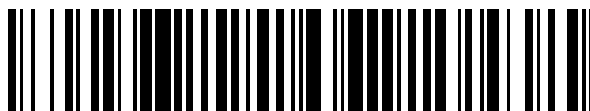


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 968**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/21** (2006.01)

**A61K 31/045** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2013 PCT/US2013/054129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.02.2014 WO14025994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2013 E 13827577 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2882433**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas que comprenden nitratos de glicerilo**

30 Prioridad:

**08.08.2012 US 201261680964 P**

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

**07.11.2019**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)  
210 West 7th St.  
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**RAAD, ISSAM y  
ROSENBLATT, JOEL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 729 968 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 comprenden nitratos de glicerilo

**Antecedentes de la invención**

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional en Estados Unidos N.º 61/680 964, presentada el 8 de agosto de 2012.

**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular y la medicina. Más en particular, se refiere a composiciones antimicrobianas que comprenden un nitrato de glicerilo.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

10 En la actualidad, las composiciones para la erradicación de biopelículas en las que se puede producir el contacto con humanos o animales requieren por lo general altas concentraciones de alcohol, antibióticos y/o concentraciones relativamente tóxicas de agentes antisépticos. Los antibióticos a menudo son costosos y su uso profiláctico es problemático debido al potencial para inducir resistencia antimicrobiana.

15 Actualmente, los catéteres vasculares se sellan hidráulicamente con solución salina o solución de heparina entre infusiones o muestreos de sangre a través de las luces de los mismos. Las luces selladas hidráulicamente normalmente se tapan entre usos. Las luces pueden llegar a contaminarse con bacterias u hongos mediante la introducción de infundidos contaminados, mediante exposición ambiental cuando están sin tapar, o mediante contacto manual con conectores luer y/o tapones. En el caso de sospecha de infecciones sanguíneas en pacientes cateterizados, se puede emplear una desinfección y recuperación del catéter con un sellado antimicrobiano. Las soluciones antibióticas de sellado se usan con frecuencia pero tienen las desventajas de que son costosas y presentan el riesgo de desarrollo de organismos resistentes a los antibióticos. Las infecciones por organismos resistentes a los antibióticos normalmente suponen costes de tratamiento y mortalidades mayores. Se han intentado usar también soluciones de etanol de alta concentración. El lavado abundante con una solución de sellado de etanol al 70 % no produjo una reducción significativa de la infección y se asoció a una mayor incidencia de molestias no graves relacionadas con la intoxicación (Slobbe y col., "Prevention of Catheter-Related Bacteremia with a Daily Ethanol Lock in Patients with Tunneled Catheters: A Randomized, Placebo-Controlled Trial", *PLoS ONE* 5(5): e10840). Un ensayo clínico profiláctico que implicaba 1-3 horas de sellado con etanol al 50 % no fue eficaz para reducir la infección en pacientes hospitalizados con catéteres de larga permanencia (Crmich y col., "Prospective Randomized Double-Blind Trial of an Ethanol Lock for Prevention of CLABSI" [Resumen]. En: *49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco, EE.UU. 2009).

20 Los microorganismos presentes en biopelículas pueden ser particularmente difíciles de erradicar. Los fenotipos de las biopelículas son importantes en infecciones resistentes nosocomiales y asociadas a dispositivos y son mucho más difíciles de erradicar que los microbios en estado planctónico diluido. La formación de biopelículas a menudo es una parte importante de la generación de una infección por un organismo bacteriano o fúngico. Además, la formación de biopelículas puede causar olores, decoloraciones, degradaciones y otros problemas significativos por la obstrucción de tubos y otros equipos industriales. Una aplicación médica de particular interés es la desinfección de las superficies lumbinales de los catéteres vasculares. Las infecciones intraluminales son un problema significativo para pacientes con catéteres de larga permanencia que requieren acceso vascular para la infusión de medicamentos o nutrición. Entre un uso y otro de los catéteres, las luces de los catéteres se sellan normalmente con solución salina o solución de heparina a fin de evitar la coagulación de la sangre y la oclusión de las luces. A lo largo de la manipulación durante procedimientos de acceso o durante el uso de infundidos contaminados, las luces de los catéteres pueden llegar a ser colonizadas por organismos patógenos y pueden ser la causa de bacteriemias o candidemias. La colonización de la luz del catéter es la causa más común de infecciones sanguíneas de inicio tardío asociadas a un catéter. Obviamente, existe la necesidad de nuevas composiciones antimicrobianas que se puedan usar para destruir los microorganismos presentes en biopelículas.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención supera las limitaciones de la técnica anterior proporcionando nuevos procedimientos y composiciones antimicrobianas. En determinados aspectos, se proporciona una solución antimicrobiana que comprende un nitrato de glicerilo tal como, por ejemplo, trinitrato de glicerilo (TNG, nitroglicerina), en combinación con un quelante, un peróxido, un ácido graso y/o un alcohol y se puede usar, por ejemplo, para destruir microorganismos de forma eficaz en biopelículas. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que el TNG combinado con un quelante y/o un alcohol se puede usar para destruir sinérgicamente los microorganismos presentes en biopelículas tales como bacterias u hongos. En determinados aspectos, las soluciones de la presente invención se pueden usar como soluciones antimicrobianas en equipos médicos (por ejemplo, se pueden usar como solución de sellado en un catéter), para limpiar o lavar abundantemente tuberías de petróleo o gas, sobre superficies de preparación de alimentos, para el tratamiento de heridas, en dispositivos periodontales o dentales o durante una cirugía oral o un procedimiento dental, o en la limpieza o antisepsia de la

piel.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una solución antimicrobiana que comprende un nitrato de glicerilo y un alcohol en una cantidad superior a aproximadamente un 10 % (v/v), un peróxido, un ácido graso y/o un quelante. La solución puede ser un líquido, una suspensión o una emulsión en un medio líquido. La solución puede comprender el nitrato de glicerilo y el quelante. La solución puede comprender el nitrato de glicerilo, el peróxido y el quelante. El peróxido puede estar en una cantidad de aproximadamente un 0,01-10 %, más preferentemente de aproximadamente un 0,1-3 %, incluso más preferentemente de aproximadamente un 0,1-2 %. En algunas realizaciones, la solución comprende el nitrato de glicerilo, el ácido graso y el quelante. El ácido graso puede estar en una cantidad de aproximadamente un 0,001-10 %, más preferentemente de aproximadamente un 0,01-5 %, más preferentemente de aproximadamente un 0,05-3 %. En algunas realizaciones, la solución comprende el nitrato de glicerilo y el peróxido. El peróxido puede ser peróxido de hidrógeno, peróxido de benzoilo o peróxido de bario. En algunas realizaciones, el peróxido es un peróxido inorgánico tal como peróxido de bario, peróxido de calcio, peróxido de magnesio o peróxido de estroncio. En algunas realizaciones, el peróxido es peróxido de hidrógeno. La solución puede comprender aproximadamente un 0,1-3 % de peróxido de hidrógeno. La solución puede comprender además el quelante. En algunas realizaciones, la solución comprende TNG, el ácido graso y el quelante. El ácido graso puede ser un ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> o un ácido alcanoico C<sub>6-10</sub>. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido caprílico (ácido octanoico), ácido caproico o ácido láurico. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido caprílico (ácido octanoico). La solución puede comprender aproximadamente un 0,01-5 % de ácido caprílico. La solución puede comprender adicionalmente un tensioactivo, un agente humectante, un emoliente, un hidratante, una fragancia o un agente aromatizante. En algunas realizaciones, se pueden añadir uno o más polímeros a la solución antimicrobiana para espesar la solución o para hacer más viscosa la solución. Las soluciones antimicrobianas que contienen los polímeros como espesantes o para aumentar la viscosidad pueden ser útiles, por ejemplo, en un revestimiento o como tal. Por ejemplo, el revestimiento puede estar comprendido sobre un dispositivo médico o aplicado al mismo, o el revestimiento se puede aplicar a un sujeto por vía tópica o parenteral, por ejemplo, para reducir el crecimiento de bacterias u hongos o para destruir los mismos.

La solución puede comprender el nitrato de glicerilo y el alcohol. En algunas realizaciones, la solución comprende el nitrato de glicerilo, el alcohol y el quelante. El nitrato de glicerilo puede ser trinitrato de glicerilo (TNG). El trinitrato de glicerilo puede tener una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1500 µg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 µg/ml, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 µg/ml. El nitrato de glicerilo puede ser dinitrato de glicerilo o mononitrato de glicerilo. El quelante puede ser citrato, un ácido tetraacético, un tiosulfato, N-acetil cisteína, disulfiram, un hidroxiácido, un ácido hidroxámico, etilendiamina disuccinato (EDDS), tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato (THPF) o MesNA. El quelante puede ser citrato. El quelante puede ser etilendiamina disuccinato (EDDS) o tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato (THPF). En algunas realizaciones, el quelante es un hidroxiácido tal como un α-hidroxiácido. El hidroxiácido puede ser ácido láctico, ácido glucónico, ácido glicólico, ácido galacturónico, ácido salicílico o ácido glucurónico. En algunas realizaciones, el quelante es un ácido hidroxámico. El ácido hidroxámico puede ser ácido hidroxámico, ácido benzohidroxámico, ácido salicilhidroxámico o ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA). El citrato puede comprender aproximadamente un 0,1-10 %, aproximadamente un 1-10 %, aproximadamente un 3,5-7 %, o aproximadamente un 4 % (v/v) de la solución. El quelante puede ser MesNA. El MesNA puede comprender aproximadamente un 1-10 % o aproximadamente un 5 % (v/v) de la solución. El quelante puede ser disulfiram. El disulfiram puede tener una concentración de aproximadamente 0,05 - 5 mg/ml o de aproximadamente 0,1 - 0,5 mg/ml. El alcohol puede ser etanol, metanol, isopropanol, alcohol butílico, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol o alcohol feniletilílico. El alcohol puede comprender de más de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 80 % (v/v), de más de un 10 % a aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 15-30 % o aproximadamente un 20% de la solución. La solución se puede definir adicionalmente como una composición farmacéuticamente aceptable o un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la solución comprende de más de un 10 % a aproximadamente un 60 % de etanol, aproximadamente un 1-20 % de citrato y aproximadamente 10-500 µg/ml de trinitrato de glicerilo. En algunas realizaciones, la solución comprende de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 30 % de etanol, aproximadamente un 2,5-10 % de citrato y aproximadamente 50-250 µg/ml de trinitrato de glicerilo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento no terapéutico para reducir organismos microbianos de una superficie que comprende poner en contacto la superficie con una solución antimicrobiana de la presente invención durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los organismos microbianos sobre la superficie. Los organismos microbianos pueden estar presentes en una biopelícula sobre la superficie. La superficie puede estar comprendida en un catéter, un dispositivo médico, una tubería de agua, una tubería de líquidos, una tubería de petróleo o gas, un tubo de una máquina de hielo, o en un tubo de una máquina dispensadora de bebidas. En algunas realizaciones, la superficie está comprendida en el interior de un catéter vascular.

En algunas realizaciones, la solución antimicrobiana se usa como solución de sellado o como solución de lavado para un dispositivo médico tal como, por ejemplo, un catéter, o la solución antimicrobiana se puede aplicar a un sujeto por vía tópica (por ejemplo, para desinfectar una porción de la piel de un sujeto o para limpiar o desinfectar una herida en un sujeto). Por ejemplo, se puede usar una solución que comprende un nitrato de glicerilo (por ejemplo, TNG), un ácido graso (por ejemplo, un ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> o un ácido alcanoico C<sub>6-10</sub>, ácido caprílico), y

un quelante como solución de lavado. La solución de lavado se puede usar, por ejemplo, para lavar un catéter u otro dispositivo médico. En algunas realizaciones, la solución de lavado se puede aplicar, usar para irrigar o limpiar, o usar en el lavado de una herida en un sujeto, tal como un sujeto humano. Estos enfoques pueden ser particularmente útiles en sujetos que tienen una herida que puede comprender bacterias que son resistentes a los antibióticos o a otro tratamiento, o cuando el sujeto está inmunodeprimido, por ejemplo, como resultado de una infección o una enfermedad como cáncer, infección por VIH, etc. En algunas realizaciones, se puede usar una solución que comprende un nitrato de glicerilo (por ejemplo, TNG), un alcohol (por ejemplo, etanol) y un quelante como solución de sellado. Tal como se muestra en los ejemplos que siguen, se observó que una solución que comprendía TNG, 20 % de etanol y un quelante, exhibía una estabilidad en almacenamiento de 1 año.

Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit que comprende una solución antimicrobiana de la presente invención en un medio de envase adecuado. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para su uso. El medio de envase adecuado puede ser un vial, una jeringa o un dosificador. La solución puede estar comprendida en o sobre una torunda o una toallita.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una solución antimicrobiana para su uso en un procedimiento de tratamiento de una herida en un sujeto que comprende poner en contacto una solución antimicrobiana de la presente invención con al menos una porción de la herida o administrar una solución antimicrobiana de la presente invención a al menos una porción de la herida. Preferentemente, se aplica una cantidad terapéuticamente eficaz de la solución antimicrobiana a la herida. El sujeto puede ser un ser humano. La solución se puede administrar por vía tópica al sujeto. En algunas realizaciones, la solución se administra en forma de lavado. El procedimiento puede comprender adicionalmente la irrigación de la herida con la solución. La solución se puede aplicar a la base de una herida, un tejido epitelial, un tejido endotelial o la superficie de un órgano.

En algunas realizaciones, el kit comprende una solución antimicrobiana en un envase que está diseñado para poder dispensar la solución en forma de una solución de sellado. Por ejemplo, la solución puede estar comprendida en un vial o una jeringa y se puede añadir o dispensar en o sobre un dispositivo médico tal como, por ejemplo, un catéter. El kit puede contener instrucciones para su uso durante un procedimiento médico o de limpieza. El kit puede estar embalado con una o más jeringas, torundas o toallitas de aplicación. La solución puede estar comprendida en una jeringa, vial, tubo, crema, pomada, toallita o película. En algunas realizaciones, el kit comprende una única solución que comprende un nitrato de glicerilo y a) un alcohol y/o un quelante. En otras realizaciones, el nitrato de glicerilo, el alcohol, el peróxido, el ácido graso y/o el quelante pueden estar contenidos en envases separados en un kit y se pueden combinar, por ejemplo, mezclar, someter a ultrasonidos, etc.) antes de su uso. Por ejemplo, a continuación se muestran varias posibilidades.

Primer medio de envase	Segundo medio de envase	Tercer medio de envase
(nitrato de glicerilo + alcohol)	quelante	n/d
(nitrato de glicerilo + quelante)	alcohol o peróxido o ácido graso	n/d
nitrato de glicerilo	(quelante + alcohol)	n/d
nitrato de glicerilo	alcohol o peróxido o ácido graso	quelante
nitrato de glicerilo	(quelante + peróxido)	n/d
nitrato de glicerilo	(quelante + ácido graso)	n/d

La duración del contacto necesario para la desinfección de superficies por contacto con el líquido puede variar según el organismo tratado y/o lo bien establecida que esté la biopelícula que se va a tratar. Tal como se muestra en los ejemplos que siguen, los inventores han descubierto que las biopelículas se pueden erradicar en 2 horas poniendo en contacto las mismas con composiciones de toxicidad suficientemente baja como para que sean adecuadas para su uso en dispositivos intravasculares.

