulan sobre toda la superficie de ambas manos. Luego se aclaran las manos con agua corriente limpia (potable), que está templada a aproximadamente 37 °C por un período de tiempo de 20 segundos. Después del enjuague, las manos se mantienen en posición vertical mientras un asistente seca las palmas y las muñecas con una toalla de papel. Las puntas de los dedos y el pulgar se muestrean después por inmersión en 10 ml de PBS como se ha descrito anteriormente.

Inmediatamente después del muestreo, antes o después del lavado, se transfirió asépticamente 1 ml del fluido de muestreo a la superficie de una placa de agar de TSB y se extiende sobre ella y se transfiere asépticamente otro 1 ml a 9 ml de PBS estéril y se mezclan y el procedimiento de disolución en serie y recuento de placas transcurre como se ha descrito anteriormente.

Se preparó una preparación de ensayo del producto de la presente invención, que era una combinación de ácido caprílico en fosfatidilcolina al 30 % y ácido caprílico en esfingomielina al 70 % preparado como se describe en los Procedimientos. En este ejemplo, los lípidos de membrana se prepararon como concentrados al 1 % con ácido caprílico al 1 % y se mezclaron a una relación de 30:70.

Se emplea un agente potenciador de la viscosidad para mejorar la reología de la preparación de ensayo. En ese caso se usó un copolímero de Carbopol, Pemulen TR-1 de Noveon Inc, Cleveland Ohio, al 0,45 %. El polímero se añadió a un volumen de etanol absoluto equivalente al 70 % del volumen de preparación final y se dejó dispersar en el mismo durante 30 minutos. A continuación se añadió un volumen del 30 % de mezcla 30:70 del producto de la presente invención como se ha descrito anteriormente al etanol y el polímero con agitación constante para facilitar una rápida dispersión.

El producto de ensayo final contiene:

Ácido caprílico al 0,045 % en Fosfatidilcolina al 0,045 %; Ácido caprílico al 0,105 % en Esfingomielina al 0,105 %; Polímero de carbopol al 0,45 %; agua al 29,25 %; etanol al 70 %.

Se informa que Spirigel contiene etanol al 70 %, agua al 30 % y una cantidad desconocida de agente potenciador de la viscosidad.

En este ejemplo, tanto el producto de ensayo como el Spirigel se usaron inmediatamente después de la contaminación experimental de las manos de los voluntarios para evaluar la descontaminación y ambos se usaron

en manos recontaminadas experimentalmente 10 minutos después de la aplicación de Spirigel y la preparación de ensayo de acuerdo con la invención; los resultados se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17: Efecto persistente de lípidos de membrana de liberación adaptada en la antiseptia de la piel		
	Spirigel	Artículo de ensayo
Contaminación previa al tratamiento	6,42	6,69
Contaminación posterior al tratamiento, es decir, viabilidad residual	3,23 (-3,19)	3,42 (-3,27)
Aplicación previa 10 min antes de la contaminación (tratamiento 10 min antes de la contaminación)	No aplicable	No aplicable
Contaminación: 10 min después del tratamiento	6,42	6,59
Contaminación: 10 min después de la aplicación, es decir, células viables recuperadas para la contaminación 10 min después de la aplicación	5,97	2,67 (-3,3)

5 Como era de esperar del contenido de alcohol, cuando se usaron inmediatamente después de la contaminación ambos productos lograron reducciones de la contaminación aplicada mayores de 3 en escala logarítmica. Cuando se usó en las manos 10 minutos antes de la contaminación, sin embargo, el contenido de alcohol de ambos productos se había evaporado en el momento en que se aplicó la contaminación, y los resultados muestran que Spirigel no tuvo efecto residual significativo (reducción de 0,45 en escala logarítmica). La naturaleza persistente de la emulsión de lípido de membrana de ácido graso todavía estaba presente en las manos en el artículo de ensayo, y alcanzó una reducción de más de 3 en escala logarítmica. El Spirigel tiene un efecto antimicrobiano inmediato pero no persistente, mientras que el artículo de ensayo de acuerdo con la presente invención tiene a la vez efectos microbicidas inmediatos y persistentes.

Ejemplo 12: Uso de emulsiones de lípidos de membrana en el cuidado de heridas

15 Para ilustrar la utilidad potencial del producto de la presente invención en el cuidado de heridas se usa un modelo ex vivo que emplea secciones recién sacrificadas de pecho de ternera. El pecho tiene una distribución óptima de músculo magro, grasa y colágeno y, por consiguiente, se considera que es representativa de todas las superficies potencialmente infectadas de la herida. Las secciones del pecho se cortan inmediatamente después de la matanza, sin refrigeración y con la membrana externa de la fascia, que se dividen en condiciones asépticas en cubos de aproximadamente 1 cm cuadrado. Los cubos preparados se "infectan" sumergiéndolos en cultivos de bacterias en fase logarítmica tardía durante un minuto, se secan y se suspenden en una muestra de 37 °C durante una hora para facilitar la adhesión bacteriana y la colonización de las superficies de la carne.

