

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 223**

51 Int. Cl.:

A01N 37/36 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/12 (2006.01)
A61L 15/46 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61K 31/7036 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01)
A01N 47/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014 PCT/US2014/034320**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14172435**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014 E 14785399 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2986119**

54 Título: **Composiciones antimicrobianas de antibióticos aminoglicosídicos y quelantes de iones de zinc**

30 Prioridad:
16.04.2013 US 201361812701 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2020

73 Titular/es:
**UNIVERSITY OF CINCINNATI (100.0%)
51 Goodman Drive, Suite 240
Cincinnati, OH 45221-0829 , US**

72 Inventor/es:
**HERR, ANDREW, B. y
YOUNG, GARY**

74 Agente/Representante:
SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 749 223 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 de antibióticos aminoglicosídicos y quelantes de iones de zinc

Campo técnico

- 5 El objeto de la divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas eficaces contra colonias bacterianas resistentes, en particular contra *Staphylococcus* y en la inhibición de la formación de biopelículas que comprenden células bacterianas de *Staphylococcus*. La divulgación se refiere además a formulaciones de composiciones tópicas, usos médicos para las composiciones, métodos de inhibición de la formación de biopelículas usando las composiciones, y a artículos de fabricación que incluyen apósitos para heridas, vendajes y prendas especiales que tienen las composiciones antibacterianas de la invención infundidas en la tela.
- 10 Antecedentes
- 15 La incidencia de infecciones de heridas, especialmente asociadas con *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, es una preocupación importante para los proveedores de atención médica. *S. aureus* es uno de los patógenos más comunes que se encuentran en las heridas crónicas, y *S. epidermidis* es el patógeno más común asociado con infecciones relacionadas con dispositivos. Además, *S. pseudintermedius* es un patógeno común asociado con infecciones veterinarias recurrentes. Se sabe que *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pseudintermedius* forman fácilmente biopelículas, que son comunidades bacterianas adherentes a la superficie que hacen que las bacterias sean resistentes a los antibióticos comunes o a las respuestas inmunes del huésped, y aumentan en gran medida los costes del tratamiento de atención médica.
- 20 Un factor principal en la patogénesis de las heridas crónicas es la infección bacteriana. Las bacterias que colonizan las heridas pueden provocar una respuesta inflamatoria persistente que es perjudicial para el proceso de curación. Las células como los neutrófilos y los macrófagos regulan al alza las citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α , que a su vez conducen a niveles elevados de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), disminución de la expresión del factor de crecimiento y la aberración final del proceso de curación. Una de las especies más comunes de bacterias cultivadas a partir de heridas crónicas es *Staphylococcus aureus*, que junto con ciertas otras especies bacterianas, tiene la capacidad de encerrarse en una matriz de polisacárido extracelular (EPS) llamada glucocalix. Una vez que una población adopta este fenotipo sésil, es sustancialmente más resistente a los mecanismos de defensa del huésped, así como a los antimicrobianos exógenos. La superación de las características protectoras de estas "biopelículas" ha demostrado ser muy difícil y, por lo tanto, son muy deseables nuevos métodos efectivos de prevención y tratamiento.
- 25 El trabajo previo de los investigadores actuales indicó que se requiere zinc para la formación inicial de biopelículas estafilocócicas (véase, por ejemplo, Conrady D et al. "A zinc-dependent adhesion module is responsible for intercellular adhesion in staphylococcal biopelículas" PNAS 2008, 105(49):1945661, y U.S. Application Serial No. 12/994921). Se demostró que el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), un quelante de zinc de ejemplo podría inhibir la formación de biopelículas por *S. aureus* y *S. epidermidis*. Se describió una caracterización biofísica de una región de repetición B que contiene un dominio G5 de Aap, revelando que se trata de un módulo de adhesión dependiente de zinc (Zn^{2+}) ("módulo de adhesión de zinc") responsable de la interacción intercelular en biopelículas estafilocócicas. Este módulo de adhesión de zinc se ha identificado en una variedad de bacterias, incluidas las bacterias grampositivas en general, y proporciona un objetivo específico para la quelación de zinc y la inhibición de biopelículas en biopelículas compuestas de bacterias que tienen un dominio G5. Se demostró que la quelación de zinc inhibe la formación de ambas biopelículas de *S. aureus* resistentes a metilina y *S. epidermidis*, y se demostró que la suplementación con zinc adicional en el rango fisiológico revierte el efecto. La observación del efecto reversible proporciona un medio para identificar las bacterias que poseen un módulo de adhesión de zinc, que puede formar un contacto adhesivo intercelular denominado "cremallera de zinc", y subraya la criticidad del zinc en la adhesión intercelular, proporcionando un objetivo específico para la quelación y la inhibición de la biopelícula.
- 30 Adicionalmente, se encontró que la adición de un fragmento Aap soluble que contiene un único módulo de adhesión de zinc intacto inhibe la formación de biopelículas de una manera dependiente de la dosis, lo que indica que la región de repetición B que contiene el dominio G5 es de hecho un elemento requerido para la adhesión intercelular en biopelículas estafilocócicas.
- 35 Las composiciones que comprenden tanto un antibiótico como un quelante de iones metálicos son conocidas en la técnica. La Solicitud de los Estados Unidos No. 13/095262 a Raad et al., junto con un portafolio de la técnica relacionada del mismo laboratorio, describe composiciones que comprenden antibióticos particulares con EDTA, un conocido quelante de hierro/calcio. Raad restringe ejemplos y realizaciones de trabajo a composiciones que comprenden EDTA, y enseña la necesidad de alcohol en las composiciones; enseñar expresamente que las combinaciones de antibióticos y EDTA sin alcohol requieren tiempos de exposición inaceptablemente largos para la eficacia deseada. Raad no describe expresamente las composiciones que comprenden quelantes de zinc y no aprecia los fundamentos mecanicistas de las sinergias que se pueden lograr específicamente en combinaciones con los quelantes de zinc.
- 40
- 45
- 50
- 55