Otras superficies fisiológicas que se podrían tratar con las composiciones desveladas en el presente documento incluyen, por ejemplo, la piel y la base de heridas, dientes, la orofaringe y la nasofaringe, sitios quirúrgicos, órganos, tejido nervioso, tendones, cartílagos y huesos. En algunas realizaciones, una solución de la presente invención puede ser pulverizada, nebulizada o inhalada por un sujeto en los pulmones, senos o tejido respiratorio para tratar o limpiar una herida o tejido, o para reducir el crecimiento de bacterias u hongos sobre el tejido. En algunas realizaciones, una solución de la presente invención se puede administrar por vía tópica a un sujeto, tal como un paciente humano, para tratar o prevenir una enfermedad de transmisión sexual (ETS). Una composición antimicrobiana de la presente invención para contacto con superficies fisiológicas se puede formular en forma de gel, crema o película, y la composición puede incluir uno o más aditivos colorantes, aromáticos, lubricantes, hidratantes, analgésicos y/o antiinflamatorios. Las superficies de dispositivos médicos implantados a las que se pueden aplicar estas composiciones incluyen, si bien no se limitan a las mismas, superficies de catéteres, cordones, tubos, drenajes, derivaciones, suturas, puntos metálicos, grapas, mallas, fundas, etc. Se pueden tratar superficies ambientalmente expuestas de plantas, dispositivos, edificios o máquinas con estas composiciones, incluyendo superficies de duchas, vestuarios, aseos e instalaciones médicas. Con estas composiciones se pueden desinfectar

sustancialmente superficies de cuidado personal y/o artículos de protección tales como guantes, máscaras, respiradores, parches, cubrezapatos, forros de calzado, chanclas, tapones de oídos, tapones de nariz, etc.

Las composiciones antimicrobianas de la presente invención se pueden poner en contacto con una superficie durante una serie de periodos de tiempo para destruir microorganismos o reducir el crecimiento de microorganismos.

5 Por ejemplo, el contacto se puede efectuar durante al menos 1, 2, 3, 4, 5 horas o al menos durante 1, 2, 3, 4, 5 o más días, o 1, 2, 3, 4, 5 o más semanas, etc. En algunas realizaciones, el contacto se puede efectuar durante menos de 5, 4, 3, 2 o 1 hora, o menos de 45, 30, o 15 minutos.

10 Tal como se usa en el presente documento, la especificación "un", "uno" o "una" puede significar uno o más. Tal como se usa en el presente documento en las reivindicaciones, cuando se usan junto con la palabra "comprende", las palabras "un", "uno" o "una" pueden significar uno o más de uno.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se emplea para indicar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalde una definición que se refiera a alternativas solamente y a "y/o". Tal como se usa en el presente documento, el término "otro" puede significar al menos un segundo o más.

15 A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el procedimiento que se está empleando para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

20 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la invención, se dan a modo ilustrativo solamente, puesto que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y ámbito de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

### **Breve descripción de las figuras**

25 Las siguientes figuras forman parte de la presente solicitud y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede ser comprendida mejor mediante referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas mostradas en el presente documento.

Figuras 1A-1B: Sinergia de TNG y citrato frente a *P. aeruginosa* y *C. albicans*.

30 Figura 2: Sinergia de TNG con quelantes duales, citrato y disulfiram, a una concentración de TNG de 0,2 mg/ml frente a *P. aeruginosa* y SARM.

Figura 3: Sinergia de TNG y otro quelante adicional, MesNA, frente a *P. aeruginosa* a una concentración de TNG de 1 mg/ml.

Figura 4: Cuando se usan citrato y MesNa como quelantes duales la sinergia con el TNG frente a *P. aeruginosa* se puede conseguir a una concentración de TNG de 0,1 mg/ml.

35 Figura 5: Sinergia de 10 % de etanol, citrato y TNG.

Figura 6: Sinergia de 15 % de etanol, citrato y TNG.

Figura 7: Sinergia de 20 % de etanol, citrato y TNG.

Figura 8: Sinergias de 0,05 % de TNG y 0,3 % de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - un biomejorador).

Figura 9: Sinergia de TNG y ácido láctico (un quelante ácido).

40 Figura 10: Sinergia de TNG y ácido caprílico (un biomejorador). La solución se ajustó hasta pH 4,7.

Figura 11: Sinergia de TNG y etilendiamina disuccinato (EDDS - un quelante).

Figura 12: Sinergia de TNG y tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato (THPF - un quelante biocida).

Figura 13: Sinergia de TNG + ácido caprílico y ácido glucónico (un quelante ácido). El pH no se ajustó.

Figura 14: Sinergia de TNG + ácido caprílico + ácido glucurónico (un quelante ácido). El pH no se ajustó.

45 Figura 15: Sustitución del etanol por ácido caprílico en una solución antimicrobiana de 7 % de citrato + 0,01 % de TNG + 20 % de etanol.

Figura 16: Sinergia de 7 % de citrato + 0,1 % de ácido caprílico + 0,01 % de TNG.

Figura 17: Estabilidad en almacenamiento de 1 año de 7 % de citrato + 20 % de etanol + 0,01 % de TNG.

**Descripción de realizaciones ilustrativas**

La presente invención proporciona, en varios aspectos, composiciones y procedimientos para inhibir el crecimiento microbiano o la formación de biopelículas sobre superficies. Por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos que siguen, se ha observado que un nitrato de glicerilo puede tener una acción sinérgica junto con un alcohol o un quelante en cuanto a reducir la formación de biopelículas y/o destruir microbios presentes en biopelículas. Las soluciones o composiciones antimicrobianas proporcionadas en el presente documento se pueden usar sobre superficies en ambientes o sobre productos usados en espacios médicos, de cuidado personal, alimentarios, veterinarios, sanitarios, industriales y/o comunitarios. En algunas realizaciones, las soluciones antimicrobianas exhiben poca o sustancialmente ninguna toxicidad en mamíferos y/o tienen poco o ningún impacto negativo sobre materiales usados para fabricar catéteres. En algunas realizaciones, las soluciones antimicrobianas proporcionadas en el presente documento se pueden aplicar por vía tópica o sobre la piel u otro tejido de un sujeto, tal como un mamífero o un ser humano.

Se observó que las soluciones que comprenden etanol (por ejemplo, aproximadamente un 10-30 %, preferentemente aproximadamente un 15-20 % de etanol) en combinación con trinitrato de glicerilo (TNG) erradicaban sinérgicamente y completamente las biopelículas en aproximadamente 2 horas. El TNG puede ser terapéuticamente atractivo para realizaciones que implican la administración del agente a un paciente humano (por ejemplo, en una solución de sellado), ya que el TNG se puede metabolizar y eliminar rápidamente, al tener una semivida de varios minutos. Varias concentraciones de TNG (por ejemplo, de aproximadamente 1-100 µg/ml) y volúmenes de sellado se encuentran adecuadamente dentro de los intervalos de dosis intravenosas en bolo de nitroglicerina que se han usado con seguridad en ensayos clínicos. Se pueden usar una variedad de concentraciones de citrato (por ejemplo, de aproximadamente un 1-10 %, preferentemente de un 7 %) y se encuentran dentro de los intervalos de concentración que tienen un historial de uso clínico seguro. En algunas realizaciones, las soluciones antimicrobianas proporcionadas en el presente documento pueden proporcionar una composición más segura y menos costosa para el tratamiento de sellado antimicrobiano. Tal como se muestra en los ejemplos que siguen, se observó que el TNG mostraba una sinergia en la destrucción bacteriana o en el tratamiento de biopelículas cuando se combinaba con peróxido, quelante, (alcohol y quelante), o (ácido graso y quelante). Tal como se muestra en los ejemplos que siguen, se puede conseguir la destrucción de la biopelícula con una solución de la presente invención en un periodo inferior o igual a aproximadamente 15 minutos para bacterias gramnegativas y en un periodo inferior o igual a aproximadamente 30 minutos para bacterias grampositivas en concentraciones diluidas.

Las soluciones antimicrobianas de la presente invención se pueden usar, por ejemplo, para desinfectar una superficie de un dispositivo médico, o se pueden usar para limpiar la piel o una herida de o sobre un sujeto, tal como un sujeto mamífero o un paciente humano. En algunas realizaciones, la solución se puede administrar al sujeto, por ejemplo, en forma de una solución de lavado para un catéter, o la solución se puede usar para limpiar o irrigar una herida o en un lavado para tratar una herida. En algunas realizaciones, la solución se puede usar por vía tópica sobre el sujeto, por ejemplo, para limpiar la piel del sujeto antes de la inserción de una aguja en el sujeto.

**I. Definiciones**

Las expresiones "dispositivo médico antimicrobiano" y "dispositivo médico" tal como se usan en el presente documento, se refieren a un instrumento, aparato, implemento, máquina, dispositivo, implante u otro artículo similar o relacionado, que incluye un componente o un accesorio, que está sometido a un contacto antimicrobiano secuencial según lo descrito, y está diseñado para su uso en el diagnóstico, tratamiento y/o prevención de enfermedades u otras afecciones relacionadas con la salud en un sujeto. El sujeto puede ser cualquier vertebrado, como un mamífero o un ser humano. Ejemplos no limitantes de dispositivos médicos antimicrobianos incluyen catéteres vasculares, tales como catéteres venosos centrales de inserción periférica, catéteres de diálisis, catéteres venosos centrales tunelizados de larga permanencia, catéteres venosos periféricos, catéteres venosos centrales de una sola luz y de múltiples luces de corta permanencia, catéteres arteriales, catéteres de la arteria pulmonar Swan-Ganz y similares; catéteres urinarios, otros dispositivos urinarios de larga permanencia, dispositivos urinarios de unión a tejidos, endoprótesis renales, prótesis peneanas, injertos vasculares, puertos de acceso vascular, tubos de drenaje de heridas, derivaciones de hidrocefalia, catéteres de drenaje ventricular, catéteres neurológicos y epidurales, neuroestimuladores, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos cápsulas, esfínteres urinarios artificiales, reemplazos articulares pequeños o temporales, dilatadores, válvulas cardíacas, prótesis ortopédicas, componentes metálicos para la columna vertebral, malla de reparación del sitio quirúrgico (por ejemplo, malla de hernia), tubos endotraqueales, endoprótesis biliares, tubos gastrointestinales, guantes (que incluyen de látex, no látex y nitrilo), otras prendas médicas, tablas, rieles de cama, condones, implantes del tracto colorrectal, implantes reproductivos masculinos y femeninos, implantes cosméticos o reconstructivos (por ejemplo, de senos, barbilla, mejillas, glúteos, nasales), sobros y bolsas para dispositivos médicos, incluyendo estetoscopios, implantes ortopédicos (por ejemplo, de articulaciones (rodilla, cadera, codo, hombro, tobillo), prótesis, clavos de fijación externa, varillas y clavos intramedulares, implantes de columna vertebral), otros dispositivos médicos y permanentes que pueden estar sujetos a infestación y/o actividad microbiana; y dispositivos metálicos, tales como marcapasos cardíacos, desfibriladores, cables de dispositivos electrónicos, adaptadores, extensiones de cables, dispositivos de

infusión implantables, generadores de impulsos implantables, dispositivos de control fisiológico implantables, dispositivos para localizar un generador de impulsos implantable o un dispositivo de infusión implantable debajo de la piel, y dispositivos (por ejemplo, agujas de recarga y cánulas para puerto de acceso) para el llenado de un dispositivo de infusión implantable. En algunas realizaciones, las soluciones o composiciones antimicrobianas de la presente invención se pueden usar para desinfectar sustancialmente o reducir el crecimiento de un microorganismo (por ejemplo, una bacteria u hongos) en la superficie luminal de un catéter vascular; por ejemplo, la solución o composición antibacteriana se puede usar para lavar el catéter y/o como solución de sellado.

La expresión "agente antimicrobiano", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, tal como un antibiótico o un antiséptico, capaz de prevenir o reducir el crecimiento o la reproducción de un microorganismo, tal como un microorganismo bacteriano o fúngico, o de destruir un microorganismo.

El término "antibiótico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o agente que es capaz de prevenir o reducir el crecimiento o la reproducción de una bacteria, o de destruir un organismo bacteriano o fúngico. Tales agentes se aplican generalmente en el tratamiento de una infección sistémica en un sujeto. Clases no limitantes de antibióticos incluyen, por ejemplo, una tetraciclina, minociclina, rifamicina, neomicinas, bacitracina, polimixinas, aminoglucósidos, carbapenems, cefalosporinas, cefazolin, azoles, nitrofurantoinas y rifampina. Las composiciones antimicrobianas de la presente invención pueden incluir uno o más antibióticos.

El término "antiséptico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o agente que es capaz de prevenir o reducir el crecimiento o la reproducción de un microorganismo (tal como bacterias, hongos, protozoos y virus), o de destruir un microorganismo, pero que generalmente no se aplica en el tratamiento de una infección sistémica en un sujeto, normalmente debido a limitaciones relacionadas con la absorción, penetración o toxicidad sistémica. Una clase no limitante de antisépticos que se pueden incluir en una composición antimicrobiana de la presente invención incluye compuestos de guanidío, tales como la clorhexidina. Otros ejemplos de antisépticos que se pueden usar incluyen los antisépticos de fenóxido (por ejemplo, clofoctol, cloroxilenol, triclosán), compuestos de amonio cuaternario, compuestos de cetilpiridinio, compuestos de yodo, hipocloritos, mentoles, eucaliptoles, timoles, salicilatos, clorxilenoles, aldehídos, glutaraldehído, péptidos, miméticos de péptidos, ácidos, bases, oxidantes, gardina, gendina, genlenol, genlosán, o genfoctol.

La clorhexidina es un agente de limpieza antiséptico que es activo frente a los estafilococos y otras bacterias grampositivas, así como frente a varios hongos. La clorhexidina se puede incluir en una solución antiséptica descrita en el presente documento. La clorhexidina es soluble tanto en agua como en soluciones orgánicas que incluyen alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, acetonitrilo, ácido acético, cloruro de metileno y cloroformo. Cuando se utiliza en el presente documento, el término "clorhexidina" puede incluir sales de clorhexidina. Otros antisépticos que se pueden usar en lugar de la clorhexidina o en combinación con la misma incluyen alexidinas, octenidinas y polihexametilbiguanidas.

La expresión "disolvente orgánico", tal como se usa en el presente documento se refiere a un disolvente que se puede usar para disolver agentes antimicrobianos e incluye, entre otros, alcoholes (por ejemplo, metanol, etanol), cetonas (por ejemplo, acetona, metiletil cetona), éteres (por ejemplo, tetrahydrofurano), aldehídos (por ejemplo, formaldehído), acetonitrilo, ácido acético, cloruro de metileno y cloroformo.

