

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 281**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4425** (2006.01)

**A61K 31/5375** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/10** (2006.01)

**A61K 8/02** (2006.01)

**A61K 8/04** (2006.01)

**A61K 8/49** (2006.01)

**A61Q 11/00** (2006.01)

**A61Q 17/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/GB2013/050728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140170**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13721012 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2827865**

54 Título: **Tratamiento de infecciones microbianas**

30 Prioridad:

**20.03.2012 GB 201204864**

**21.03.2012 GB 201204970**

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

**03.06.2019**

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)  
3239 Satellite Boulevard  
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**YOULTON, SIMON**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 715 281 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

Tratamiento de infecciones microbianas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones útiles en la prevención y/o tratamiento de la infección microbiana.

10 **Antecedentes**

10 El cuerpo vivo puede estar infectado por una amplia variedad de microbios. La mucosa y la superficie de la piel están particularmente en riesgo de infección debido a su exposición al medio externo. Cuando la barrera natural proporcionada por la mucosa y la piel se rompe por una lesión o cirugía, los microbios pueden propagarse a través de las capas de la piel y la mucosa, lo que puede conducir a la infección del sitio de la herida. Este es particularmente el caso después de cirugía invasiva. En este caso, la herida quirúrgica puede infectarse por los microbios presentes de forma natural en el medio, en la superficie de la piel o mucosa, o en los instrumentos quirúrgicos utilizados en el procedimiento. La infección de las heridas hace que el proceso de curación se prolongue y, en algunos casos, cuando se infectan las heridas, que no consigan sanar.

20 Los compuestos de morfolino son conocidos en la técnica por tener baja actividad antibacteriana. Estos compuestos solos son particularmente eficaces en la inhibición de la formación de biopelículas y se han utilizado en este contexto en el documento WO 06/082393 en las composiciones que han de aplicarse a las superficies abióticas. También se han utilizado combinaciones sinérgicas de compuestos de morfolino con otros agentes, por ejemplo en el contexto del cuidado dental, donde se ha encontrado que la inclusión de agentes quelantes es eficaz contra el crecimiento de bacterias de la placa oral (US 5.147.632). El documento WO 2007/060413 describe el uso de compuestos de morfolino en el tratamiento de un bolsillo subgingival infectado. El documento WO 2009/013475 describe el uso de compuestos de morfolino para la inducción de la curación de una herida.

30 La actividad antimicrobiana de compuestos de amonio cuaternario, tales como sales de cetilpiridinio, también se conoce en la técnica. El documento JP 2002256155 describe la actividad antimicrobiana de sales de cetilpiridinio solas contra bacterias de la placa oral, mientras que los documentos JP 8151325 y US 2003/0211053 divulgan combinaciones antimicrobianas sinérgicas de las sales con derivados de lisina y enzimas proteolíticas, respectivamente, con ésta última formulada para el tratamiento de la placa y la halitosis. Bereswill et al (1999) FEMS Immunology and Medical Microbiology 24: 189-92, describen la susceptibilidad de *Helicobacter pylori* a cloruro de cetilpiridinio. Además, el documento WO 92/08442 describe composiciones que comprenden compuestos de morfolino combinados con una gama de agentes antimicrobianos (incluyendo sales de cetilpiridinio), para usar en el tratamiento o prevención de la placa y la gingivitis en la cavidad oral; en que dichas composiciones se demuestran que tienen actividad inhibidora sobre el crecimiento de dos especies bacterianas asociadas con la placa dental (*Streptococcus mutans* y *Bacteriodes melaninogenicus*).

40 Por consiguiente, existe una tendencia abrumadora en la técnica anterior hacia el uso de sales de cetilpiridinio y compuestos de morfolino en el tratamiento de trastornos leves de la cavidad oral, tales como halitosis y la placa. La naturaleza de la colonización microbiana en diferentes patologías depende de un número de factores, incluyendo los microbios asociados, y factores ambientales, tales como la temperatura, los nutrientes y los niveles de fluido, y el pH. La placa dental comprende ampliamente bacterias cocos gram-positivas en forma de una biopelícula polimicrobiana en la superficie del diente. Con respecto a los factores ambientales, en especies tales como *S. mutans*, se ha encontrado que la presencia de sacarosa en la cavidad oral mejora la adherencia bacteriana inicial y posterior colonización.

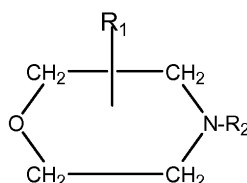
50 La naturaleza de la infección microbiana en las heridas y la periodontitis es distinta de la de la placa, en virtud de las diferencias en las especies asociadas microbianas, las condiciones fisiológicas y la gravedad de las afecciones. James et al. (Wound Rep Reg. 2008. 16. 37-44) han argumentado las primeras dos afecciones como análogas en su mecanismo patológico, debido a la función de diversas comunidades microbianas que actúan en consorte con el tiempo para causar una infección crónica. La periodontitis adulta severa se caracteriza en gran parte por la presencia de *Porphyromonas gingivalis* anaerobia gram-negativa en lesiones periodontales, mientras que las heridas infectadas pueden ser colonizadas por una variedad de microbios, incluyendo bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*. En consecuencia, existe una necesidad de proporcionar composiciones que sean eficaces en el tratamiento de las infecciones crónicas anteriores, que deben tener propiedades antimicrobianas eficaces contra las especies implicadas en estos trastornos.