20 Un ejemplo adecuado de una formulación para el cuidado de heridas es la "formulación convencional" de la presente invención (que contiene ácido caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 %) diluida 1:1 en tampón citrato de sodio 200 mM a pH 4,5, que consiste entonces en ácido caprílico al 0,25 % en DLL al 0,2 % en tampón de citrato sódico 100 mM a pH 4,5.

25 Las secciones de ensayo de carne infectada se tratan pulverizando la formulación de cuidado de la herida directamente sobre la superficie infectada y evaluando las muestras de ensayo para determinar la biocarga residual a tiempos de exposición predeterminados. La infección y su erradicación se confirman por maceración mecánica de las secciones tratadas y no tratadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril y la enumeración de la carga biológica mediante técnicas microbiológicas convencionales de disolución en serie y recuento de placas.

30 Los resultados típicos se presentan en la Figura 9, donde más de 7 en escala logarítmica de las bacterias que habitualmente infectan heridas, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* se muestran erradicados en menos de 120 minutos. Debe apreciarse que la velocidad de destrucción en una superficie fisurada tal como una herida se prolonga debido a la naturaleza de la superficie y al tiempo requerido para que la formulación penetre en el asiento de la infección.

35 En la Figura 10 se presenta una comparación de la potencia relativa de la formulación convencional en tampón citrato como se ha indicado anteriormente con los antimicrobianos alternativos y comúnmente usados, el gluconato de clorhexidina y la sulfadiazina de plata. A los 100 minutos de exposición el producto de la presente invención prácticamente ha erradicado 7 en escala logarítmica de *Staphylococcus aureus*: 1 en escala logarítmica permanece bajo tratamiento con clorhexidina y 3,5 en escala logarítmica con sulfadiazina de plata.

Ejemplo 13

El uso quirúrgico de los lípidos de membrana en la prevención y la interrupción de la biopelícula

El *Staphylococcus aureus* RN4220 es conocido por su capacidad para formar una biopelícula tenaz en condiciones de laboratorio cuando se cultiva con estrés en presencia de cloruro de sodio. El microorganismo se cultivó hasta la fase logarítmica media (10 horas) en caldo de Infusión de Corazón y Cerebro y se utilizaron volúmenes de 20

microlitros para inocular pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 180 µl de BHI suplementado con cloruro de sodio al 4 %. Cuando se incubaba a 37 °C en estas condiciones durante 6 horas se forma un biopelícula apreciable en la base de cada pocillo. La biopelícula se cuantifica decantando el cultivo y lavando los pocillos con agua destilada estéril, después de lo cual las placas se secan y se tiñen con cristal violeta al 0,4 %, se vuelven a lavar y se secan; la Densidad Óptica de la biopelícula teñido se mide a 570 nm.

A partir de ejemplos anteriores estará claro que la incorporación del producto emulsionado de lípidos de membrana la presente invención tendrá un efecto microbicida, impidiendo el crecimiento y la formación de la biopelícula. Como se ilustra en el presente documento donde ya existe biopelícula, sin embargo, el contacto con una emulsión de lípido de membrana y ácido graso libre matará con eficacia todas las bacterias viables en la biopelícula e interrumpirá la película por sí mismo.

La evaluación de la reducción de la viabilidad de una biopelícula establecida preparada como se ha descrito anteriormente se obtuvo incorporando Alamar Blue al 10 % en volumen en caldo BHI fresco y recargando los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con biopelícula preformada. El Alamar Blue es un indicador redox de Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido. Transmite un color azul intenso a los medios, y cuando se reduce por la actividad metabólica microbiana, el color cambia de azul no fluorescente a rojo altamente fluorescente; la absorción y la fluorescencia emergente se pueden medir a 570 nm y 600 nm.

Los pocillos de placa de microtitulación que contenían biopelícula preformada se trataron con la CLS de lípido de membrana (ML CLS) utilizado en el Ejemplo 7 y los pocillos similares también se trataron con Zuragen, Duralock y Taurosept durante períodos de tiempo que iban desde cero a 60 minutos. Al final de cada período de exposición, las placas se decantaron y lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 80 al 3 % y dos veces con agua destilada estéril. Se añadieron 200 µl de BHI que contenía Alamar Blue al 10 % a los pocillos y las placas se incubaron durante 60 minutos. No hubo cambio de color detectable en ninguno de los pocillos tratados con la CLS de lípido de membrana de la presente invención que indica la erradicación completa de la viabilidad dentro del biopelícula en menos de una hora. Todos los pocillos tratados con Zuragen, Duralock o Taurosept habían cambiado de azul a rojo demostrando poca o ninguna reducción en la viabilidad en el biopelícula establecido. La eficacia de la CLS de lípido de membrana de la presente invención y la ineficacia comparable de las otras tres formulaciones en la reducción de la cantidad real de biopelícula preformada se pueden demostrar usando procedimientos similares.