La expresión "agente de penetración", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente, tal como un compuesto orgánico, que es capaz de promover la penetración de un agente antimicrobiano, tal como un compuesto de guanidío, en la matriz del dispositivo médico. Ejemplos no limitantes de tales compuestos son ésteres (por ejemplo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo, acetato de amilo y combinaciones de los mismos), cetonas (por ejemplo, acetona y metiletil cetona), cloruro de metileno y cloroformo. Una solución antimicrobiana de la presente invención puede comprender uno o más agentes de penetración y/o disolventes orgánicos.

La expresión "agente alcalinizante", tal como se usa en el presente documento, se refiere a bases orgánicas e inorgánicas, que incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco en agua (por ejemplo, hidróxido de amonio al 27 %), dietilamina y trietilamina. Una solución antimicrobiana de la presente invención puede comprender un agente alcalinizante.

La expresión "organismos bacterianos y fúngicos", tal como se usa en la presente invención, significa todos los géneros y especies de bacterias y hongos que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, todas las bacterias esféricas, en forma de bastón y espirales. Ejemplos no limitantes de bacterias incluyen estafilococos (por ejemplo, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, entre otras bacterias grampositivas y bacilos gramnegativos. Ejemplos no limitantes de organismos fúngicos incluyen *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Los dispositivos médicos que se prestan al tratamiento de acuerdo con un procedimiento de la presente invención incluyen generalmente materiales no metálicos, tales como caucho, plástico, polietileno, poliuretano, silicona, poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), poli(tereftalato de etileno) (PET), látex, nitrilo y otros materiales poliméricos y elastoméricos, así como metales tales como el titanio y aleaciones metálicas tales como el acero inoxidable y el

nitinol. Los expertos en la técnica apreciarán que la lista de no metales, metales y aleaciones metálicas tal como se describe en el presente documento es solo ilustrativa, y no pretende ser exclusiva. Otros materiales que se prestan al tratamiento tal como se describe en el presente documento también están dentro del alcance de la presente invención.

5 En al menos algunas realizaciones expuestas en el presente documento, el dispositivo médico se lava después del contacto secuencial con los componentes antimicrobianos. Tal como se usa en el presente documento, el término "lavado" se refiere a la aplicación de un líquido al dispositivo médico con el fin de eliminar una sustancia. Por ejemplo, el lavado se puede definir además como el contacto de la superficie del dispositivo médico con agua desionizada. El contacto puede dar como resultado la eliminación del agente antimicrobiano y el disolvente no unido  
10 al dispositivo médico. Cualquier procedimiento conocido por los expertos habituales en la técnica se puede aplicar en el lavado del dispositivo médico. El lavado, por ejemplo, puede incluir enjuagar, mojar o sumergir el dispositivo en una solución de lavado usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica.

15 Detalles adicionales con respecto al contacto de un antimicrobiano con un dispositivo médico que no se mencionan específicamente en el presente documento se pueden encontrar, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos con N.<sup>os</sup>: 5 217 493, 5 624 704, 5 902 283 y 7 651 661, así como en la solicitudes de patente de Estados Unidos con N.<sup>os</sup> de publicación: 2005/0197634, 2003/0078242, 2007/0154621, 2008/0183152, 2010/0055086, 2011/0201692 y 2012/0064372, incorporadas todas por referencia.

20 En algunas realizaciones, una solución antiséptica de la presente invención se puede calentar, por ejemplo, durante la aplicación a un dispositivo médico. Tal como se usa en el presente documento, el término "calentamiento" se refiere a un aumento de la temperatura de una composición debido a la aplicación de una fuente de calor, cuando se compara con la temperatura de la composición en ausencia de la fuente de calor. El calentamiento puede ser mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos habituales en la técnica.

## II. Nitratos de glicerilo

25 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los nitratos de glicerol tal como el trinitrato de glicerilo (TNG), se pueden incluir en una composición antimicrobiana en combinación con un alcohol y/o un agente disruptor de biopelículas tal como un quelante a fin de destruir los microbios presentes, por ejemplo, en una biopelícula. Tal como se muestra en los siguientes ejemplos, se ha observado que el TNG puede interactuar de forma sinérgica con un alcohol y/o un quelante para destruir microorganismos tales como bacterias u hongos.

30 Los nitratos de glicerilo incluyen mono-, di- o trinitratos (por ejemplo, mononitrato de glicerilo, dinitrato de glicerilo o trinitrato de glicerilo). Se pueden usar mezclas de mononitrato de glicerilo, dinitrato de glicerilo y/o trinitrato de glicerilo en varias realizaciones de la presente invención. El TNG se denomina también nitroglicerina, trinitroglicerina, 1,2,3-trinitroxipropano y trinitrato de glicerilo.

35 Se pueden usar diversas concentraciones de nitrato de glicerilo, tal como, por ejemplo, TNG, con la presente invención. En algunas realizaciones, el nitrato de glicerol puede estar presente en una solución o composición antibacteriana de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,05-2000, 0,1-2000, 0,1-1750, 0,1-1500, 0,1-1250, 0,1-1000, 1-1000, 10-500, 25-500, 25-250, 50-500, 75-150, o de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 µg/ml, o cualquier intervalo derivable de los mismos. En algunas realizaciones, se contemplan concentraciones intermedias tales como, por ejemplo, 11,  
40 12,5, etc. Por ejemplo, la concentración del nitrato de glicerilo puede ser superior a aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 o 25 µg/ml. En algunas realizaciones, el nitrato de glicerilo puede estar en una concentración inferior a aproximadamente 2000, 1750, 1500 µg/ml. En algunas realizaciones, se pueden incluir aproximadamente 50-125 o aproximadamente 100 µg/ml de nitrato de glicerilo en una solución de sellado, tal como una solución de sellado para un catéter antimicrobiano intravascular, ya que estas concentraciones se pueden usar clínicamente de forma segura. En determinadas realizaciones preferentes, el nitrato de glicerilo es TNG.

45 Se incluye preferentemente un nitrato de glicerilo en una solución o composición antimicrobiana en combinación con un agente antimicrobiano adicional, tal como un alcohol o un agente quelante. En algunas realizaciones, se pueden incluir aproximadamente 25-250 µg/ml de TNG (u otro nitrato de glicerilo) en una solución o composición antiséptica en combinación, por ejemplo, con aproximadamente 10-70, 15-50, 15-50, 15-30, o aproximadamente el 20 %, o cualquier intervalo de los mismos, de un alcohol tal como etanol; estas concentraciones pueden ser particularmente  
50 útiles en soluciones de sellado o en realizaciones en las que se puede administrar o inyectar cierta cantidad del antiséptico a un sujeto, tal como un paciente humano. En determinadas realizaciones preferentes, una composición antimicrobiana puede comprender más de un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 % de un alcohol tal como etanol. En algunas realizaciones, una solución antimicrobiana puede contener aproximadamente un 20 % de etanol, aproximadamente un 7 % de citrato y aproximadamente 100 µg/ml de nitroglicerina; estas composiciones y  
55 concentraciones pueden ser particularmente adecuadas para un uso seguro de sellado para un catéter antimicrobiano intravascular.

En algunas realizaciones, está presente un nitrato de glicerilo en una solución antimicrobiana. Aunque ciertas realizaciones preferentes se dirigen a soluciones, es decir, líquidos, que comprenden un nitrato de glicerilo y un



agente antimicrobiano adicional, se prevé, no obstante, que se puedan usar diversos geles o composiciones semisólidas en diversas realizaciones. En otras realizaciones, las composiciones se pueden dejar secar de manera que formen revestimientos antimicrobianos protectores que se activan en contacto con líquidos. En algunas realizaciones, una solución antimicrobiana que comprende TNG puede ser una solución basada en agua o una solución acuosa. No obstante, se prevé que se puedan usar soluciones de TNG no acuosas que comprendan, por ejemplo, un disolvente orgánico o un disolvente inorgánico no acuoso (es decir, un disolvente diferente al agua) en varios aspectos de la presente invención. Las composiciones antimicrobianas en último término se pueden aplicar para formar un revestimiento o para ser impregnadas en artículos. En el caso de revestimientos, puede ser ventajoso incluir otros polímeros que se unan a las composiciones de nitrato de glicerilo durante el secado.

Aunque se incluyen preferentemente uno o más nitratos de glicerilo en determinadas realizaciones preferentes de la presente invención, se prevé que se pueda usar un nitrato éter o nitroalcohol en lugar de un nitrato de glicerilo, o en combinación con el mismo. Ejemplos no limitantes de nitrato éteres que se pueden incluir en una composición o solución antimicrobiana de la presente invención incluyen éteres nitrofenílicos, éteres nitrohalogenados y éteres nitroalquílicos.

### 15 III. Alcoholes

Una solución antimicrobiana de la presente invención puede comprender un alcohol. Ejemplos no limitantes de alcoholes que se pueden usar con la presente invención incluyen etanol, metanol, isopropanol, alcohol butílico, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol, alcohol feniletílico y similares. En algunas realizaciones, el alcohol puede ser un poliol tal como, por ejemplo, alcoholes de azúcar, dioles (por ejemplo, dipropilenglicol), trioles (por ejemplo, tripropilenglicoles), polialcoholes, etc. En algunas realizaciones, el alcohol puede ser un glicerol o un glicol tal como, por ejemplo, propilenglicol.

La concentración del alcohol está preferentemente en el intervalo del 5 %-80 % (v/v), de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 50 %, de un 15 % a un 40 %, de aproximadamente un 20-30 %, o de aproximadamente un 20 %. El alcohol puede estar presente en una solución antimicrobiana de la presente invención en una concentración que incluye, por ejemplo, un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % (v/v), o cualquier intervalo derivable de los mismos. En algunas realizaciones, la concentración del alcohol es superior a aproximadamente un 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 %. En algunas realizaciones, tales como la preparación de una solución de sellado, se puede usar una concentración menor de alcohol tal como, por ejemplo, de más de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 40 %, de aproximadamente un 10-30 %, o de aproximadamente un 20 % (v/v) a fin de reducir o eliminar sustancialmente la toxicidad. Además de las anteriores se contempla también el uso de concentraciones intermedias de alcohol tales como de un 11 %, un 22,5 %, un 26 % y similares. Cuando se incluye alcohol en una solución de sellado para un catéter vascular, una concentración menor de alcohol puede influir menos en las propiedades físicas del plástico del que está fabricado el catéter y puede reducir los riesgos para el paciente en cuyas venas está insertado el catéter. El etanol puede actuar como codisolvente con el TNG en soluciones acuosas, ya que el TNG tiene una baja solubilidad en agua él mismo.

### IV. Quelantes

Una solución antimicrobiana que comprende TNG puede comprender además un agente disruptor de biopelículas tal como un quelante. En algunas realizaciones, el quelante se selecciona entre el grupo que consiste en citratos, un ácido tetraacético, un tiosulfato, N-acetil cisteína, disulfiram y MesNA. No obstante, una amplia variedad de agentes quelantes son considerados útiles en la preparación de las soluciones antimicrobianas de la invención. Esto incluye quelantes tales como EDTA ácido libre, EDTA 2Na, EDTA 3Na, EDTA 4Na, EDTA 2K, EDTA 2Li, EDTA 2NH<sub>4</sub>, EDTA 3K, Ba (II)-EDTA, Ca (II)-EDTA, Co (II)-EDTA, Cu (II)-EDTA, Dy (III)-EDTA, Eu (III)-EDTA, Fe (III)-EDTA, In (III)-EDTA, La (III)-EDTA, CyDTA, DHEG, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), DTPA-OH, EDDA, EDDP, EDDS, EDDPO, EDTA-OH, EDTPO, EGTA, HBED, HDTA, HIDA, IDA, metil-EDTA, NTA, NTP, NTPO, O-Bistren, THPS, TTHA, EGTA, DMSA, un hidroxácido, un ácido hidroxámico, etilendiamina disuccinato (EDDS), tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato (THPS), deferroxamina, dimercaprol, citrato de zinc, quelantes de fosfonio, una combinación de bismuto y citrato, penicilamina, succímero o etidronato. Se contempla que cualquier quelante que se una al bario, calcio, cerio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, estroncio, galio o zinc sea aceptable para su uso en la presente invención. Otros agentes disruptores de biopelículas que pueden ser útiles en combinación con nitratos de glicerilo incluyen enzimas, D-aminoácidos e inhibidores de la percepción del quórum. En algunas realizaciones, se pueden incluir preferentemente EDDS o THPS en una solución que se usará para limpiar una tubería o para eliminar o desinfectar biopelículas de una tubería de petróleo.

En algunas realizaciones, el quelante es un hidroxácido (denominado también ácidos de frutas) o un ácido hidroxámico. El hidroxácido puede comprender, por ejemplo, uno o más de los siguientes: ácido láctico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido galacturónico, ácido salicílico, ácido glicólico o ácido glucurónico. El ácido hidroxámico puede ser ácido hidroxámico, ácido benzohidroxámico, ácido salicilhidroxámico o ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA). Ácidos hidroxámicos adicionales que se pueden usar con la presente invención o que se pueden incluir en una solución antimicrobiana de la presente invención se describen en Muri y col. (2002) y Pal y Saha (2012). En algunas realizaciones, el quelante puede estar presente en forma polimérica tal como poli(ácido galacturónico),

poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(ácidos hidroxámicos), o copolímeros. En algunas realizaciones, el quelante puede estar presente en una forma latente o protegida tal como un éster o un anhídrido, que puede ser activado mediante hidrólisis, por ejemplo, a través de gluconolactona o glicólido láctida, etc.

### **Citrato**

5 El término "citrato", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la base conjugada del ácido cítrico e incluye sales de citrato. El citrato en una solución puede proceder, por ejemplo, del citrato de trisodio, denominado también citrato de sodio, o de cualquier otra sal citrato. Se pueden usar diversas concentraciones de citrato con la presente invención. Por ejemplo, se puede usar aproximadamente un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 % o más, o cualquier intervalo derivable de los mismos. En algunas realizaciones, una concentración de aproximadamente un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 %, o cualquier intervalo derivable de los mismos (por ejemplo, un 1-10 %, un 5-9 %, 5-7,5 %, etc.) se puede incluir en una solución de sellado, tal como una solución de sellado para catéteres. Tal como se muestra en los ejemplos que siguen, ni 1 mg/ml de TNG ni un 7 % de citrato solos fueron capaces de erradicar biopelículas maduras de *Pseudomonas Aeruginosa* o *Candida Albicans* en 2 horas; su combinación, 1 mg/ml de TNG y un 7 % de citrato, sí fue capaz de erradicar completamente estas biopelículas en este periodo de tiempo.