60 **Características de la invención**

65 La presente invención se basa en el hallazgo de que las composiciones que comprenden compuestos de fórmula (I) y una sal de cetilpiridinio poseen capacidades sinérgicamente mejoradas para tratar y/o prevenir infecciones causadas por una variedad de especies microbianas, o que los compuestos de fórmula (I) actúan para potenciar los efectos antimicrobianos de la sal de cetilpiridinio contra dicha especie. Estas especies microbianas son conocidas en

la técnica por estar asociadas con trastornos, tales como infecciones crónicas de heridas en la piel o mucosa y lesiones periodontales. Por lo tanto, a diferencia de la técnica anterior mencionada más arriba, que muestra la eficacia contra bacterias asociadas con la placa o la gingivitis, la presente invención proporciona el tratamiento o prevención de infecciones en las heridas de la piel o mucosa.

Según un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de morfolino combinado con una sal de cetilpiridinio, teniendo el compuesto de morfolino la fórmula general (I)



(I)

en la que R<sub>1</sub> es un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 8 a 16 átomos de carbono en la posición 2 o 3 del anillo de morfolino, y R<sub>2</sub> es un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, sustituido con un grupo hidroxilo, excepto en la posición alfa, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para usar en el tratamiento o prevención de una infección en un paciente causada por *Staphylococcus spp*, en la que la infección está en una herida de la piel o mucosa de un paciente.

Según un segundo aspecto de la invención, la presente invención proporciona una composición para usar, como se define anteriormente, para usar en el tratamiento o prevención de una infección post-operatoria en o sobre la piel o mucosa de un paciente.

Según un tercer aspecto de la invención, la presente invención proporciona una composición para usar, como se define anteriormente, para usar en la reducción de forma pre-operatoria de la cantidad de microbios causantes de la infección presentes en o sobre la piel o mucosa de un paciente.

### Descripción de las figuras

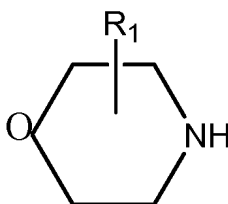
La invención se describe con referencia a la figura adjunta, en la que: la Figura 1 muestra los intervalos de valores del índice de concentración inhibidora fraccional (FIC) utilizados para clasificar si un compuesto potencia o mejora sinérgicamente el efecto antimicrobiano de un compuesto determinado.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos usos de composiciones que comprenden un compuesto de fórmula (I) y una sal de cetilpiridinio. Se ha encontrado que los componentes anteriores muestran actividad antimicrobiana sinérgica contra los microbios que causan infecciones o afecciones en o sobre la piel o mucosa de un paciente, lo que indica su idoneidad para el uso en el tratamiento de tales trastornos.

Los alcoholes de morfolino pueden prepararse mediante varios procesos, tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.636.382, tales como:

(a) mediante alquilación de un derivado de morfolino que tiene la fórmula



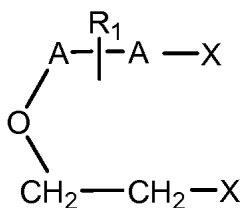
en el que R<sub>1</sub> es como se ha definido anteriormente; con un agente alquilante de la fórmula



en el que R<sub>2</sub> es como se ha definido anteriormente y X es halógeno o un éster sulfónico orgánico, o en el que X junto con un grupo hidroxilo presente en R<sub>2</sub> es un óxido reactivo;

(b) mediante cierre de anillo de un compuesto que tiene la fórmula general

5



10

15 en el que  $R_1$  es como se ha definido anteriormente,  $X$  es halógeno o un éster sulfónico orgánico y  $A$  representa grupos  $CH_2$ , estando un grupo  $CH_2$  sustituido con el grupo  $R_1$ ; con un amino alcohol de fórmula general

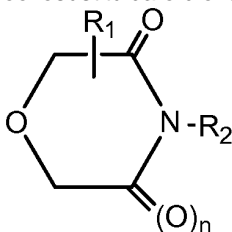


20

en el que  $R_2$  es como se ha definido anteriormente;

(c) mediante la reducción de una morfolina monooxosustituida o dioxosustituida que tiene la fórmula general

25

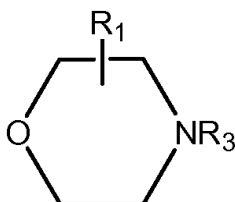


30

35 en la que  $R_2$  es como se ha definido anteriormente,  $n$  es 0 o 1, y  $R_1$  es como se ha definido anteriormente y está en la posición 2 cuando  $n$  es 1 y en la posición 2 o 3 cuando  $n$  es 0; o

(d) partiendo de un compuesto de morfolino que tiene la fórmula general

40



45

en el que  $R_1$  es como se ha definido anteriormente y  $R_3$  es un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene un grupo transformable a  $OH$  o  $CH_2OH$ ; especialmente

(d1) mediante la conversión de un compuesto de la fórmula VIII, en el que el grupo en  $R_3$  transformable a  $OH$  es

halógeno,  $NHAc$ ,  $OAc$ ,  $O$ -alquilo,  $O-CH_2C_6H_5$ ; o

(d2) mediante la conversión de un compuesto de la fórmula VIII, en el que el grupo en  $R_3$  transformable a  $CH_2OH$  es  $-COO_2H_5$ ,  $-CN$ ,  $-CHO$ ; o

(d3)  $R_3$  representa  $-CO(CH_2)_n-COO_2H_5$  ( $n = 0-8$ ).