Se trataron pocillos de placa de microtitulación que contenían biopelícula preformada con las cuatro formulaciones durante períodos de tiempo de cero a 60 minutos, se decantaron y se lavaron como se ha descrito anteriormente. Las placas tratadas se secaron y se tiñeron con cristal violeta al 0,4 %, se secaron y se registró la intensidad de la tinción como una medida de la biopelícula residual a 570 nm. Los resultados se ilustran en la Figura 11, en la que es evidente que aunque se ha conseguido cierta reducción en la biopelícula con Zuragen, Duralock y Taurosept, no tiene importancia en comparación con la erradicación casi total de la biopelícula obtenida con la CLS de lípido de membrana (ML CLS) de la presente invención.

Ejemplo 14

Propiedades inhibitoras de la adhesión comparativa

La lecitina deslipidizada es una sustancia inhibitora de la adhesión más potente en comparación con las apoproteínas del suero de leche del documento WO 03/018049, en el que las apoproteínas se general mediante hidrólisis por lipasa de proteínas de suero de leche. Para la comparación inhibitora de la adhesión, se preparó un hidrolizado de proteína de suero de leche como se describe en el documento WO 03/018049 usando concentrado de proteína de suero de leche Carbelac 80. También se probó simultáneamente un aislado de proteína de suero de leche (Provon 190 de Glanbia PLC). Con fines de comparación completa se preparó una formulación de ácido caprílico al 0,5 % P/V en lecitina desnitrificada al 0,4 % P/V en citrato de sodio 100 mM, pH 4,5, como se describe en los Procedimientos y se incluyó en la secuencia de ensayo. Todos los artículos de ensayo se dispersaron en tampón de lactato de sodio 100 mM a pH 4,5. Los resultados se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 18						
Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales						
	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	% de inhibición a 5mg/ml
Carbelac 80	483	395	320	260	189	33
Provon 190	514	313	277	113	53	46
Digestión por lipasa de Carbelac 80	491	330	154	48	0	68
Lecitina deslipidizada (DLL)	504	130	33	0	0	93

(continuación)

Tabla 18 Candida albicans por cada 100 células epiteliales bucales						
	0 mg/ml	2,5 mg/ml	5,0 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	% de inhibición a 5mg/ml
Caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 %	517	46	0	0	0	100

Aunque la lecitina deslipidizada por sí misma es significativamente mejor que la preparación basada en tres lácteos, la combinación emulsionada de lecitina deslipidizada y ácido caprílico es la más potente.

Ejemplo 15: Efecto microbicida comparativo

- 5 La CIM por la técnica de disolución en agar también se utiliza en el presente documento para demostrar la potencia superior de la "formulación convencional" descrita anteriormente sobre el producto desvelado en el documento WO2009/072097 que comprende una mezcla de ácidos grasos libres emulsionados en el aislado de proteína de suero de leche, Provon 190 de Glanbia PLC. El producto del documento WO2009/072097 contiene un 28 % en peso de mezcla de ácidos grasos libres, mientras que la formulación convencional de la presente invención contiene solo el 0,5 % en peso. Con el fin de hacer una comparación adecuada entre los dos productos, el producto del documento WO2009/072097 se diluyó a 5/28 en agua destilada estéril para obtener una dispersión que comprendía un 5,0 % de ácido graso libre que después se diluyó adicionalmente y se usó para preparar placas de agar que varían del 1,0 % de ácido graso libre al 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,075 %, 0,05 % y 0,025 % (de contenido en ácidos grasos).
- 10
- 15 Para una comparación adicional, se construyó una emulsión usando ácido caprílico al 0,5 % en Provon 190 al 0,4 % usando el agente de emulsión del documento WO2009/072097 en lugar de lecitina deslipidizada. Los resultados se muestran en la Tabla 19 a continuación.