También se conoce el uso de quelantes de zinc en combinación con composiciones antibióticas. La Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. de serie 12/391357 de Zhang et al. describe composiciones de antibióticos aminoglucósidos y quelantes de iones en general; sin embargo, Zhang enseña la adición del quelante de iones en cantidades extremadamente pequeñas, lo que refleja el papel mecanicista contemplado del quelante según Zhang.

5 En particular, Zhang enseña que una combinación de antibióticos β -lactámicos con antibióticos aminoglucósidos proporciona una sinergia antibacteriana, pero que si se disuelve en la misma solución, o bien una sal se precipita debido a una reacción ácido-base, o el grupo amino del antibiótico aminoglucósido reacciona con el grupo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos, reduciendo drásticamente la eficacia de estos tipos de antibióticos y presentando peligros potenciales para los pacientes si los antibióticos se administran como soluciones IV. La adición
10 de un quelante según Zhang evita la formación de estas partículas de agregado residual. Zhang no apreció ni reveló ninguna sinergia con respecto a la eficacia antibiótica de un antibiótico tras la adición de un quelante, o con respecto a la eficacia antibiótica de un quelante tras la adición de un antibiótico, y no describió composiciones antibióticas que comprenden cantidades de quelante suficientes para proporcionar esta sinergia inesperada.

15 Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones antimicrobianas eficaces contra biopelículas en entornos hospitalarios e industriales, y de composiciones formuladas para proporcionar una mayor eficacia antibiótica en el tratamiento de heridas.

Resumen

Según lo anterior, la presente divulgación proporciona composiciones de un antibiótico y un quelante de zinc que exhiben una eficacia inesperada contra las biopelículas y la formación de biopelículas, y una eficacia antibiótica
20 mejorada en el cuidado de heridas. En particular, las composiciones de antimicrobianos y DTPA exhiben una sorprendente eficacia antibiótica sinérgica en la inhibición de la formación de biopelículas y en la dispersión de biopelículas que comprenden células de bacterias grampositivas, y en particular células de *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus* y *S. epidermidis*. Al introducir DTPA en el entorno de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pseudintermedius*, el quelante se une al zinc, secuestrándolo de la bacteria e inhibiendo así la formación de
25 biopelículas. *S. aureus*, *S. epidermidis* o *S. pseudintermedius* conservados en el estado planctónico son luego más fácilmente dirigidos y erradicados por los antimicrobianos tópicos tradicionales. En estudios que usaron un modelo de herida porcina, los presentes investigadores encontraron que las composiciones que comprenden tanto DTPA como gentamicina formuladas para el contacto tópico sostenido con una herida exhibieron una eficacia inesperada
30 contra la colonización bacteriana, con una eficacia inesperada que ocurre a concentraciones muy específicas de DTPA.

Una realización de la divulgación está dirigida a composiciones farmacéuticas formuladas para aplicación tópica a un sujeto, que comprenden 0.1% de gentamicina en peso, 5 a 15 mg/ml de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y una emulsión de aceite en agua.

35 Las realizaciones proporcionan composiciones especialmente formuladas para aplicación tópica sobre la piel. Tales composiciones que comprenden gentamicina, DTPA y una base de emulsión de aceite en agua están diseñadas para mantener una herida húmeda para una mejor cicatrización. También se proporcionan métodos para formular composiciones eficaces para aplicación tópica. También se describen usos médicos de las composiciones farmacéuticas para tratar heridas, que incluyen realizaciones específicas dirigidas a la aplicación de formulaciones tópicas a heridas.