### **V. Ácidos grasos**

En algunas realizaciones, la solución comprende un ácido graso, o un éster o un anhídrido de ácido graso. Tal como se muestra en los ejemplos siguientes, se demostró que la inclusión de un ácido graso en una composición que comprende TNG y un quelante daba como resultado una destrucción sinérgica de microorganismos. Estos resultados indican que las soluciones pueden destruir biopelículas muy rápidamente (por ejemplo, en un periodo de 15-30 minutos o menos). En algunas realizaciones preferentes, una solución que comprende un ácido graso (por ejemplo, un ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> o un ácido alcanoico C<sub>6-10</sub>, en combinación con un nitrato de glicerilo (por ejemplo, TNG) y un quelante se puede usar como solución de sellado en un dispositivo médico tal como, por ejemplo, un catéter. En general, el pH de la solución que comprende el ácido graso debe estar por debajo del pK del ácido graso, de manera que el ácido graso esté protonado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se prevé que la protonación del ácido graso pueda ser crítica o necesaria para mejorar la actividad antibacteriana del ácido graso. En realizaciones en las que se inserta una solución antimicrobiana en un sujeto, tal como un paciente humano o un animal mamífero, la solución se puede neutralizar sustancialmente o completamente hasta aproximadamente pH 7 y, a este pH, el ácido graso puede ser neutralizado y después metabolizado como nutriente por el sujeto. En realizaciones, cuando la solución se aplica a una herida, la herida puede mostrar un pH algo reducido en comparación con el sujeto, por ejemplo se puede observar un pH de aproximadamente 5 en un fluido de la herida aunque el mamífero o el sujeto humano tenga la sangre a aproximadamente pH 7 en la mayor parte del sujeto. En algunas realizaciones, aunque una porción de los ácidos grasos en la solución puede estar neutralizada cuando se aplica a una herida, se prevé que pueda ocurrir una destrucción bacteriana significativa y/o sinérgica en la herida como resultado de la solución antimicrobiana.

El ácido graso puede ser un ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> o, más preferentemente, un ácido alcanoico C<sub>6-10</sub>. El ácido graso puede ser ácido hexanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido caprílico (ácido octanoico), ácido caproico o ácido láurico. En algunas realizaciones, el ácido graso es ácido caprílico.

### **VI. Ejemplos**

40 Los siguientes ejemplos se incluyen para mostrar realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferentes para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y ámbito de la invención.

#### **Ejemplo 1**

##### **Sinergia del trinitrato de glicerilo con otros componentes en una solución antimicrobiana**

Se llevaron a cabo experimentos de erradicación de biopelículas usando el modelo de erradicación de biopelículas de Kuhns modificado. Brevemente, se colocaron discos de silicona fabricados con un elastómero de calidad médica en una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se incubaron durante la noche en plasma a 37 °C. Después se eliminó el plasma y se sustituyó con 1 ml de inóculo con  $5,5 \times 10^5$  UFC/ml de organismos de desafío. Se seleccionaron *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y *Candida albicans* (CA) como patógenos grampositivos, gramnegativos y fúngicos virulentos representativos que causan infecciones. Las placas se incubaron seguidamente durante 24 horas adicionales a 37 °C, lo que permitió un tiempo suficiente para la formación de una biopelícula madura. Después se retiró el inóculo y los discos se lavaron con agitación durante 30 minutos en solución salina estéril al 0,9 %. Tras el lavado, los discos se colocaron en 1 ml de varias soluciones desinfectantes y se incubaron a 37 °C durante 2 horas. A continuación se retiraron los discos y se colocaron en 5 ml de solución salina estéril al 0,9 % que contenía neutralizante y se sometieron a ultrasonidos a fin

de alterar cualquier biopelícula restante. La solución resultante se cultivó después cuantitativamente haciendo diluciones en serie en solución salina estéril al 0,9 % y disponiéndolas en placas de agar (TSA + 5 % de sangre de oveja) para todos los organismos bacterianos y en placas de dextrosa agar Sabouraud para levaduras. La erradicación completa de la biopelícula requiere la recuperación de ninguna colonia viable después del tratamiento. La recuperación de menos organismos viables que el control indica una erradicación parcial de la biopelícula. Los resultados de varios experimentos que muestran las sinergias del trinitrato de glicerilo (TNG) con quelantes y etanol se dan en las tablas que siguen a continuación. Los resultados comunicados son las colonias viables (en UFC/ml) recuperadas del procedimiento de erradicación de biopelícula descrito anteriormente:

5

Experimento 1: Control y componentes individualmente			SARM	PA	CA
Control			5,00E+05	5,00E+05	5,00E+05
Citrato (7 %)			2,92E+04	2,24E+04	2,16E+04
TNG (1 mg/ml)			5,00E+03	2,05E+03	5,00E+03
MesNA (5 %)			5,00E+05	5,00E+05	5,00E+05
Disulfiram (0,2 mg/ml)			2,00E+04	5,00E+05	0,00E+00

Experimento 2: Sinergia de citrato y TNG frente a PA y CA			SARM	PA	CA
TNG (0,5 mg/ml)	citrato (7 %)		5,00E+03	0,00E+00	4,40E+03
TNG (1 mg/ml)	citrato (7 %)		5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00

10

Experimento 3: Sinergia de TNG y MesNa frente a PA			SARM	PA	CA
TNG (1 mg/ml)	MesNA (5 %)		5,00E+03	0,00E+00	5,85E+03

Experimento 4: Sinergia de TNG + citrato + disulfiram			SARM	PA	CA
TNG (0,2 mg/ml)	citrato (7 %)	Disulfiram (0,2 mg/ml)	2,50E+02	0,00E+00	0,00E+00

Experimento 5: Sinergia de TNG + MesNa + citrato			SARM	PA	CA
TNG (0,1 mg/ml)	MesNA (5 %)	citrato (7 %)	5,00E+03	0,00E+00	3,00E+04

Experimento 6: Etanol + citrato (valores de referencia)			SARM	PA	CA
citrato (7 %)	etanol (10 %)		5,00E+03	0,00E+00	5,50E+02
citrato (7 %)	etanol (15 %)		5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (20 %)		2,10E+03	0,00E+00	0,00E+00

Experimento 7: Sinergias del TNG + etanol + citrato			SARM	PA	CA
citrato (7 %)	etanol (10 %)	TNG (0,5 mg/ml)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (10 %)	TNG (0,2 mg/ml)	3,50E+03	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (15 %)	TNG (0,2 mg/ml)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (15 %)	TNG (0,1 mg/ml)	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (20 %)	TNG (0,1 mg/ml)	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
citrato (7 %)	etanol (20 %)	TNG (0,05 mg/ml)	5,00E+03	0,00E+00	0,00E+00

15

Estos resultados muestran que la concentración del TNG se puede reducir 10 veces (hasta 100 µg/ml) con respecto a la que, de otro modo, requeriría él solo, en presencia de etanol y citrato, para erradicar completamente las biopelículas maduras en 2 horas. Estos niveles alcanzan las que son concentraciones seguras para uso intravenoso o tópico. Se observa una sinergia similar con el TNG y uno solo o combinaciones de otros quelantes (TNG y citrato frente a CA y PA, TNG y MesNA frente a PA, TNG, citrato y disulfiram frente a SARM y PA, y TNG, citrato y MesNA frente a PA). La composición etanol-citrato-TNG es particularmente útil para el tratamiento de sellado antimicrobiano de catéteres vasculares, en los que se puede eliminar de manera más segura y económica la necesidad de antibióticos o altas concentraciones de etanol requeridas para la recuperación del catéter colonizado.

Las sinergias se ilustran gráficamente en las Figuras 1-7. Las figuras 1A-1B ilustran la sinergia del TNG y el citrato para el TNG a una concentración de 0,5 mg/ml frente a *P. aeruginosa* y adicionalmente para el TNG a una concentración de 1 mg/ml frente a *C. albicans*.

Las Figuras 5-7 muestran las sinergias del TNG con citrato en una serie de concentraciones de etanol. Específicamente, la serie de Figuras muestra cómo la concentración sinérgica del TNG se puede reducir a medida que aumenta la concentración de etanol. La Figura 5 muestra que con un 10 % de etanol y un 7 % de citrato, una concentración de TNG de 0,2 mg/ml erradicaba la *P. aeruginosa* y la *C. albicans* y una concentración de TNG de 0,5 mg/ml erradicaba por completo el SARM. La Figura 6 muestra que cuando la concentración de etanol se incrementa hasta un 15 %, la concentración de TNG requerida para erradicar el SARM se reducía hasta 0,2 mg/ml. La Figura 7 muestra que cuando la concentración de etanol aumenta aún más hasta el 20 %, la concentración de TNG requerida para erradicar el SARM se reduce a 0,1 mg/ml.

## Ejemplo 2

### **Composiciones para inhibir biopelículas que usan nitratos de glicerilo**

Se estudiaron otros biomejoradores, quelantes y combinaciones junto con el TNG frente a biopelículas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Los estudios de erradicación de biopelículas (similares a los experimentos 1-7) se realizaron sobre discos de silicona en los que se dejó que se formaran biopelículas durante 24 horas. Los tiempos de exposición a las soluciones desinfectantes fueron tiempos que variaban de 15 minutos a 2 horas seguidos de un recuento cuantitativo de unidades formadoras de colonias (UFC) por centímetro cuadrado de disco mediante ultrasonidos y cultivo en placas cuantitativas. Ejemplos de sinergia del peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido caprílico, etilendiamina disuccinato, tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato, ácido glucónico y ácido glucurónico con el TNG se muestran en las Figuras 8-14. Estas soluciones se pueden usar, por ejemplo, para desinfectar un catéter como solución de sellado.

El experimento determinaba si la composición de un 7 % de citrato + un 0,01 % de TNG + un 20 % de etanol podía erradicar los 3 organismos modelo cuando se sustituía el 20 % de etanol por un 0,1 % de ácido caprílico. La solución de ácido caprílico se acidificó hasta pH 4,7. Los resultados para un experimento de erradicación de biopelículas de 2 horas se presentan en la Figura 15. Se observa la erradicación completa de las biopelículas de todos los organismos en un periodo de 2 horas con un 7 % de citrato + un 0,01 % de TNG y un 0,1 % de ácido caprílico a pH 4,7, tal como se observó con un 7 % de citrato + un 0,01 % de TNG + 20 % de etanol. Se observa una sinergia similar a la de la Figura 7 (0,01 % de TNG + 7 % de citrato + 20 % de etanol) para el SARM en la Figura 16 (0,01 % de TNG + 7 % de citrato + 0,1 % de ácido caprílico). Nótese que 0,1 mg/ml es lo mismo que un 0,01 % cuando se comparan las Figuras 7 y 16.

Se ensayó la estabilidad en almacenamiento de la solución de un 7 % de citrato + un 0,01 % de TNG + un 20 % de etanol tras 1 año de almacenamiento a 25 °C. La solución se almacenó en un recipiente de vidrio y se protegió de la luz. La comparación entre la eficacia de erradicación de las biopelículas de referencia (Figura 7) y la eficacia tras 1 año de almacenamiento se muestra en la Figura 17. La actividad antimicrobiana de la solución de un 7 % de citrato + un 20 % de etanol + un 0,01 % de TNG permaneció inalterada tras 1 año de almacenamiento a 25 °C. Estos ejemplos muestran claramente una sinergia entre el TNG y el peróxido de hidrógeno, ácido láctico, ácido caprílico, etilendiamina disuccinato, tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato, ácido glucónico y/o ácido glucurónico.

Todos los procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento se pueden realizar y ejecutar sin una experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los procedimientos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferentes, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas del procedimiento descrito en el presente documento sin apartarse del concepto de la invención tal como es definido por las reivindicaciones adjuntas.

## **REFERENCIAS**

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan procedimientos ilustrativos u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento, se incorporan específicamente por referencia en el presente documento.

Patentes de Estados Unidos con N.ºs: 5 217 493, 5 624 704, 5 902 283 y 7 651 661;

Solicitudes de patente de Estados Unidos con N.ºs de publicación: 2005/0197634, 2003/0078242, 2007/0154621, 2008/0183152, 2010/0055086, 2011/0201692 y 2012/0064372;

Slobbe y col., "Prevention of Catheter-Related Bacteremia with a Daily Ethanol Lock in Patients with Tunnelled Catheters: A Randomized, Placebo-Controlled Trial", *PLoS ONE* 5(5): e10840).

5 Crnich y col., "Prospective Randomized Double-Blind Trial of an Ethanol Lock for Prevention of CLABSI" [Resumen]. En: *49th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco, EE.UU. 2009).

Muri y col. "Hydroxamic acids as pharmacological agents". *Curr Med Chem*. Sep; 9(17):1631-53, 2002.

10 Pal y Saha. "Hydroxamic acid - A novel molecule for anticancer therapy". *J Adv Pharm Technol Res*. Abr-Jun; 3(2): 92-99, 2012.

## REIVINDICACIONES

1. Una solución antimicrobiana que comprende un nitrato de glicerilo en combinación con un quelante y/o un ácido alcanoico C<sub>6-12</sub>, en la que si el quelante es citrato, el citrato comprende un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 % o cualquier intervalo derivable de los mismos.
- 5 2. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente la solución un alcohol en una cantidad superior a un 10 % (v/v) y/o un peróxido.
3. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo la solución:
  - (a) el nitrato de glicerilo, el alcohol y el quelante;
  - (b) el nitrato de glicerilo y el ácido alcanoico C<sub>6-12</sub>;
  - 10 (c) el nitrato de glicerilo, el peróxido y el quelante; o
  - (d) el nitrato de glicerilo, el ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> y el quelante.
4. La solución de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el peróxido está en una cantidad de un 0,01-10 %, de un 0,1-3 %, o de un 0,1-2 %.
- 15 5. La solución de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> está en una cantidad de un 0,001-10 %, de un 0,01-5 %, o de un 0,05-3 %.
6. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo la solución TNG, el ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> y el quelante, en particular en la que el ácido alcanoico C<sub>6-12</sub> es un ácido alcanoico C<sub>6-10</sub>, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido caprílico (ácido octanoico), en particular un 0,01-5 % de ácido caprílico, ácido caproico o ácido láurico.
- 20 7. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo la solución adicionalmente un tensioactivo, un agente humectante, un emoliente, un hidratante, una fragancia o un agente aromatizante.
8. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el nitrato de glicerilo es trinitrato de glicerilo (TNG), en particular en la que el trinitrato de glicerilo tiene una concentración de 0,05 a 1500 µg/ml, de 1 a 1000 µg/ml o de 10 a 500 µg/ml, o en la que el nitrato de glicerilo es dinitrato de glicerilo o mononitrato de glicerilo.
- 25 9. La solución de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el quelante es citrato, un ácido tetraacético, un tiosulfato, N-acetil cisteína, disulfiram, un hidroxiácido, un ácido hidroxámico, etilendiamina disuccinato (EDDS), tetrakis hidroximetil fosfonio sulfato (THPF) o MesNA, en particular en la que el hidroxiácido es un α-hidroxiácido, ácido láctico, ácido glucónico, ácido glicólico, ácido galacturónico, ácido salicílico o ácido glucurónico.
- 30 10. La solución de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el ácido hidroxámico es ácido hidroxámico, ácido benzohidroxámico, ácido salicilhidroxámico o ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA).
11. La solución de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el citrato comprende un 1-10 %, un 3,5-7 % o un 4 % de la solución, o en la que el MesNA comprende un 1-10 % (v/v) o un 5 % de la solución, o en la que el disulfiram tiene una concentración de 0,05 - 5 mg/ml.
- 35 12. La solución de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el alcohol es etanol, metanol, isopropanol, alcohol butílico, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol o alcohol feniletílico.
13. La solución de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el alcohol comprende de más de un 10 % a un 80 % (v/v) de la solución, o en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de más de un 10 % a un 40 %, o de un 15-30 % (v/v), o en la que la concentración del alcohol es de un 20 %.
- 40 14. La solución de acuerdo con la reivindicación 2, comprendiendo la solución más de un 10 % a un 60 % de etanol, un 1-20 % de citrato y 10-500 µg/ml de trinitrato de glicerilo, o comprendiendo la solución de un 15 % a un 30 % de etanol, un 2,5-10 % de citrato y 50-250 µg/ml de trinitrato de glicerilo.
15. La solución de acuerdo con la reivindicación 2, comprendiendo la solución 25-250 µg/ml de TNG y un 15-30 % de un alcohol.
- 45 16. La solución de acuerdo con la reivindicación 2, comprendiendo la solución un 10-30% de etanol, TNG en una concentración de 1-100 µg/ml y un 1-10 % de citrato.
17. Un procedimiento no terapéutico para reducir organismos microbianos de una superficie que comprende poner en contacto la superficie con una solución antimicrobiana de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 durante un periodo de tiempo suficiente para reducir los organismos microbianos sobre la superficie.
- 50 18. La solución antimicrobiana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 para su uso en un procedimiento de tratamiento de una herida en un sujeto o la piel de un sujeto o la superficie de un dispositivo

médico implantado, en el que el procedimiento comprende administrar o poner en contacto la solución antimicrobiana a al menos una porción de la herida o la piel o la superficie de un dispositivo médico implantado.