Tabla 19 Valores comparativos de CIM			
Organismo de ensayo	Producto del documento WO/2009/072097	Caprílico al 0,5 % en Provon 190 al 0,4 %	Formulación de la invención que contiene ácido caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 %
Staph aureus RN4220	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,1 %
Staph epidermidis NCTC 11047	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,1 %
Strep pyogenes NCTC 8198	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,075 %
Strep faecalis NCTC 12697	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,075 %
E. coli ATCC 11698	>1,0 %	>1,0 %	> 0,4 %
Salmonella typhimurium NCTC 74	> 0,8 %	> 0,8 %	> 0,3 %
Pseudomanas aeruginosa ATCC 27853	>1,0 %	>1,0 %	> 0,5%
Pseudomanas fluorescens NCTC 10038	>1,0 %	>1,0 %	> 0,5%
A.C. de Candida albicans	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,075 %

(continuación)

Tabla 19 Valores comparativos de CIM			
Organismo de ensayo	Producto del documento WO/2009/072097	Caprílico al 0,5 % en Provon 190 al 0,4 %	Formulación de la invención que contiene ácido caprílico al 0,5 % en DLL al 0,4 %
Candida glabrata NCPF 8750	> 0,4 %	> 0,7 %	> 0,1 %

Para los dos estafilococos, los dos estreptococos y la Candida sp, la CIM medida para la formulación convencional es un cuarto o menos que la del producto del documento WO2009/072097, lo que indica una potencia cuatro veces mayor. En el caso de las dos Pseudomonas sp, E. coli y Salmonella, la CIM medida es de una mitad a un tercio menos que la del producto del documento WO2009/072097 demostrando nuevamente claramente una potencia significativamente mayor. Las CIM medidas para la emulsión de ácido caprílico en Provon 190 son significativamente mayores (significativamente menos potentes) que la formulación convencional de la presente invención.

Ejemplo 16

Efecto comparativo microbicida e inhibidor de la adhesión de diferentes ácidos grasos libres en forma tanto emulsionada como libre

Los ácidos grasos en forma libre (no emulsionados) tienen un efecto microbicida relativamente pequeño principalmente debido a su insolubilidad en medio acuoso. La emulsión en lípidos de membrana como se describe en este documento expande el área superficial relativa del ácido graso y facilita su dispersión en medio acuoso. El agente de emulsión de lípidos de membrana también facilita el contacto y la transferencia del ácido graso a una superficie celular microbiana. Como se ilustra en los Ejemplos anteriores, la lipofilia variable entre diferentes lípidos de membrana afecta a la velocidad del efecto microbicida. En general, los lípidos de membrana son agentes de emulsión superiores, que presentan un efecto microbicida superior como se ha demostrado en el Ejemplo 15. Como se demuestra en el presente documento la potencia superior del ácido graso libre emulsionado con lípidos de membrana se extiende a través de una gama de ácidos grasos microbicidas.

Se prepararon siete emulsiones separadas de siete ácidos grasos libres diferentes al 0,5 % P/V en lecitina desnitridada al 0,4 % P/V como se describe en los procedimientos. Se prepararon emulsiones a temperaturas por encima de los puntos de fusión de los ácidos grasos libres individuales: caproico, caprílico y pelargónico a temperatura ambiente (20 °C); cáprico y undecilénico a 37 °C, el ácido láurico se emulsionó a 50 °C y mirístico a 60 °C. Una mezcla de un 50 % de ácido caproico y un 50 % de ácido láurico tiene un punto de fusión de menos de 28 °C al igual que una mezcla de ácido láurico al 40 % en aceite de bálsamo de limón, y éstos se emulsionaron a 37 °C.

Se evaluó el efecto microbicida comparativo de cada ácido graso individual y su mezcla en forma libre no emulsionada y emulsionada en lecitina deslipidizada usando la prueba de suspensión microbicida descrita en los procedimientos. La evaluación del efecto microbicida de los ácidos grasos libres no emulsionados se ve frustrada por su insolubilidad. La inclusión de la forma no emulsionada se consideró necesaria para ilustrar el incremento exponencial de la potencia en la forma emulsionada. Cada ácido graso libre se preparó al 0,5 % P/V en agua y se agitó vigorosamente para dispersar seguido del pipeteado inmediato de alícuotas de 1,0 ml a los contenedores de ensayo, antes de la inoculación con el organismo de ensayo. El organismo de ensayo fue Staphylococcus aureus RN 4220 cultivado hasta la fase logarítmica tardía en el caldo de Infusión de Corazón y Cerebro. Los resultados se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 20: Efecto microbicida comparativo Ácidos grasos libres o mezclas de los mismos al 0,5 % P/V no emulsionados en el ensayo y al 0,5 % P/V emulsionados en lecitina deslipidizada al 0,4 % P/V en el ensayo.							
Ácido graso o mezcla	Tiempo de Exposición en Segundos a los 37 °C						
	0	60	120	180	240	300	360
Ácido caproico libre	7,87	7,17	6,82	7,57	6,93	6,47	6,73
Ácido caproico emulsionado	7,87	6,21	4,89	2,53	0	0	0

(continuación)