55 El compuesto de morfolino también se puede preparar mediante el procedimiento tal como se describe en los documentos WO 2007/057681 y WO 2007/091009.

60 El compuesto de morfolino utilizado en la presente invención puede utilizarse en su forma de base libre o como una sal farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son las sales de ácidos, tales como ácido acético, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido clorhídrico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido gentísico, ácido valérico, ácido gálico, ácido beta-resorcíclico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, ácido perclórico, ácido barbitúrico, ácido sulfanílico, ácido fítico, ácido p-nitro benzoico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido laurico; sin embargo se pueden usar otros conocidos por la persona experta. Las sales más preferidas son las de ácido clorhídrico.

65

El compuesto de morfolino más preferido usado en la presente invención es delmopinol, que tiene la denominación común (INN) de (3-(4-propilheptil)-4-(2-hidroxietil)morfolina) con el número CAS 79874. Igualmente más preferida es la sal de hidrocloreto de delmopinol.

5 Los compuestos de morfolino reivindicados son conocidos per se, tal como se describen en US 4.894.221 y US 5.082.653.

10 El agente antimicrobiano usado en las composiciones de la presente invención es una sal de cetilpiridinio. Los presentes inventores han encontrado que la combinación de un compuesto de fórmula (I) con una sal de cetilpiridinio actúa de forma sinérgica para tratar o prevenir una infección microbiana en o sobre la piel o mucosa, o afecciones relacionadas en un paciente. La sal de cetilpiridinio se puede usar en forma de una sal farmacéuticamente aceptables de ácidos, tales como ácido acético, ácido fosfórico, ácido bórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido gentísico, ácido valérico, ácido gálico, ácido beta-resorcílico, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, ácido perclórico, ácido barbitúrico, ácido sulfónico, ácido fítico, 15 ácido p-nitro benzoico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido láurico y otros conocidos para la persona experta. Preferiblemente, la sal de cetilpiridinio es una sal de haluro, y más preferiblemente, la sal de cetilpiridinio es cloruro de cetilpiridinio.

20 En la composición de la presente invención, el compuesto de morfolino está presente preferiblemente en una cantidad que varía de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 20,0% en peso total de la composición, preferiblemente de aproximadamente 0,005% a 5%, más preferiblemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 1,0%, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,2%. La cantidad de sal de cetilpiridinio en la composición varía preferiblemente de aproximadamente 0,001% a 25 aproximadamente 5,0% en peso total de la composición, más preferiblemente de aproximadamente 0,002% a aproximadamente 2,0%; y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 1,0%. En una realización, el compuesto de morfolino y la sal de cetilpiridinio se proporcionan en una proporción en peso de 1:1. Preferiblemente, en dicha realización, se proporciona el compuesto de morfolino al 0,1% y se proporciona la sal de cetilpiridinio al 0,1% del peso total de la composición.

30 Las infecciones o afecciones causadas por microbios pueden reducirse o prevenirse usando las composiciones de la presente invención; en que la acción antimicrobiana de los componentes de dichas composiciones es sinérgica en comparación con la de las composiciones conocidas que comprenden un compuesto de fórmula (I) y otros agentes antimicrobianos. Por consiguiente, los compuestos de fórmula (I) actúan para potenciar el efecto antimicrobiano de la sal de cetilpiridinio. El término "microbio" incluye bacterias, hongos y levaduras. Las especies microbianas contra las 35 que las composiciones de la presente invención pueden ser eficaces pueden ser gram-positivas, gram-negativas, aerobias o anaerobias. Las especies microbianas contra las que las composiciones de la presente invención son eficaces incluyen *Staphylococcus spp.* En particular, las composiciones de la invención son para usar en el tratamiento o la prevención de una infección causada por *Staphylococcus spp.*, tal como *S. aureus*.

40 Tal como se usa en este documento, la nomenclatura "spp", después de un género microbiano determinado, se refiere a cualquier especie microbiana que pertenece a dicho género, tal como es práctica común en la técnica.

45 En el contexto de la presente invención, una infección o afección en un paciente pueden ser considerada como "causada" por un microbio o una combinación de microbios determinados, cuando la ausencia de dicho microbio o combinación sería entendida por el experto en la materia como que mejora la infección o afección, cuando se compara con la presencia de dichos microbios o combinación. Por consiguiente, el experto en la materia entendería que el microbio o combinación de microbios ejercen un efecto patológico en el contexto de la infección o afección. Preferiblemente, dichos microbios o combinación serían entendidos por el experto en la materia como que 50 proporcionan una mayor mejora de la infección o afección si son eliminados, que si son eliminados todos los otros microbios patológicos conocidos (en el contexto de la infección o afección). Más preferiblemente, dicho microbio o combinación serían entendidos por el experto en la materia como que proporcionan una mayor mejora de la infección o afección si son eliminados, que si son eliminados todos los otros agentes patológicos conocidos (en el contexto de la infección o afección). Dicho microbio o combinación no tiene que ser único el agente patológico en la infección o afección, aunque esto es lo más preferible.