19. Uso de la solución antimicrobiana de acuerdo con la reivindicación 1 como solución de sellado o como solución de lavado para un catéter o un dispositivo médico.

FIG. 1A:

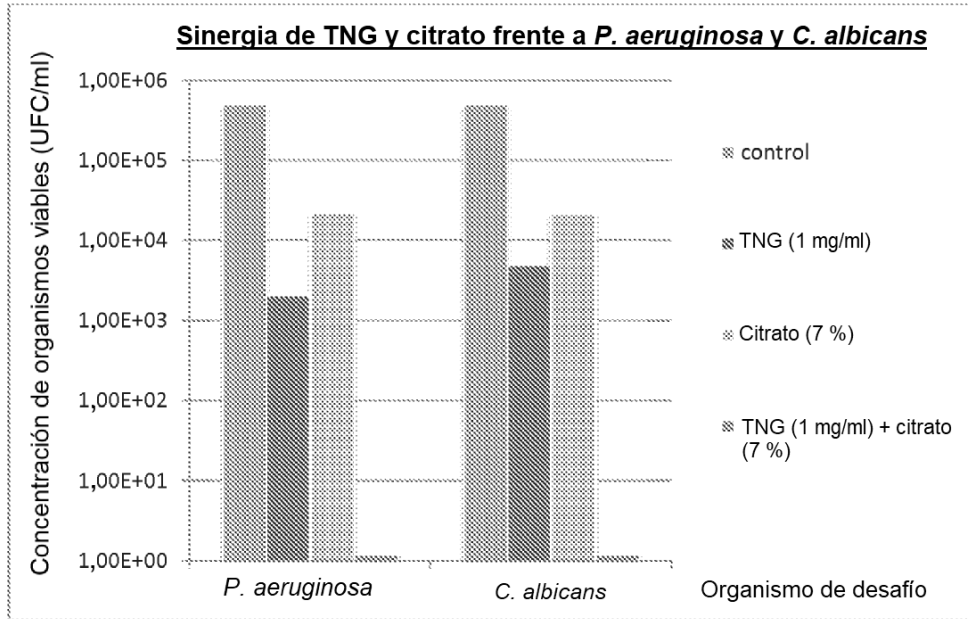
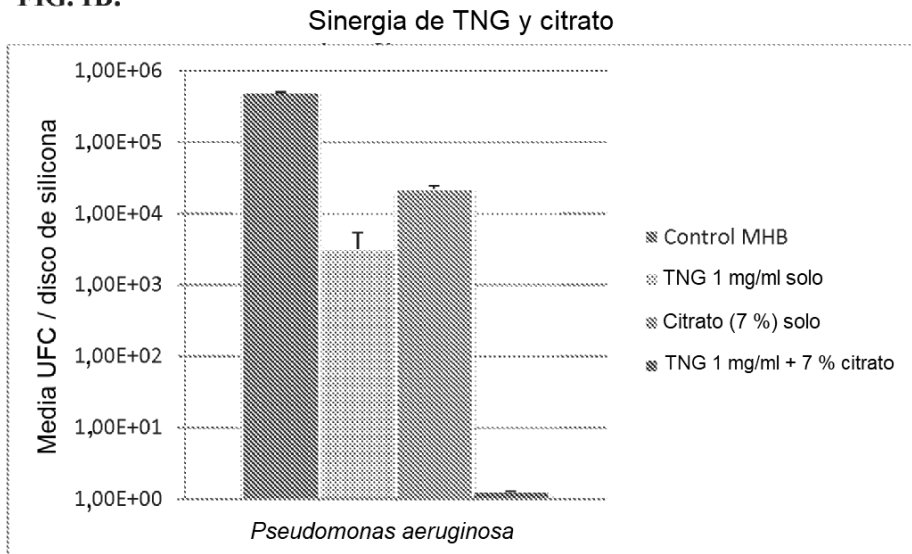


FIG. 1B:



FIGS. 1A-B



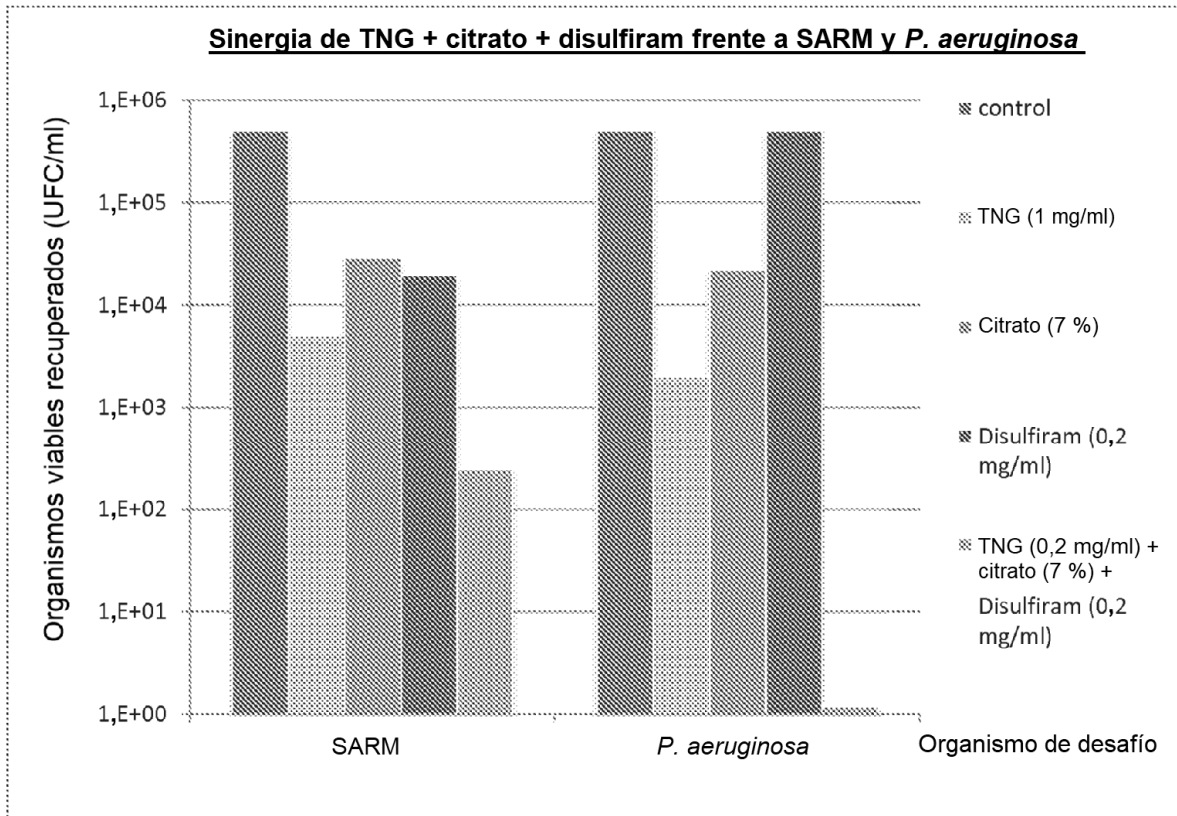
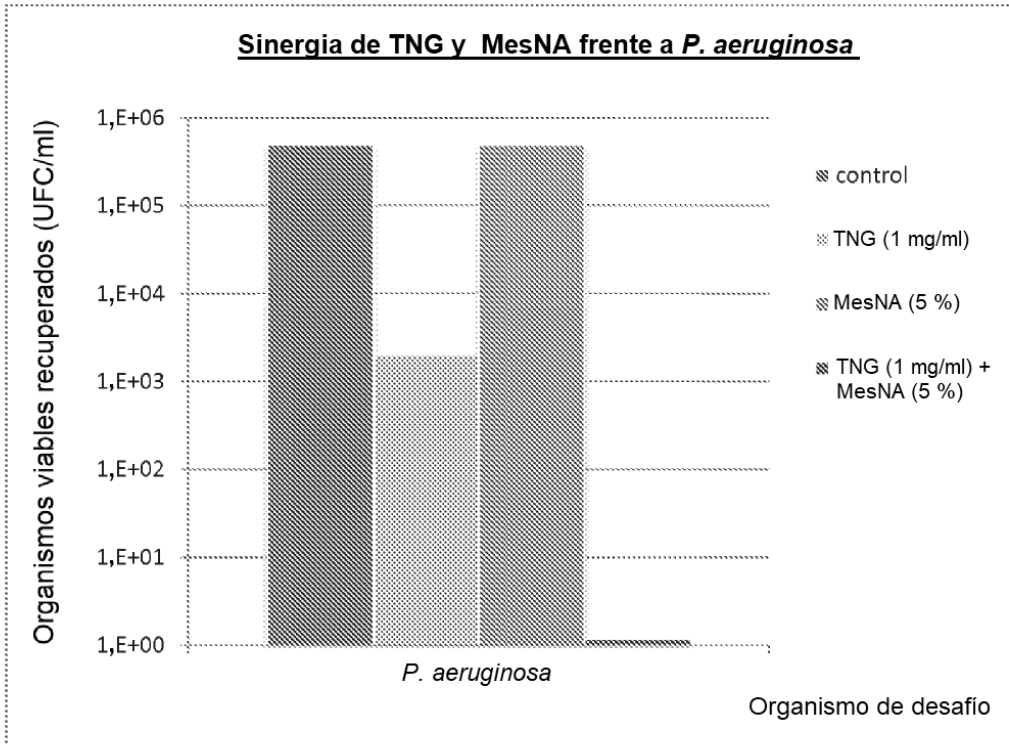