Tabla 20: Efecto microbicida comparativo Ácidos grasos libres o mezclas de los mismos al 0,5 % P/V no emulsionados en el ensayo y al 0,5 % P/V emulsionados en lecitina deslipidizada al 0,4 % P/V en el ensayo.							
	Tiempo de Exposición en Segundos a los 37 °C						
Ácido caprílico libre	6,94	6,79	6,83	6,21	6,33	5,89	6,17
Ácido caprílico emulsionado	6,94	5,32	3,71	0	0	0	0
Ácido pelargónico libre	6,94	6,55	6,31	5,96	5,67	5,83	5,27
Ácido pelargónico emulsionado	6,94	4,63	2,99	1,81	0	0	0
Ácido cáprico libre	6,94	6,32	6,48	6,73	6,36	5,97	6,11
Ácido cáprico emulsionado	6,94	4,79	3,44	2,19	0		
Ácido undecilénico libre	7,87	7,19	6,99	6,57	6,83	6,67	6,31
Ácido undecilénico emulsionado	7,87	4,97	2,69	0	0	0	0
Ácido láurico libre	7,87	7,35	7,77	7,41	7,98	7,23	7,65
Ácido láurico emulsionado	7,87	5,79	4,63	3,86	2,55	0	0
Ácido mirístico libre	7,38	7,27	7,84	6,93	7,11	6,26	6,84
Ácido mirístico emulsionado	7,38	6,46	5,81	5,21	4,98	3,69	2,99
Láurico caproico Libre 50:50	7,38	6,99	7,18	6,74	6,37	6,95	6,81
Láurico:caproico emulsionado	7,38	6,76	5,32	3,17	2,98	0	0
Láurico al 40 % en aceite de bálsamo de limón	7,38	7,21	7,76	7,39	6,95	6,87	6,49
Láurico al 40 % emulsionado en Aceite de bálsamo de limón	7,38	5,92	3,13	2,77	0	0	0
Lecitina deslipidizada al 0,4 % P/V	7,33	7,92	7,41	6,83	7,14	7,66	6,95
Se realizaron determinaciones en blanco en todos los ensayos suspendiendo el inóculo en solución salina tamponada con fosfato a 37 °C y no se detectó ninguna reducción en la viabilidad del inóculo durante el período de exposición de seis minutos en ninguna secuencia de ensayo.							

5 Los ácidos grasos libres en forma no emulsionada consiguen en el mejor de los casos una reducción de 1 en escala logarítmica en la viabilidad durante el período de ensayo de 6 minutos. El agente emulsionante lipídico de la membrana (lecitina deslipidizada) ejerce igualmente poco o ningún efecto microbicida. En comparación, con la excepción del ácido mirístico emulsionado, las emulsiones equivalentes en peso de todos los otros ácidos grasos y mezclas de los mismos en lecitina deslipidizada reducen la viabilidad residual en un inóculo de ensayo de 6,94 a 7,87 en escala logarítmica a cero en menos de 4 minutos.

10 Ni los ácidos grasos libres por sí solos ni el lípido de membrana deslipidizado por sí mismo tienen ningún efecto microbicida detectable dentro del marco temporal del presente ensayo. Una combinación emulsionada de los dos permite el efecto microbicida del ácido graso sinérgicamente.

Los mismos elementos de ensayo utilizados en la evaluación microbicida anterior se sometieron a ensayo también para determinar sus propiedades inhibitoras de la adhesión usando el ensayo de células epiteliales bucales descrito en los Procedimientos.

Tabla 21: Efecto inhibitor de la adhesión comparativo				
Ácidos grasos libres o mezclas de los mismos al 0,5 % P/V no emulsionados en el ensayo y al 0,5 % P/V emulsionado en lecitina deslipidizada al 0,4 % P/V en el ensayo.				
Ácido graso o mezcla	Recuento del blanco/100 BEC	Recuento del ensayo/100 BEC	% de adhesión	% de inhibición
Ácido caproico libre	429	380	89	11
Ácido caproico emulsionado	503	0	0	100
Ácido caprílico libre	429	400	93	7
Ácido caprílico emulsionado	503	0	0	100
Ácido pelargónico libre	429	360	84	16
Ácido pelargónico emulsionado	503	2	0,3	99,7
Ácido cáprico libre	429	386	90	10
Ácido cáprico emulsionado	503	0	0	100
Ácido undecilénico libre	521	448	86	14
Ácido undecilénico emulsionado	508	0	0	100
Ácido láurico libre	474	450	95	5
Ácido láurico emulsionado	508	56	11	89
Ácido mirístico libre	474	436	92	8
Ácido mirístico emulsionado	508	68	13	87
láurico caproico Libre 50:50	474	450	95	5
Láurico:caproico emulsionado	508	0	0	100
Láurico al 40 % en aceite de bálsamo de limón	526	460	87	13
Láurico al 40 % emulsionado en Aceite de bálsamo de limón	526	0	0	100
Lecitina deslipidizada al 0,4 % P/V	497	96	19	81

La lecitina deslipidizada por sí sola en el ensayo alcanza un 81 % de inhibición de la adhesión. Las emulsiones caproicas, caprílicas, pelargónicas, caprásicas y undecilénicas logran una inhibición superior al 99 %, y las emulsiones de ácido láurico y mirístico alcanzan una inhibición superior al 86 %. Todos los ácidos grasos libres no emulsionados alcanzan menos del 17 % de inhibición. El efecto inhibitor de la adhesión del ácido caprílico, por ejemplo, se amplifica por un factor de 14 en forma emulsionada.