55 Los microbios contra los que las composiciones de la presente invención son particularmente eficaces son aquellos que infectan la piel o mucosa, tales como el revestimiento de la cavidad oral, los conductos nasales, los labios, los párpados, las orejas, genitales y el ano, o aquellos que se pueden encontrar en la superficie de la piel. En particular, los componentes de las composiciones de la presente invención son sinérgicamente eficaces contra los microbios 60 que causan infecciones en heridas en la piel y/o mucosa. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención son eficaces en el tratamiento o la prevención de infecciones en las heridas de la mucosa no oral. Por tanto, las composiciones de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir infecciones en tales heridas.

65 Los microbios contra los que las composiciones de la presente invención son eficaces pueden estar involucrados en la patogénesis de la periodontitis.

En el contexto de la presente invención, una herida se entiende que significa cualquier ruptura de la superficie de la piel o mucosa que puede ser causada por una lesión física, tal como la causada cuando la piel o mucosa es penetrada físicamente o dañada por una quemadura o causada por la infección o la enfermedad. La herida puede ser superficial o puede ser más profunda, penetrando varias capas de la mucosa o la piel. Preferiblemente, la herida es en la piel.

La infección de la herida en la piel o mucosa puede incluir los géneros microbianos *Staphylococcus spp*, *Enterococcus spp*, *Prevotella spp*, *Corynebacterium spp*, *Actinomyces spp*, *Pseudomonas spp*, *Porphyromonas spp*, *Fingoldia spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Anaerococcus spp*, *Serratia spp* o combinaciones de los mismos; particularmente las especies *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* o combinaciones de las mismas.

La periodontitis es una afección en la que las encías se retraen de los dientes para formar bolsas que están abiertas a la infección (lesiones periodontales). La afección puede conducir a la pérdida de hueso alrededor de la raíz del diente y mandíbula. Los microbios que están implicados en la causa de la periodontitis incluyen los géneros *Prevotella. spp*, *Actinomyces spp*, *Porphyromonas spp*, *Candida spp* o combinaciones de los mismos, en particular las especies *P. gingivalis* y *C. albicans* o combinaciones de las mismas.

Las composiciones de la presente invención se pueden usar de forma pre-operatoria para el tratamiento de la piel o mucosa en el sitio en el que se realiza una incisión. Preferiblemente, el área del cuerpo que está en contacto con la composición de la presente invención comprende el sitio de contacto entre el cuerpo y el instrumento quirúrgico (o una parte de dicho sitio), y/o la zona circundante inmediata.

La curación de las heridas causadas por una lesión o una incisión quirúrgica puede ser limitada si la herida está infectada por un microbio. Las composiciones de la presente invención pueden ayudar a promover la curación de heridas mediante la prevención o el tratamiento de la infección microbiana en el sitio de la herida. Preferiblemente, la herida se trata con la composición de la presente invención después de la lesión o de forma post-operatoria. Preferiblemente, la herida está en la cavidad oral o la piel. Las composiciones de la presente invención se pueden usar de forma pre-operatoria para esterilizar la superficie del cuerpo en la que se realizar una incisión y/o se pueden usar de forma post-operatoria para prevenir la infección o para tratar una infección en el sitio de la incisión.

Más preferiblemente, la infección es causada por contacto con el cuerpo con un dispositivo médico. Las composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar una superficie abiótica, tal como la de un dispositivo médico, antes, durante o después, preferiblemente inmediatamente después de, el contacto inicial entre un dispositivo médico y el cuerpo. Un dispositivo médico puede incluir un instrumento quirúrgico.

En una realización preferida, una composición de la presente invención se usa para prevenir o reducir la infección causada por microbios planctónicos. Tal como se utiliza en el presente documento, el término planctónico se refiere a los microbios que no están unidos a una superficie; los microbios planctónicos son de libre flotación. Estos microbios no son parte de una biopelícula, pero pueden ser de la misma especie que los microbios que comprenden una biopelícula. Una composición de la presente invención se puede usar para actuar en dichos microbios antes de que se adhieran al cuerpo humano.

El compuesto de fórmula (I) y la sal de cetilpiridinio que comprenden la composición de la invención pueden aplicarse en un sitio determinado de forma simultánea, de manera que la composición se forma antes de la administración, o secuencialmente (en cualquier orden), de manera que la composición se forma después de la aplicación del segundo componente (aplicado más tarde).

La composición de la presente invención puede estar en forma de un medicamento que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables que son bien conocidos en la técnica. La composición de la presente invención puede formularse para comprender adicionalmente edulcorantes, aromatizantes y/o colorantes, en particular cuando la composición está destinada a uso oral. Los edulcorantes, saborizantes y/o colorantes naturales se conocen en la técnica.