FIG. 2



Sinergia de TNG y MesNA

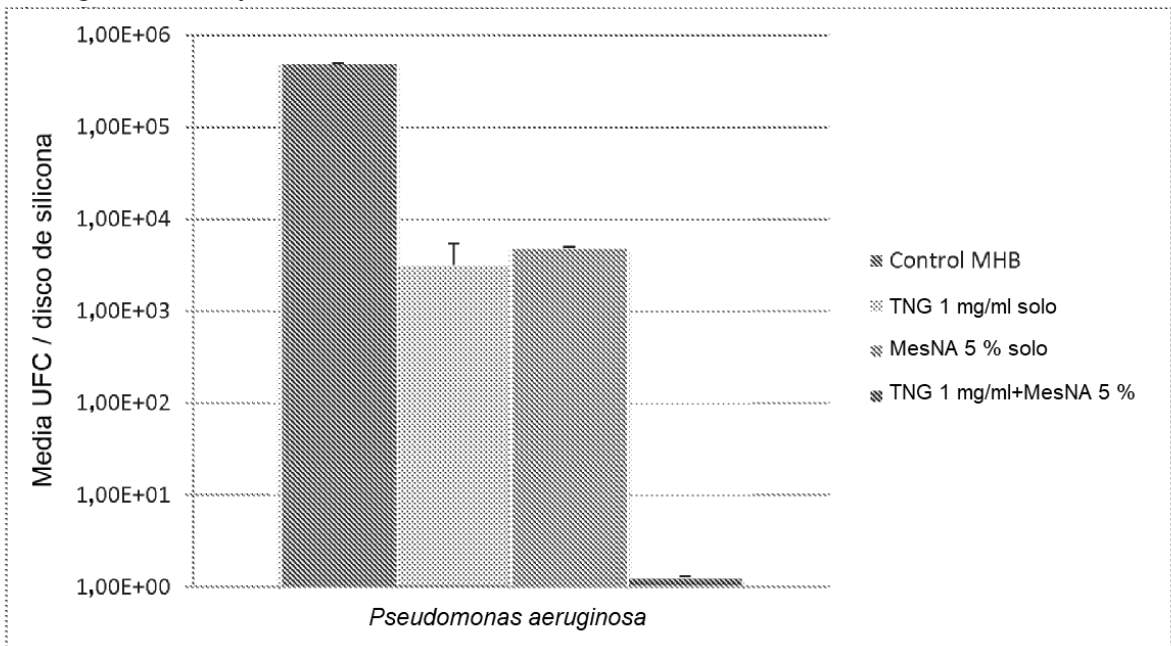


FIG. 3

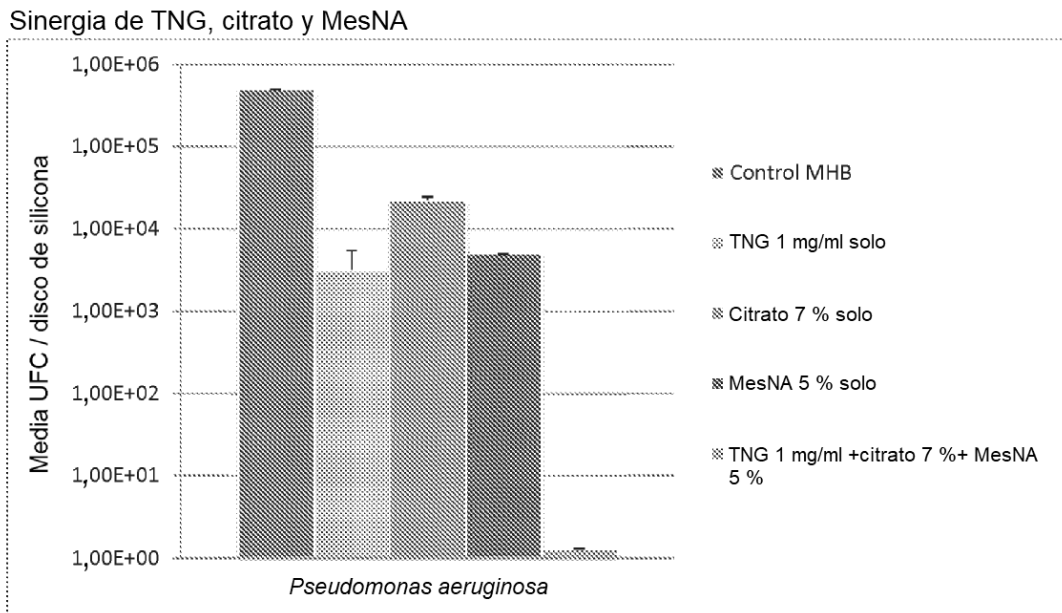
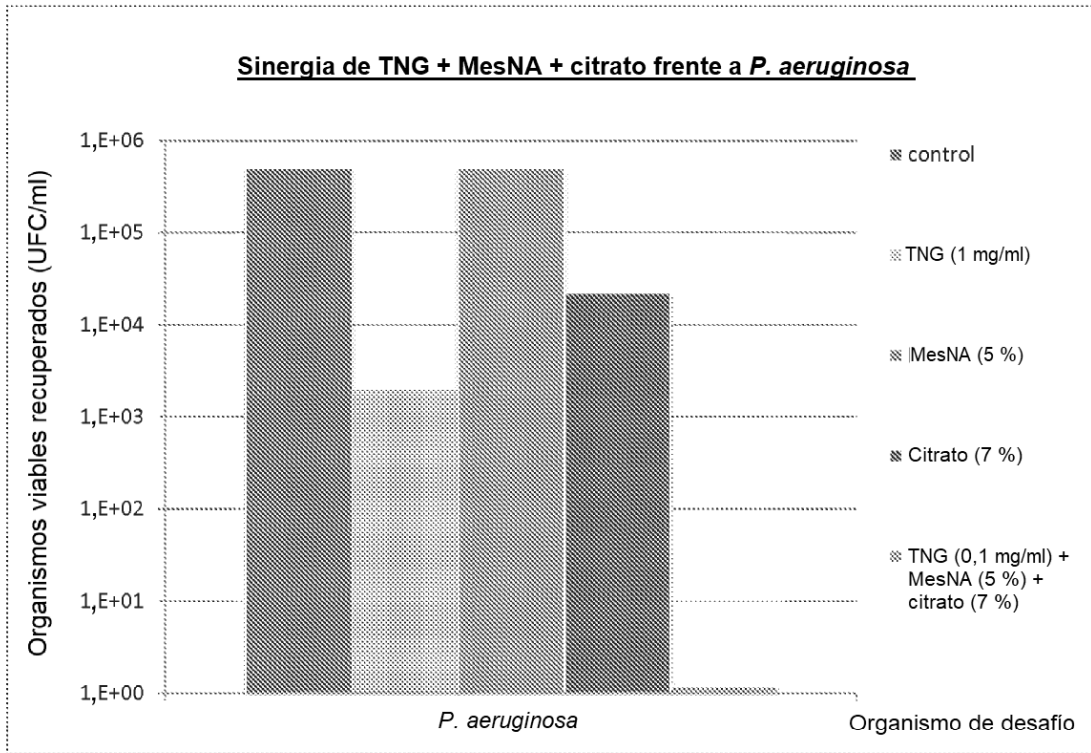
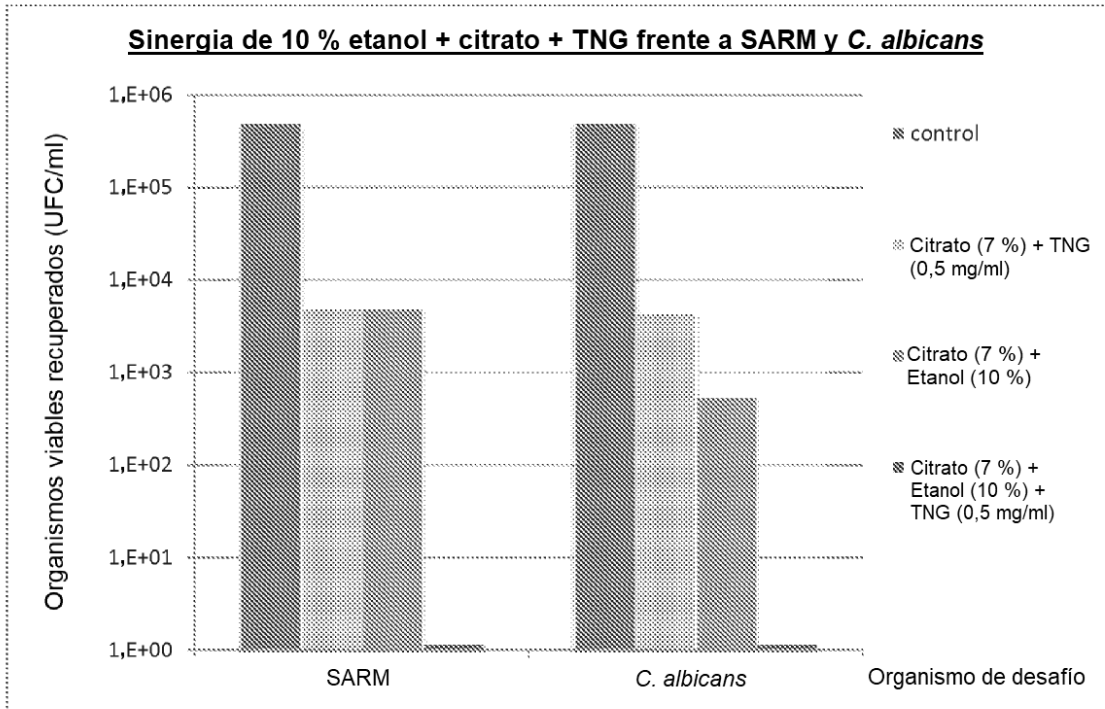


FIG. 4



Sinergia de 10 % de etanol, citrato y TNG

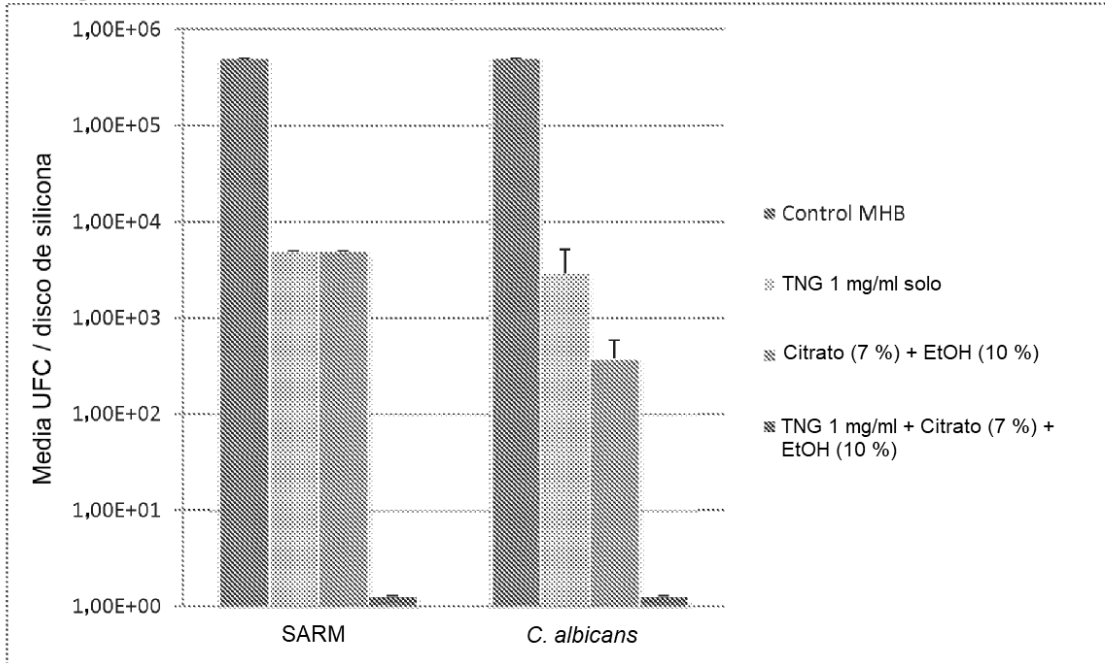
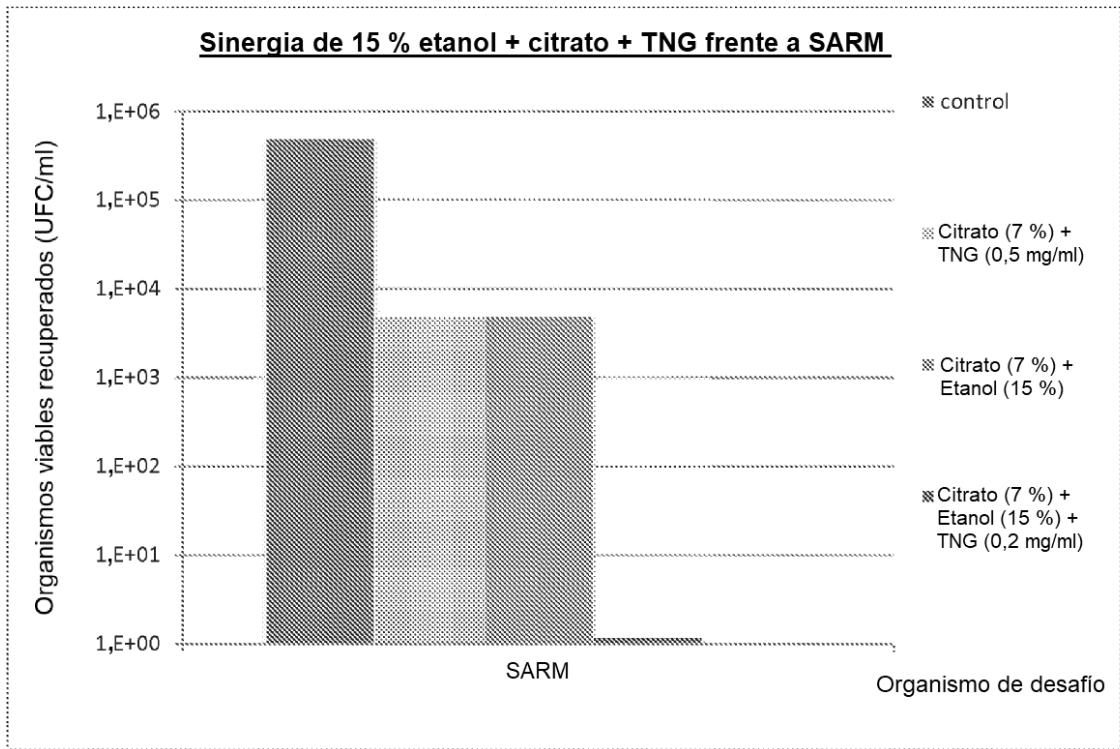


FIG. 5



Sinergia de 15 % de etanol, citrato y TNG

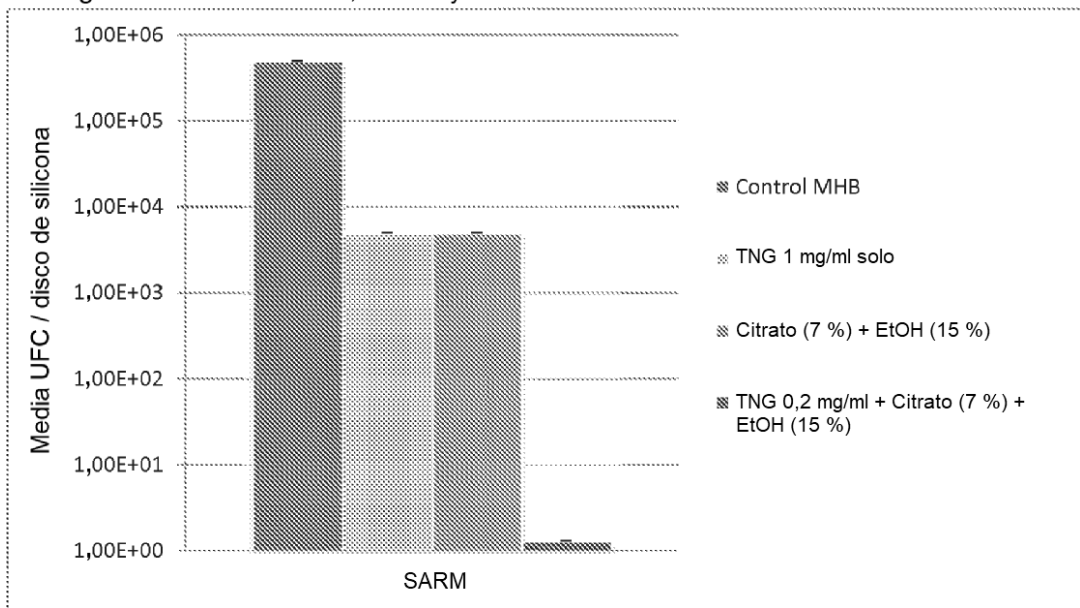
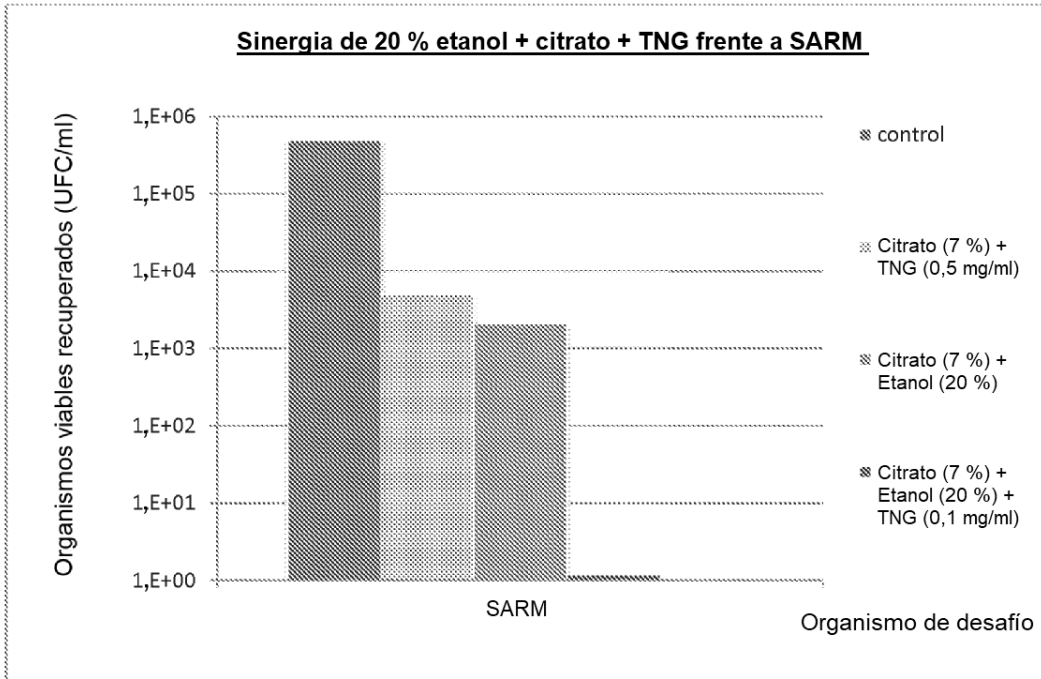