5

A las concentraciones del producto de ensayo utilizado en la Tabla 21, el efecto inhibitor de la adhesión está esencialmente inundado por el efecto microbiciada intrínseco. Se ha demostrado que la mayoría de las células microbianas estarán muertas como resultado de la exposición al efecto microbiciada del ácido graso emulsionado, y debe suponerse que esto influirá en la adhesión.

10 Se puede obtener una medida más apropiada del efecto inhibitor de adhesión amplificado atribuible a emulsiones frente a lípidos de membrana de ácidos libres o no emulsionados usando una concentración por debajo de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del ácido graso libre emulsionado. La CIM del ácido caprílico en la formulación de la presente invención es mayor del 0,1 %.

15 Una formulación de caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 % (como se ha utilizado anteriormente) se diluye en un factor de 5 en agua destilada estéril para conseguir una concentración de caprílico al 0,1 % en lecitina deslipidizada al 0,08 % y se diluye adicionalmente a la mitad para conseguir caprílico al 0,05 % en DLL al 0,04 %. Estas disoluciones junto con las mismas concentraciones de DLL y ácido caprílico libre no emulsionado se sometieron a ensayo en el ensayo de células epiteliales bucales como anteriormente. Los resultados se presentan

en la Tabla 22.

Tabla 22: Efecto inhibitorio de la adhesión a dosis baja Ácido caprílico al 0,1 % P/V y al 0,05 % P/V no emulsionado en el ensayo y al 0,1 % P/V y al 0,05 % P/V emulsionado en DLL al 0,08 % P/V y al 0,04 % P/V respectivamente en el ensayo, junto con DLL no emulsionada al 0,08 % y al 0,04 %.				
	Recuento del blanco/100 BEC	Recuento del ensayo/100 BEC	% de adhesión	% de inhibición
Ácido caprílico libre al 0,1 %	489	466	95	5
Ácido caprílico libre al 0,05 %	487	459	94	6
DLL al 0,08 %	533	421	85	15
DLL al 0,04 %	509	453	87	13
Caprílico al 0,1 % en DLL al 0,08 %	499	255	51	49
Caprílico al 0,05 % en DLL al 0,04 %	513	303	59	41

Como se ilustra en la Tabla 22, la adición de ácido caprílico a concentraciones por debajo de su CIM (0,1 % y 0,05 %) amplifica el efecto inhibitorio de la adhesión de la DLL al 0,08 % y la DLL al 0,04 % en más de un factor de tres en ambos casos.

5 Ejemplo 17: Reducción del efecto antagonista en células de mamíferos

Las membranas celulares de mamíferos son susceptibles a la alteración por los ácidos grasos libres de una manera no disímil a su efecto sobre las membranas celulares microbianas. El efecto no es la toxicidad celular clásica ya que se relaciona con daño superficial celular y no interfiere con el proceso metabólico o la replicación de ácidos nucleicos. Mejora significativamente por los fluidos corporales en vivo. La protección contra el daño de la membrana celular de mamífero puede aumentarse añadiendo cantidades adicionales de lípido de membrana libre a una emulsión de lípido de membrana de un ácido graso libre. El efecto protector no se limita al uso de lípidos de membrana. Como se ilustra en el presente documento, el aislado de proteína de suero de leche también sirve como una barrera adecuada, aunque no óptima, contra el daño de células de mamífero.

El artículo de ensayo es una emulsión de ácido caprílico al 0,5 % en lecitina deslipidizada al 0,4 % preparada como se describe en los Procedimientos y combinada con un volumen igual de citrato sódico 200 mM a pH 4,5 preparado también como se describe en los Procedimientos. Se prepararon dispersiones de lecitina deslipidizada al 0,4 % y al 0,8 % en citrato de sodio 200 mM a pH 4,5 y se combinaron en volúmenes iguales con alícuotas del emulsión de ácido caprílico en lecitina deslipidizada para obtener emulsiones de ácido caprílico al 0,25 % en lecitina deslipidizada al 0,2 % en suspensión en una solución acuosa de citrato de sodio 100 mM a pH 4,5 a la que se añaden cantidades adicionales de lecitina deslipidizada al 0,2 % o al 0,4 %, éstas se describen como Ensayo + DLL al 0,2 % o Ensayo + DLL al 0,4 %.