La composición de la presente invención se puede aplicar a la piel o mucosa en cualquier forma o cantidad adecuada que consiga el efecto deseado. Preferiblemente, la composición se formula como un gel, espuma, crema, emoliente, pulverizador, enjuague bucal, pasta de dientes, producto masticable o chicle. Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar a la mucosa oral mediante diversos procedimientos incluyendo, pero no limitados a, cepillado, pulverización, pintado o enjuague de la cavidad bucal con la composición. Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar a la piel mediante aplicación tópica, por ejemplo mediante el uso de un apósito que comprende la composición, que se pone en contacto con la piel; preferiblemente en que el apósito es adecuado para ponerse en contacto con una herida, por ejemplo en el que el apósito es un vendaje, gasa, tirita, hidrogel u otro apósito médico. Alternativamente, la composición se puede aplicar a la piel como un lavado acuoso, por ejemplo por medio de un lavado de irrigación de las heridas que comprende la composición. La composición también se puede aplicar a la piel como un gel o aerosol.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención. La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier objeto que cae fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines informativos.

### Ejemplos

5 Se estudió el efecto sobre la capacidad antimicrobiana de las composiciones que comprenden delmopinol con o sin cloruro de cetilpiridinio (CPC). A continuación, se proporcionan los detalles de fabricación de CPC:

Compuesto	CAS	Proveedor	Cat. No.	Pureza	Disolvente
CPC	123-03-5	MP Biomedicals	0219017725	99,8%	dH <sub>2</sub> O

10 Las composiciones de la invención se ensayaron como una solución que tenía la siguiente composición base a la que se añadió delmopinol y/o CPC:

Se preparó el Caldo A, que comprende una formulación base destinada para usar en aplicaciones para el cuidado oral pero sin delmopinol o CPC (a continuación) producidos por separado, a continuación se mezclaron y se agitaron con intensidad antes de ajustar el pH final a de 5,6 a 5,7 usando NaOH/HCl 1 M según sea necesario. A 15 continuación, la mezcla final se esterilizó por filtración usando un filtro PES de 0,45 µM (Nalgene, 169-0045).

Se prepararon preparaciones bacterianas usando cultivos recién cultivados sobre medios sólidos. Se transfirieron varias asas de inoculación llenas a 10-20 ml del caldo apropiado y se agitaron en vórtice suavemente hasta que se produjo una suspensión fina. La DO<sub>600</sub> nm inicial de las suspensiones celulares se midió y se ajustó a 0,2 para 20 proporcionar un recuento de colonias de  $1 \times 10^8$  ufc/ml. Se prepararon inóculos finales mediante dilución de las suspensiones celulares ajustadas en caldo adecuado, tal como se detalla a continuación:

Microbio	Dilución
<i>C. albicans</i> NCTC 1363	1 en 1000
<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212	1 en 100
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1 en 100
<i>P. gingivalis</i> NCTC 11834	1 en 20
<i>Prv. nigrescens</i> ATCC 33563	1 en 20
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1 en 200

### Actividad antimicrobiana de delmopinol o CPC solos

25 La actividad antimicrobiana de CPC y delmopinol se determinó en medio estándar y caldo A. Se añadieron 195 µl de caldo normal (ensayo estándar) o caldo A descrito anteriormente a una placa de 96 pocillos. Los caldos se añadieron a los pocillos en las columnas 1, 11 (control negativo, caldo solamente) y 12 (control positivo).

30 Se añadieron 100 µl de caldo normal (ensayo estándar) o caldo A a los pocillos en las columnas 2-10. A continuación, se añadieron 5 µl de una solución madre de CPC o delmopinol (preparada en un disolvente adecuado a 80 x la concentración final deseada) a los pocillos en la columna 1 y se mezclaron con intensidad (mínimo de tres réplicas). Se prepararon diluciones dobles mediante la transferencia de 100 µl de la mezcla de la columna 1 a la columna 2, a continuación, la columna 2 a la columna 3 y así sucesivamente hasta la columna 10.

35 Después de la mezcla en la columna 10, se descartaron 100 µl. Se añadieron 5 µl del disolvente apropiado a pocillos en la columna 12, se mezclaron y se descartaron 100 µl.

40 Finalmente, se añadieron 100 µl de inóculo (preparado en caldo normal o 2 x caldo A) a los pocillos en las columnas 1-10 y 12 y las placas se incubaron como se ha descrito anteriormente.

Tras el período de incubación, se examinaron las placas para el crecimiento a simple vista. El primer pocillo de cada fila que no contenía crecimiento se marcó en la concentración mínima inhibitoria (MIC).

45 Se transfirieron muestras de 5 µl de todos los pocillos que no mostraron crecimiento y el primer pocillo que mostró crecimiento a una placa de agar apropiada, se dejaron en remojo en agar y después se incubaron. Después de este período de incubación, se examinaron las placas y la concentración más baja de compuesto de ensayo donde no hubo crecimiento se registró como la concentración bactericida mínima (MBC).