FIG. 6



Sinergia de 20 % de etanol, citrato y TNG

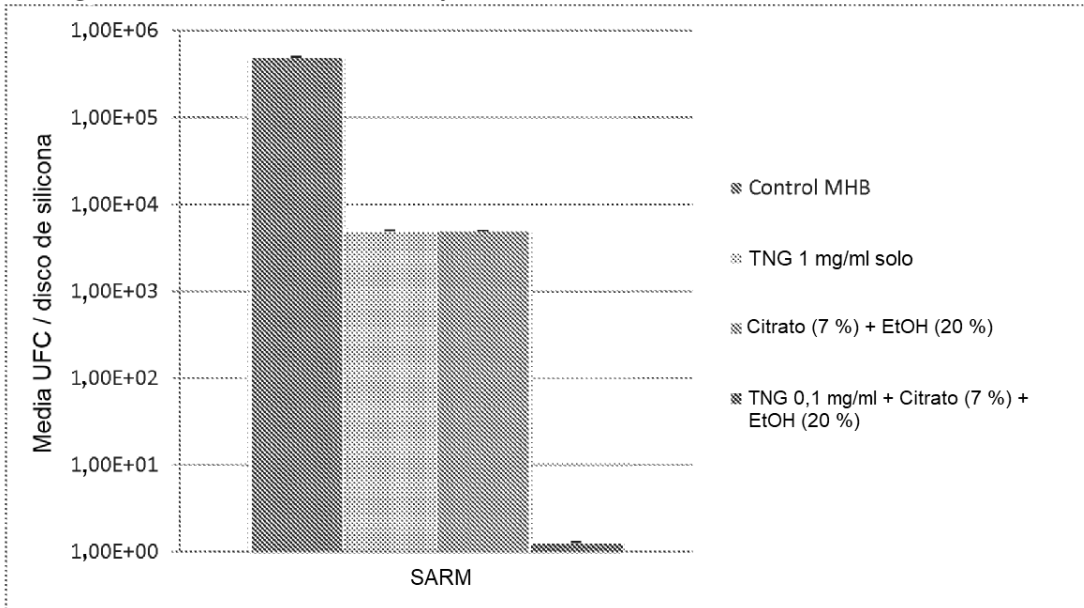


FIG. 7

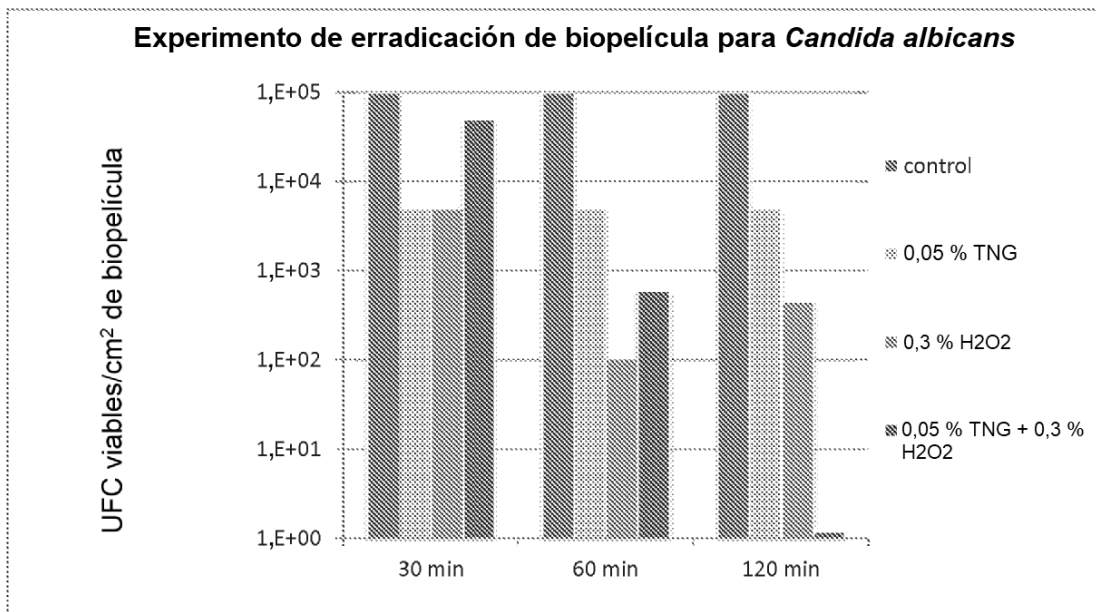
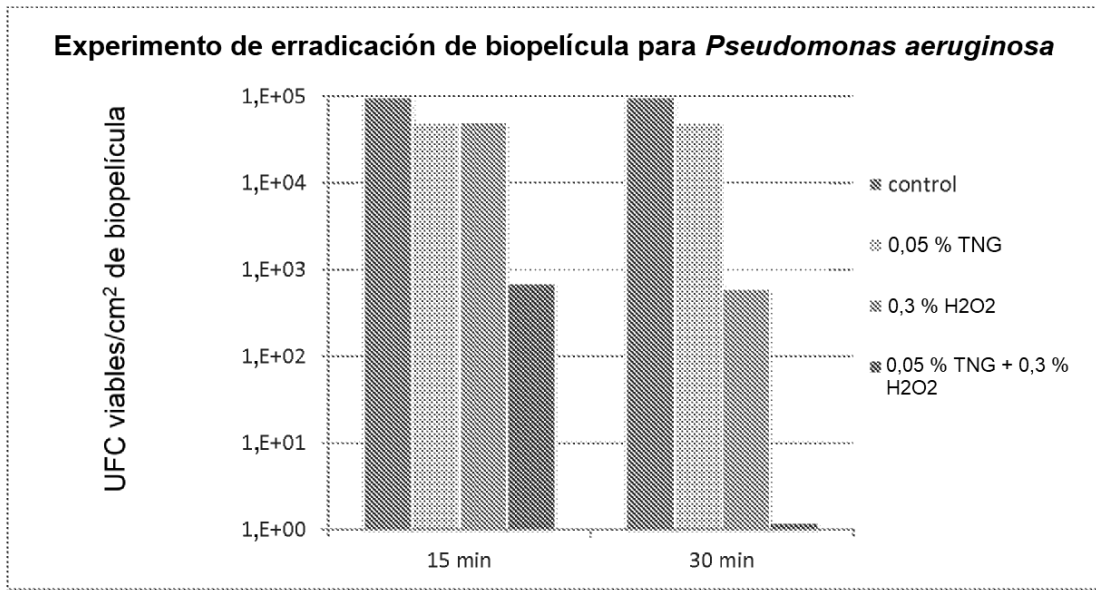