Se prepararon suspensiones similares de la misma emulsión en dispersiones de citrato de sodio de un aislado de proteína de suero (APS) (Provon 190 de Glanbia PLC) y con suero bovino con fines comparativos. Estos se describen como Ensayo + APS o BSA al 0,2 % o Ensayo + APS o BSA al 0,4 %.

Se cultivaron linfocitos B Raji como se describe en los Procedimientos y la viabilidad después de una exposición de 60 minutos a las diversas soluciones de ensayo se evaluó utilizando un medidor de viabilidad celular Invitrogen Countess como se describe en los Procedimientos. Los resultados se presentan en la tabla 23 a continuación.

Tabla 23 Reducción de la viabilidad celular a una exposición de 60 minutos a los elementos de ensayo Linfocitos B Raji									
	control	Blanco de tampón	Ensayo	Ensayo + DLL al 0,2 %	Ensayo + DLL al 0,4 %	Ensayo + APS al 0,2 %	Ensayo + APS al 0,4 %	Ensayo + BSA al 0,2 %	Ensayo + BSA al 0,2 %
% Viable a T cero	78	72	75	77	73	76	79	75	71
% Viable a T 60 min	72	69	12	59	68	48	53	19	21

(continuación)

Tabla 23 Reducción de la viabilidad celular a una exposición de 60 minutos a los elementos de ensayo Linfocitos B Raji									
	control	Blanco de tampón	Ensayo	Ensayo + DLL al 0,2 %	Ensayo + DLL al 0,4 %	Ensayo + APS al 0,2 %	Ensayo + APS al 0,4 %	Ensayo + BSA al 0,2 %	Ensayo + BSA al 0,2 %
% de supervivencia celular	92	96	16	77	93	63	67	25	30

El porcentaje de supervivencia celular en el artículo de ensayo es solo del 16 % después de 60 minutos. En comparación, el control que consistía en células B Raji en medio de cultivo celular, perdió solo un 8 % de viabilidad y el blanco de tampón que era citrato de sodio 100 mM a pH 4,5 fue aún menor con una reducción del 4 %. Con la adición de lípido de membrana libre al 0,2 % y al 0,4 % (lecitina deslipidizada) el porcentaje de supervivencia celular en el ensayo aumentó del 16 % al 77 % y al 93 %, y aunque no tan eficaz, la adición de APS libre aumentó la supervivencia celular del 16 % al 63 % y al 67 %. La albúmina sérica bovina fue considerablemente menos eficaz para proteger contra el daño celular.

La inclusión de lípido de membrana libre en una dispersión acuosa de emulsión de lípido de membrana no tiene efecto significativo sobre las propiedades microbicidas de la emulsión de lípido de membrana. Un cultivo en fase logarítmica tardía de la levadura *Candida albicans* cultivada como se describe en los Procedimientos contenía $1,33 \times 10^7$ células viables por ml. Esto se usó para inocular alícuotas de cada artículo de ensayo anterior a una disolución de 1:10 de modo que cada ml de artículo de ensayo contenía más de 6 en escala logarítmica de células de levadura. Las muestras se retiraron durante períodos de tiempo de hasta 10 minutos y se evaluaron para determinar la viabilidad residual utilizando los procedimientos descritos en los Procedimientos. Como se ilustra en la Tabla 24 a continuación, la viabilidad detectable fue erradicada en menos de 5 minutos por todos los artículos de ensayo.

Tabla 24 Efecto microbicida del lípido de membrana libre en las emulsiones de lípido de membrana. Tiempo de destrucción superior a 6 en escala logarítmica. <i>Candida albicans</i> .									
	control	Blanco de tampón	Ensayo	Ensayo + DLL al 0,2 %	Ensayo + DLL al 0,4 %	Ensayo + APS al 0,2 %	Ensayo + APS al 0,4 %	Ensayo + BSA al 0,2 %	Ensayo + BSA al 0,2 %
Tiempo Min	NA	NA	<5	<5	<5	<5	<5	>5	>5

Ejemplo 18: Uso en un alimento médico

Se prepararon emulsiones separadas de ácido caprílico, cáprico y láurico como ácido graso al 5,0 % P/V emulsionado en lecitina deslipidizada al 4,0 % como se describe en los Procedimientos. Las emulsiones individuales se mezclaron en una relación de 1:1:1.

Se reconstituyó leche desnatada en polvo Marvel de Premier International Foods (Reino Unido) Ltd, Spalding, Lincolnshire, Inglaterra, usando el 90 % del volumen de agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez completamente hidratada se añadió el 10 % en volumen de la mezcla combinada de ácidos grasos libres emulsionados separadamente y se mezclaron por agitación, llevando el volumen total al 100 %.