### 50 Actividad antimicrobiana de delmopinol y CPC combinados

Los ensayos se establecieron tal como se ha descrito anteriormente, excepto que:

Se diluyó una solución madre de delmopinol (en dH<sub>2</sub>O) preparada a 200 x la concentración final deseada (esto sería ¼ de su MIC registrada sola) 1 en 100 en los inóculos y, a continuación, se añadieron 100 µl inmediatamente a 55 todos los pocillos en las columnas 1-10 y 12.

Las filas A - C registran MIC/MBC para el compuesto de ensayo solo y las filas F - H registran MIC/MBC del compuesto de ensayo en combinación con un ¼ MIC de delmopinol.

5 El modo de interacción entre CPC y delmopinol se interpretó mediante la conversión de los datos de MIC en la puntuación del índice de concentración inhibidora fraccional (FIC<sub>i</sub>) usando la siguiente fórmula:

$$\text{FIC}_{(\text{CPC})} = \text{MIC de CPC con delmopinol} / \text{MIC de CPC solo}$$

10  $\text{FIC}_{(\text{Delmopinol})}$  se fija a 0,25 (es decir, 1/4 de MIC)

$$\text{FIC}_i = \text{FIC}_{(\text{CPC})} + \text{FIC}_{(\text{delmopinol})}$$

A continuación, se interpretó el FIC<sub>i</sub> utilizando los siguientes parámetros (esto se representa en la Figura 1):

15 Sinergia = FIC<sub>i</sub> ≤ 0,5

Potenciación = FIC<sub>i</sub> > 0,5 - 0,75

Indiferente = FIC<sub>i</sub> > 0,75 - 4

Antagonismo = FIC<sub>i</sub> > 4

20 Se calculó un índice de concentración bactericida fraccional (FBC<sub>i</sub>) y se interpretó de la misma manera, pero utilizando los datos de MBC. La FBC<sub>i</sub> (delmopinol), aunque fija, sería menor o igual a 0,25, dependiendo de qué fracción de 1/4 de la concentración de MIC en comparación con su MBC sola.

#### Actividad antimicrobiana de las combinaciones de CPC y delmopinol (ensayo en damero)

25 Se prepararon soluciones madre de CPC y delmopinol por separado en dH<sub>2</sub>O hasta 80x la concentración final deseada y, a continuación, se preparó una serie de diluciones dobles en dH<sub>2</sub>O.

30 Se añadieron 190 µl de caldo normal (ensayos estándar) o caldo A a pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron 5 µl de cada dilución de CPC a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos. Se añadieron 5 µl de cada dilución de delmopinol a los pocillos apropiados de la placa de 96 pocillos. El contenido de cada pocillo se mezcló con intensidad y a continuación se descartó un volumen de 100 µl.

35 Se añadieron 100 µl de inóculos a todos los pocillos en las columnas 1 - 10 y 12. Las placas se incubaron a continuación, tal como se ha descrito anteriormente. Tras el período de incubación, las placas se examinaron para el crecimiento a simple vista y todos los pocillos se registraron para la presencia o ausencia de crecimiento (utilizado para la determinación de FIC). Se transfirieron muestras de 5 µl de todos los pocillos a una placa de agar apropiado, se dejaron en remojo en agar y a continuación se incubaron. Después de la incubación las placas se examinaron y se registró el crecimiento/no crecimiento para cada muestra de pocillo (utilizado para la determinación de FBC).

40  $\text{FIC}_{(\text{CPC})} = \text{MIC de CPC con delmopinol} / \text{MIC de CPC solo}$

$$\text{FIC}_{(\text{Delmopinol})} = \text{MIC de delmopinol con CPC} / \text{MIC de delmopinol solo}$$

45  $\text{FIC}_i = \text{FIC}_{(\text{CPC})} + \text{FIC}_{(\text{delmopinol})}$

Las FBC<sub>i</sub> se calcularon de la misma manera pero utilizando los datos de MBC.

La FIC<sub>i</sub> y FBC<sub>i</sub> se interpretaron utilizando los mismos parámetros establecidos anteriormente.

#### 50 Actividad antimicrobiana de Decapinol y CPC combinados

55 El delmopinol está disponible comercialmente como un enjuague bucal y se vende bajo la marca comercial Decapinol. El Decapinol (para ensayar delmopinol más CPC) se reformuló para contener una proporción 1:1 de CPC con respecto a delmopinol es decir, 0,1% cada uno. El Decapinol sin delmopinol (para ensayar CPC solo) también se reformuló.

Se produjeron otras formulaciones de Decapinol completo con CPC y Decapinol sin delmopinol pero con CPC para proporcionar una proporción de DEL:CPC de 50:1.

60 Se añadieron 195 µl de caldo A a los pocillos en la columna 11 (control negativo) de una placa de base redonda de 96 pocillos. Se añadieron 100 µl de caldo A a los pocillos en la columna 2-10 y 12 (control positivo).

65 Se añadieron 200 µl de las formulaciones de proporción ajustada (Decapinol +/- delmopinol), formulaciones de proporción 1:1 (Decapinol +/- delmopinol y diluido 1 en 16 en caldo A) o Decapinol completo (para ensayar delmopinol solo) a los pocillos en la columna 1.