FIG. 8

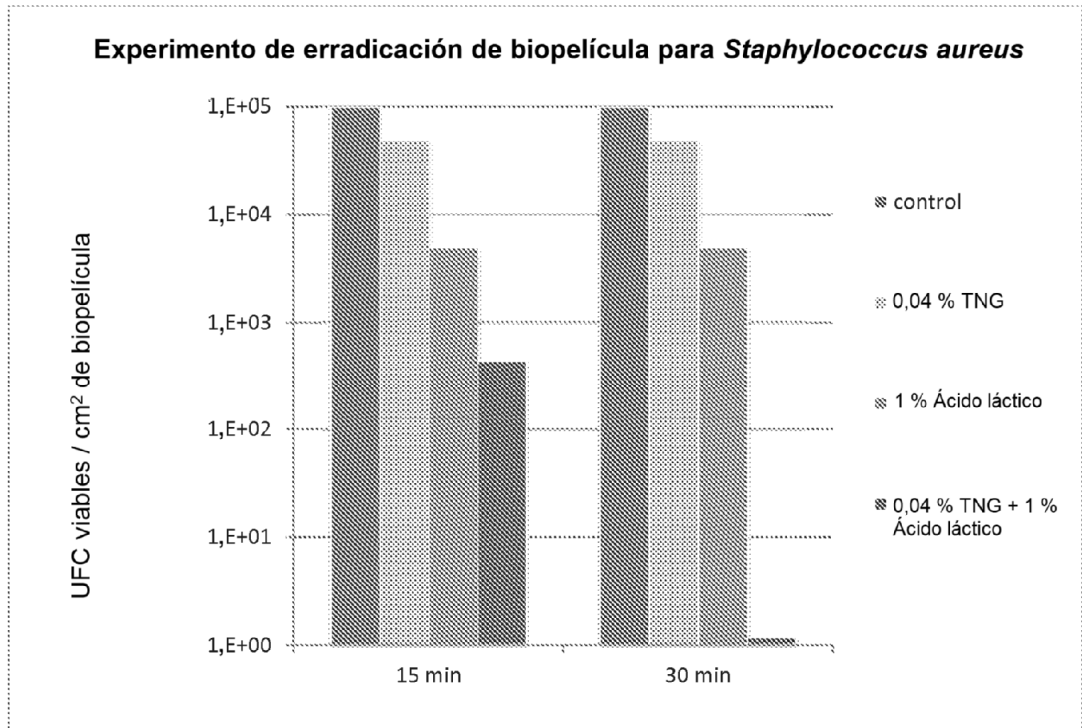


FIG. 9



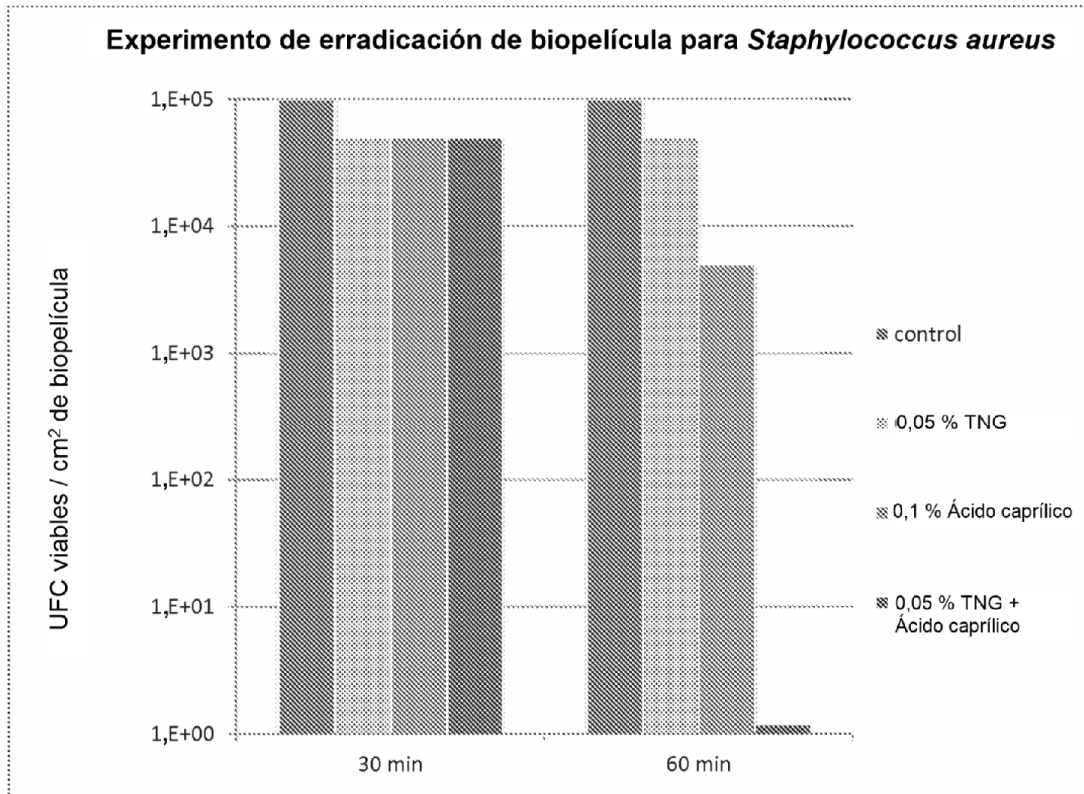


FIG. 10

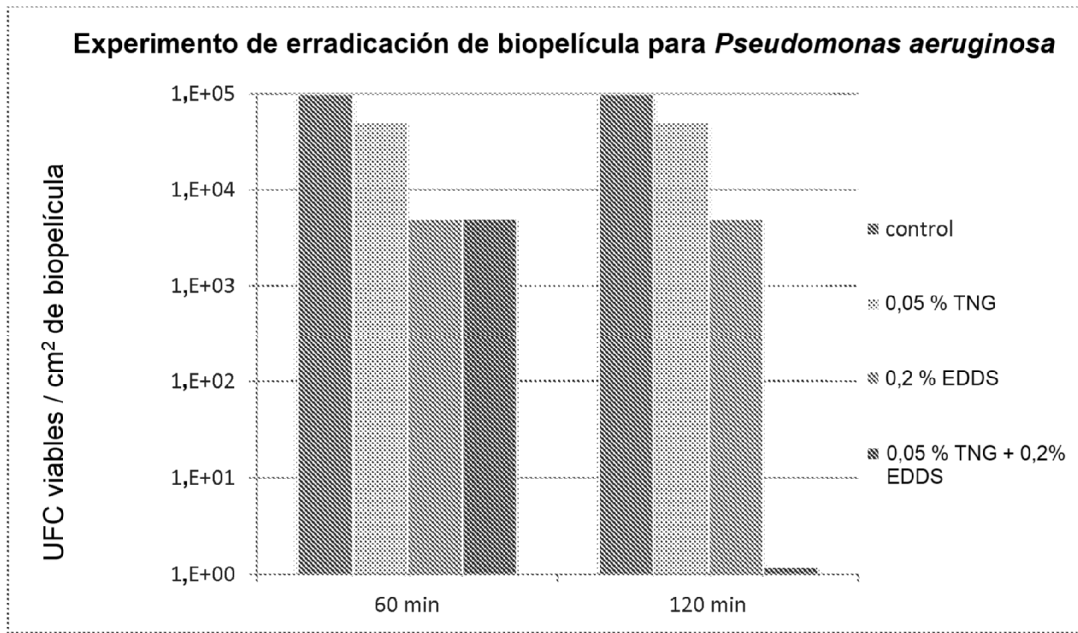


FIG. 11

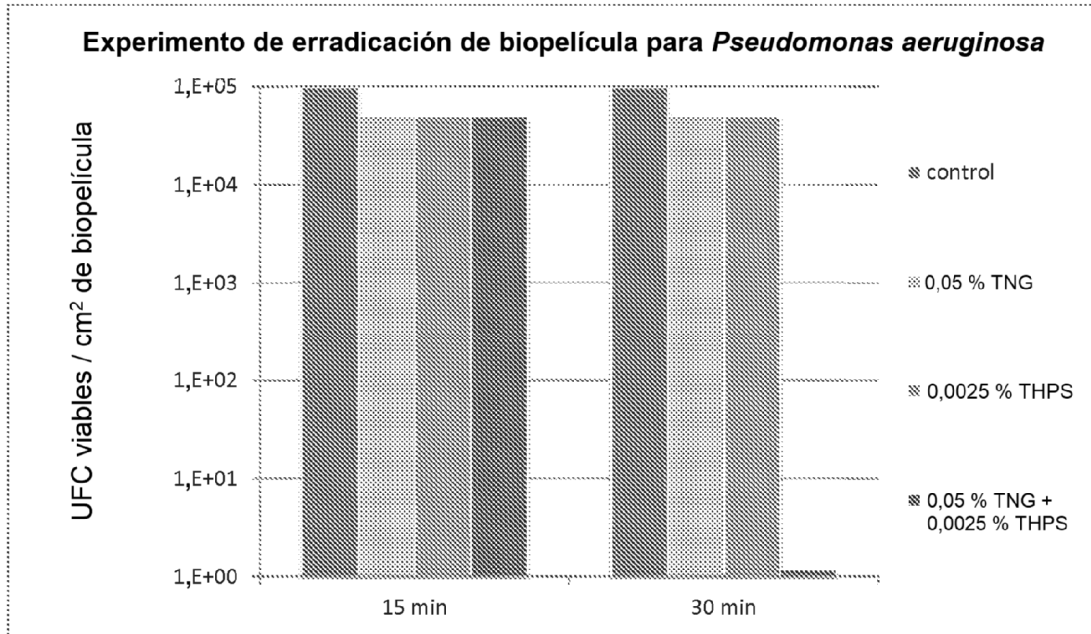


FIG. 12

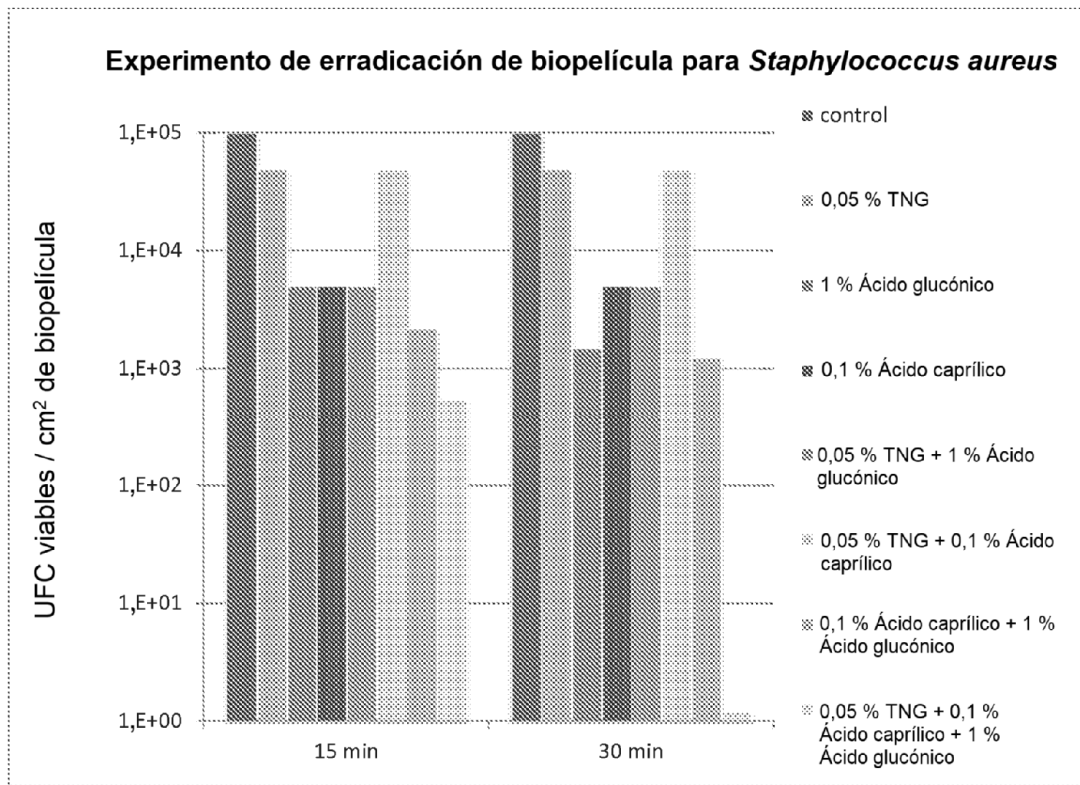


FIG. 13

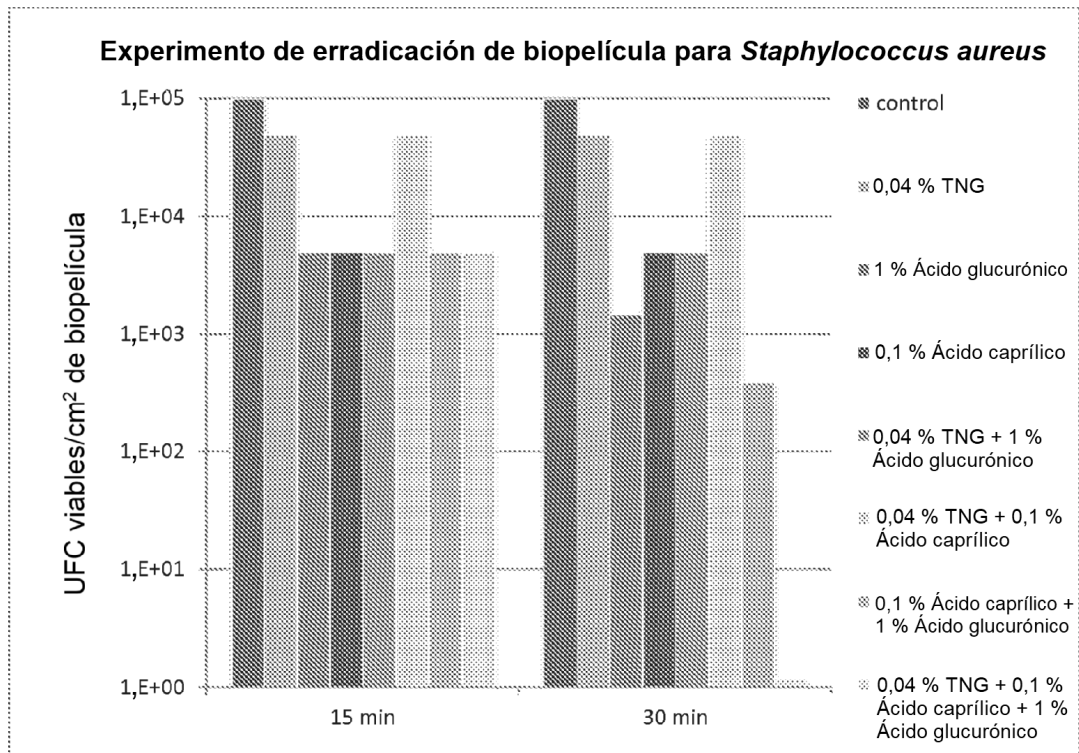


FIG. 14

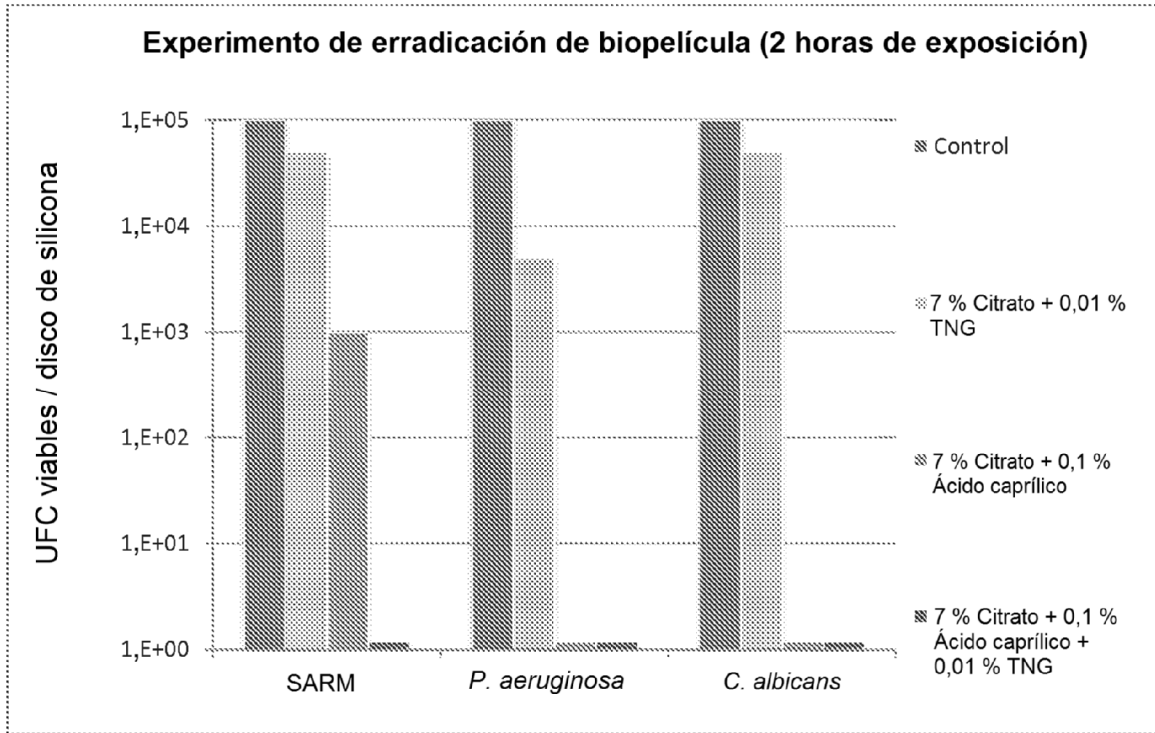


FIG. 15

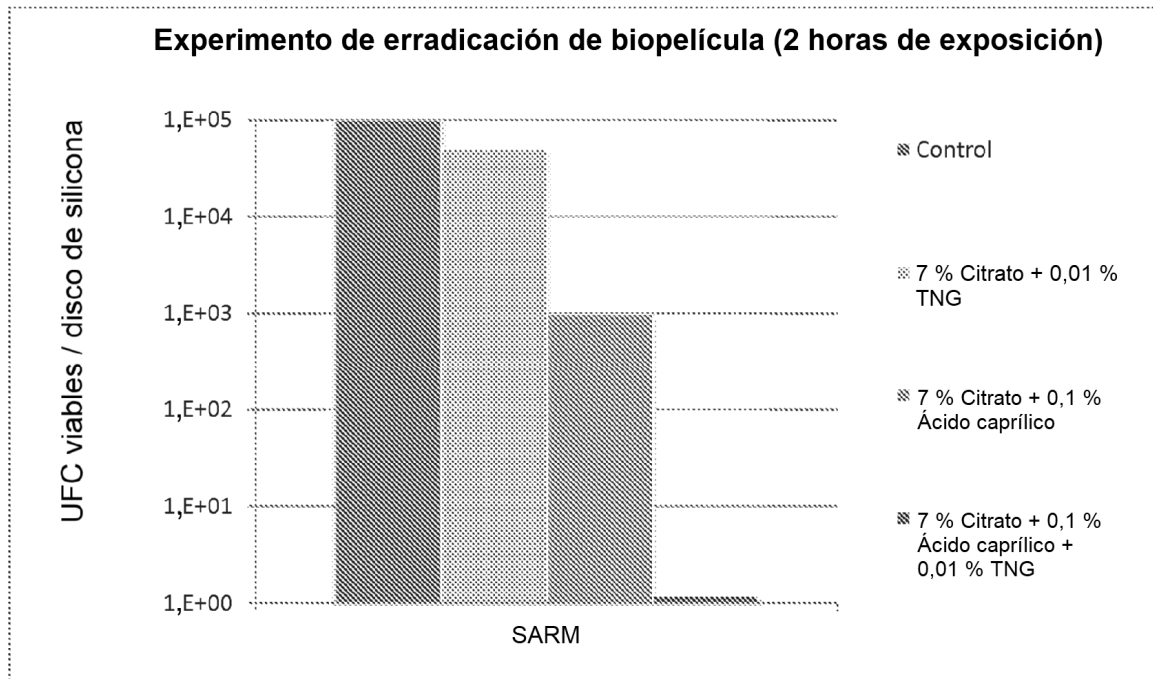


FIG. 16

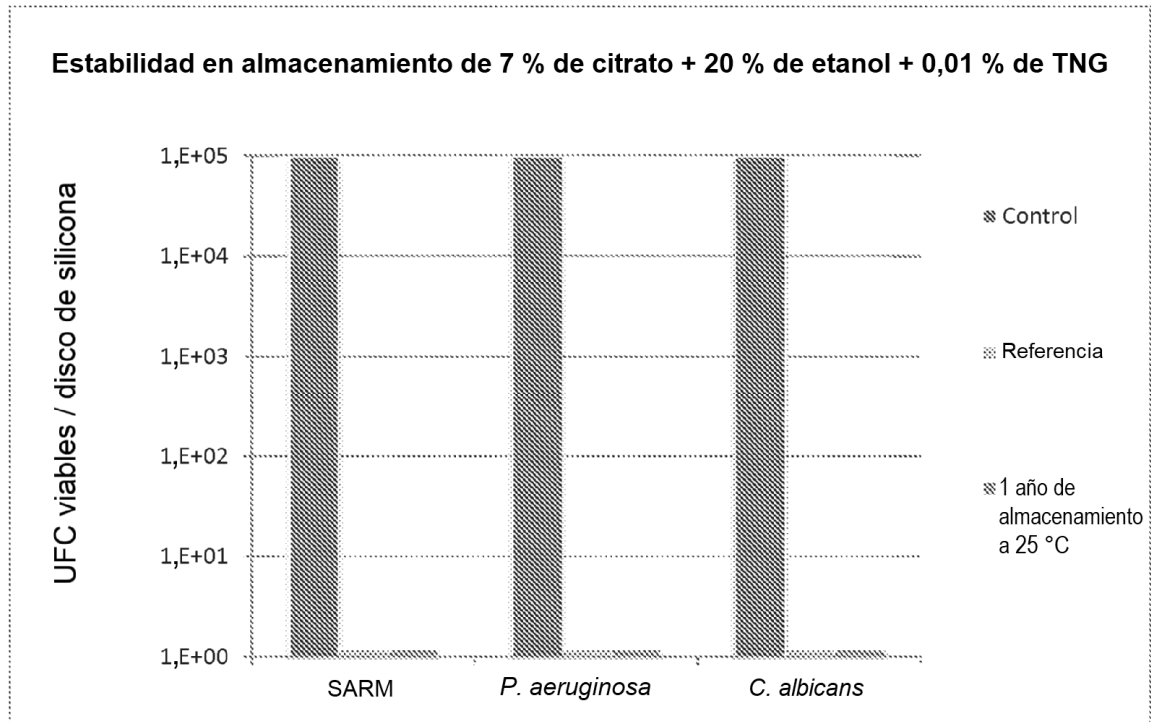


FIG. 17