Se cultivó *Helicobacter pylori* en agar sangre de Columbia suplementado con sangre de oveja desfibrinada al 5 % en un tarro anaeróbico utilizando paquetes de gas de bajo oxígeno Anaerogen de Oxoid Reino Unido. Se cultivaron *Salmonella typhimurium* y *E. coli* K12 en agar de infusión de Corazón y Cerebro como se describe en los Procedimientos.

La eficacia microbicida de la leche reconstituida suplementada con los tres ácidos grasos libres emulsionados se determinó usando el procedimiento de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de disolución en agar descrito en los procedimientos. Las disoluciones de la leche desnatada reconstituida se prepararon en agua destilada estéril de modo que las disoluciones adicionales de alícuotas de éstas en agar enfriado proporcionaron un agar con concentraciones combinadas de ácidos grasos libres que variaban del 1 % al 0,1 % en incrementos del 0,1 % y del 0,1 % al 0,01 % en incrementos del 0,01 %. Los cultivos de los tres organismos de ensayo se inocularon sobre estas placas y se incubaron de acuerdo con los requerimientos de cultivo: *Helicobacter* con baja tensión de oxígeno, *Salmonella* y *E. coli* en condiciones aerobias todas a 37 °C.

ES 2 643 862 T3

La Concentración inhibitoria mínima, que es la disolución más baja a la que no se observó crecimiento, fue superior al 0,5 % para Helicobacter y superior al 0,1 % tanto para Salmonella como para E. coli.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana en forma de una emulsión que comprende:

- (a) uno o más ácidos grasos libres saturados o insaturados que tienen de 4 a 22 átomos de carbono; y
 (b) lípido de membrana deslipidizado, que es lecitina deslipidizada, como agente emulsionante para el o los ácidos grasos libres

para su uso en el tratamiento o la profilaxis de infecciones microbianas en seres humanos o animales; en la que "deslipidizado" tiene por objeto significar que sustancialmente todo el material lipídico extraño conjugado, tal como aceite, grasa o material de triglicérido, al que los lípidos de membrana normalmente están asociados en la naturaleza, se retira "sustancialmente todo" en este contexto, teniendo por objeto significar que el lípido de membrana deslipidizado contiene menos del 10 %, preferentemente menos de 5 %, más preferentemente menos del 3 %, de material lipídico extraño conjugado.

2. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ácido graso libre se selecciona entre los ácidos valérico, caproico, caprílico, pelargónico, cáprico, undecanoico, undecilénico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico y mezclas de los mismos.

3. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el ácido graso libre se selecciona entre uno o más de los ácidos caproico, caprílico, pelargónico, cáprico, undecilénico y láurico.

4. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el ácido graso libre es ácido caprílico.

5. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende ácido caprílico y lecitina deslipidizada.

6. Una composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la relación del componente (a) al componente (b) puede ser de aproximadamente 0,25:1 a aproximadamente 10:1; o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 10:1, o de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 5,0:1, o de aproximadamente 1,0:1 a aproximadamente 2,5:1, o de aproximadamente 1,25:1 a aproximadamente 2,5:1, en base peso/base.

7. Una composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende adicionalmente uno o más ácidos orgánicos farmacéuticamente aceptables o una sal o éster farmacéuticamente aceptable de los mismos; y/o una o más sales de ácidos inorgánicos farmacéuticamente aceptables.

8. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el ácido orgánico se selecciona entre los ácidos acético, pirúvico, propiónico, glicólico, oxálico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, maleico, ascórbico, fumárico, tartárico, malónico, glutárico, propenoico, cis o trans butenoico y cítrico y mezclas de los mismos, y sales y ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

9. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el ácido orgánico es ácido cítrico o láctico o la sal de sodio o potasio de los mismos; en la que, preferentemente, la sal de ácido orgánico es citrato sódico; y/o en la que la sal de ácido inorgánico se selecciona entre cloruro, sulfato y nitrato.

10. Una formulación farmacéutica que comprende una composición como se define en cualquier reivindicación anterior y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de infecciones microbianas en seres humanos o animales.

11. Una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la composición está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 25 % (p/v); o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 % (p/v); o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,0 % (p/v).

12. Una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en una forma adecuada para la administración a un ser humano o animal, especialmente en una forma adecuada para la administración oral, tópica, enteral, parenteral o mucosa.

13. Una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que las infecciones microbianas se asocian a la mucosa humana o animal.

14. Una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que las infecciones microbianas son afecciones asociadas a la cavidad oral.

15. Una formulación farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones 10 a 12, en la que la formulación está indicada para el tratamiento tópico de infecciones cutáneas.