Se prepararon diluciones dobles mediante la transferencia de 100 µl de la mezcla de la columna 1 a la columna 2, a continuación, la columna 2 a la columna 3 y así sucesivamente hasta la columna 10. Se añadieron 100 µl de inóculos (preparados en 2x caldo) a todos los pocillos de las columnas 1 - 10 y 12. A continuación, las placas se incubaron, tal como se describe en la Tabla 1.

Tras el período de incubación, las placas se examinaron para el crecimiento a simple vista. El primer pocillo de cada fila que contenía un nuevo crecimiento se marcó como el mínimo. El primer pocillo de cada fila que no contenía crecimiento se marcó como MIC.

Se transfirieron muestras de 5 µl de todos los pocillos que no mostraron crecimiento y el primer pocillo que mostró crecimiento a una placa de agar apropiada, se dejó en remojo en agar y a continuación se incubaron. A continuación, se examinaron las placas y la concentración más baja de compuesto de ensayo donde no se produjo crecimiento se registró como la MBC.

El modo de interacción entre el CPC y el delmopinol se ha definido mediante la conversión de los datos de MIC y MBC en FIC<sub>i</sub> y FBC<sub>i</sub> y se interpretó usando los parámetros descritos anteriormente.

**Resultados y discusión**

Las tablas 1-12 muestran el modo de acción antimicrobiano (potenciación o sinergia) del delmopinol y cloruro de cetilpiridinio (CPC) en *Porphyromonas gingivalis* (Tablas 1 y 2), *Prevotella nigrescence* (Tablas 3 y 4), *Staphylococcus aureus* (Tablas 5 y 6), *Enterococcus faecalis* (Tablas 7 y 8), *Escherichia coli* (Tablas 9 y 10), *Candida albicans* (Tablas 11 y 12). Los resultados se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 1**

<i>P. gingivalis</i>	Actividad sola (ug/ml)				Combinación con delmopinol (FIC)				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>
CPC	0,49	0,49	0,49	0,49	0,62p	0,75p	1,5	NEP	1,01	1,01	0,75p	0,75p
Delmopinol	1,95	31,25	31,25	31,25								

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
 ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación

**Tabla 2**

<i>P. gingivalis</i>	Actividad sola (uM)				Combinación con delmopinol (FIC)				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>
CPC	1,4	1,4	1,4	1,4	0,62p	0,75	1,5	NEP	1,01	1,01	0,75p	0,75p
Delmopinol	10	120	120	120								

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
 ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación

**Tabla 3**

<i>Prv nigrescence</i>	Actividad sola (ug/ml)				Combinación con delmopinol (FIC)				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>	FIC <sub>i</sub>	FBC <sub>i</sub>
CPC	0,06	0,49	0,25	0,49	0,75p	0,79	0,5s	0,53p	1	1	0,38s	1,5

Delmopinol	62,5	62,5	31,25	125
* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC) p = potenciación s = sinergia				

**Tabla 4**

<i>Prv. Nigrescence</i>												
	Actividad sola (uM)				Combinación con delmopinol (FIC)				Evaluación en Decapinol			
Compuesto	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
CPC	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
	0,2	1,4	0,7	1,4	0,75p	0,79	0,5s	0,53p	1	1	0,38s	1,5
Delmopinol	230	230	120	460								
* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC) p = potenciación s = sinergia												

5

**Tabla 5**

<i>S. aureus</i>												
	Actividad sola (ug/ml)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol			
Compuesto	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
CPC	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
	3,9	7,8	0,49	1,95	0,38s	0,63p	0,38s	0,75p	1	0,5s	0,63P	0,38s
Delmopinol	125	250	250	250								
* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC) p = potenciación s = sinergia # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)												

10

**Tabla 6**

<i>S. aureus</i>												
	Actividad sola (uM)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol			
Compuesto	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
CPC	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
	11,5	22,9	1,4	5,7	0,38s	0,63p	0,38s	0,75p	1	0,5p	0,63p	0,38s
Delmopinol	460	920	920	920								
* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC) p = potenciación s = sinergia # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)												

**Tabla 7**

<i>E. faecalis</i>												
	Actividad sola (ug/ml)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol			
Compuesto	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi

ES 2 715 281 T3

CPC	1,95	15,6	0,98	3,9	ND	ND	1,25	1,25	1	1,02	0,75p	1,5
Delmopinol	250	250	250	250								
<p>* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes          ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)          p = potenciación          s = sinergia          # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)</p>												

**Tabla 8**

<i>E. faecalis</i>												
Compuesto	Actividad sola (uM)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
CPC	5,7	45,9	2,9	11,5	ND	ND	1,25	1,25	1	1,02	0,75p	1,5
Delmopinol	920	920	920	920								
<p>* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes          ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)          p = potenciación          s = sinergia          # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)</p>												

5

10

15

20

25

30

35

40

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

**Tabla 9**

<i>E. coli</i>	Actividad sola (ug/ml)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada^	
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
CPC	15,6	31,25	15,6	62,5	0,75p	1,25	0,75p	1,25	1,06	1,06	1,25	1,25
Delmopinol	250	250	250	250								

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
 ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación  
 s = sinergia  
 # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)

Tabla 10

E. coli	Actividad sola (uM)				Combinación con delmopinol (FIC) #				Evaluación en Decapinol	
	Estándar	Decapinol* base	Estándar	Decapinol* base	Estándar	Decapinol* base	Proporción 1:1	Proporción ajustada^	FICi	FBCi
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
CPC	45,9	91,9	45,9	183,8	0,75p	1,25	0,75p	1,25	1,06	1,25
Delmopinol	920	920	920	920						

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
 ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación  
 s = sinergia  
 # 1/4 expts con delmopinol (FIC/FBC no completo)

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

**Tabla 11**

C. albicans	Actividad sola (ug/ml)			Combinación con delmopinol (FIC)			Evaluación en Decapinol			
	Estándar	Decapinol* base	Estándar	Decapinol* base	Proporción 1:1	Proporción ajustada^	Estándar	Decapinol* base	Proporción 1:1	Proporción ajustada^
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
CPC	0,98	0,98	0,49	0,98	0,63p	0,68p	0,99	0,65p	1	1,25
Delmopinol	500	500	120	120					2	1,25

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
 ^ Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación  
 s = sinergia

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

**Tabla 12**

<i>C. albicans</i>	Actividad sola (µM)				Combinación con delmopinol (FIC)				Evaluación en Decapinol			
	Estándar		Decapinol* base		Estándar		Decapinol* base		Proporción 1:1		Proporción ajustada <sup>^</sup>	
Compuesto	MIC	MBC	MIC	MBC	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi	FICi	FBCi
CPC	2,9	2,9	1,4	2,9	0,63p	0,66p	0,99	0,65p	1	2	1,25	1,25
Delmopinol	1840	1840	460	460								

\* No había delmopinol o benzoato de sodio presentes  
<sup>^</sup> Proporciones: 50:1 (Del:CPC)  
 p = potenciación  
 s = sinergia

Tabla 13

Resumen de todas las sinergias detectadas						
Compuesto + delmopinol	<i>P.gingivalis</i>	<i>Prv. Nigrescens</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
CPC	potenciación	sinergia	sinergia	potenciación	potenciación	potenciación

5 Tal como se muestra en la Tabla 13, los datos de las tablas anteriores muestran que las composiciones que comprenden delmopinol y CPC combinados, en comparación con delmopinol solo o CPC solo, sorprendentemente tienen efectos antimicrobianos potenciadores o sinérgicos en una gama de microbios. El ensayo con Decapinol reformulado muestra que la actividad antimicrobiana de potenciación o sinérgica observadas no se debe a los excipientes que están presentes en la solución de Decapinol.

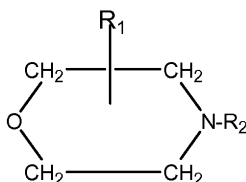
10 Por consiguiente, las composiciones de la presente invención que comprenden la combinación de un compuesto de morfolino de Fórmula (I) y una sal de cetilpiridinio muestran una ventaja inesperada en el tratamiento o la prevención de la infección causada por una gama de microbios asociados con la colonización patológica de heridas y lesiones periodontales.

15



## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un compuesto de morfolino combinado con una sal de cetilpiridinio, teniendo el compuesto de morfolino la fórmula general (I)



(I)

en la que R1 es un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 8 a 16 átomos de carbono en la posición 2 o 3 del anillo de morfolino, y R2 es un grupo alquilo lineal o ramificado que contiene de 2 a 10 átomos de carbono, sustituido con un grupo hidroxilo, excepto en la posición alfa, o sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para usar en el tratamiento o prevención de una infección en un paciente causada por *Staphylococcus spp*, en la que la infección está en una herida de la piel o mucosa de un paciente.

2. Composición para usar, según la reivindicación 1, en la que la suma de los átomos de carbono en los grupos R1 y R2 es de al menos 10, preferiblemente, entre 10 y 20.

3. Composición para usar, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que R2 termina con el grupo hidroxilo.

4. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el compuesto de morfolino es 3-(4-propil-heptil)-4-(2-hidroxietil)morfolina.

5. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la infección es causada por *S. aureus*.

6. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la sal de cetilpiridinio es una sal de haluro.

7. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la sal de cetilpiridinio es cloruro de cetilpiridinio.

8. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición está en forma de un gel, espuma, crema, emoliente, pulverizador, enjuague bucal, pasta de dientes, producto masticable o chicle.

9. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para usar en el tratamiento o prevención de una infección post-operatoria en o sobre la piel o mucosa de un paciente.

10. Composición para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para usar de forma pre-operatoria para reducir la cantidad de microbios causantes de la infección presentes en o sobre la piel o la mucosa del paciente.

# Identificación de la sinergia

Figura 1

Datos de MIC transformados en una concentración inhibidora fraccional

$$FICA = MIC \text{ de A con B} / MIC \text{ de A}$$

$$\text{índice FIC} = FICA + FICB$$

Valores de índice FIC

$$\leq 0.5 = \text{SINERGIA}$$

$$\geq 0.51 - \leq 0.75 =$$

**POTENCIACIÓN**

$$\geq 0.76 - 4.0 = \text{INDIFERENTE}$$