40 Otra realización se refiere a métodos de inhibición de la formación de biopelículas en superficies duras, por ejemplo, en dispositivos médicos, superficies de habitaciones de hospital, barandillas de cama, suelos y similares. Las realizaciones de consumo doméstico formuladas como formulaciones de rociado o de limpieza también se contemplan para uso general del consumidor, por ejemplo, para aplicación a juguetes, superficies de guardería, superficies de baño y otras superficies domésticas comúnmente contaminadas. Las aplicaciones industriales, por
45 ejemplo, tuberías de drenaje, alcantarillado y tratamiento de agua, recipientes de contención o transporte y superficies también se pueden tratar según ciertas realizaciones, en particular para inhibir la formación de biopelículas que comprenden una o más de las células de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pseudintermedius*.

Según otras realizaciones, los textiles u otros materiales tejidos pueden infundirse o impregnarse con las composiciones de la invención para proporcionar una aplicación inmediata a una herida en condiciones de
50 tratamiento ordinarias o extremas. En una realización particular, la ropa especialmente diseñada para el personal militar o de las fuerzas se puede fabricar a partir de telas que tienen al menos una parte impregnada con realizaciones de las composiciones de la invención para la aplicación *in situ* a heridas sufridas en el campo. Otras realizaciones incluyen apósitos para heridas y vendajes impregnados con combinaciones activas según la divulgación.

55 También se describen métodos para aumentar la eficacia antibacteriana de la gentamicina, generalmente donde la gentamicina ha establecido su eficacia o donde la gentamicina tiene resistencia conocida. En el caso de las biopelículas de *Staphylococcus* con resistencia conocida a la gentamicina, las composiciones según las realizaciones de la invención proporcionan una eficacia antibacteriana mejorada sorprendente.

Estas y otras características y aspectos de la divulgación se elaborarán y aclararán adicionalmente con referencia a las figuras y descripción detallada tal como se establece en este documento.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: Representación pictórica del diseño experimental del modelo de herida porcina; se realizaron 44 heridas de espesor parcial profundo en las áreas peravertebral y torácica de cada uno de los dos cerdos y se asignaron al azar cuatro heridas a cada uno de los 11 grupos de tratamiento.

Figura 2: Gráfico de barras que muestra los recuentos bacterianos de *Staphylococcus aureus* en plancton y biopelícula (en unidades formadoras de colonias log por mililitro) en función de la concentración de DTPA sola, en comparación con tres controles de tratamiento: vehículo, 0.1% de gentamicina y sin tratamiento.

10 Figura 3: Gráfico de barras que muestra los recuentos bacterianos de *Staphylococcus aureus* en plancton y biopelícula (en unidades formadoras de colonias log por mililitro) en función de la concentración de DTPA a 0.1% de gentamicina constante.

Descripción detallada

15 La presente invención proporciona composiciones eficaces para inhibir la colonización bacteriana y la formación de biopelículas, y que tienen una eficacia antibiótica mejorada. También se describen formulaciones apropiadas para aplicaciones de tratamiento cutáneo tópico y de superficie dura, y formulaciones apropiadas para aplicaciones de cuidado personal, así como artículos impregnados o recubiertos con las composiciones de la invención y métodos que usan las composiciones y artículos. Las realizaciones de la invención están respaldadas por el sorprendente descubrimiento de que agregar ciertas concentraciones específicas de agentes quelantes de zinc a una composición antimicrobiana proporciona un efecto sinérgico con respecto a la inhibición de la colonización bacteriana y la formación de biopelículas y la reducción de la carga bacteriana. Las siguientes definiciones se aplican para interpretar el alcance de los términos establecidos en este documento. Si no se proporciona expresamente una definición, el alcance de un término se interpreta según su significado habitual en la técnica relevante.

20 El término "biopelícula" se refiere a acumulaciones microbianas encerradas en una matriz en superficies biológicas o no biológicas. La formación de biopelículas representa un modo de crecimiento protegido que permite que las células sobrevivan en ambientes hostiles.

25 El término "formación de biopelículas" pretende incluir la formación, el crecimiento y la modificación de las colonias bacterianas contenidas en las estructuras de biopelículas, así como la síntesis y mantenimiento de una matriz de polisacáridos de las estructuras de biopelículas. También dentro del alcance de este término está la formación de biopelículas basadas en proteínas que no secretan polisacáridos en la matriz pero que comprenden proteínas similares a Aap que permiten a las bacterias formar una arquitectura de biopelícula.

30 El término "módulo de adhesión de zinc" se refiere a un pliegue de polipéptidos que se encuentra en las proteínas bacterianas de la superficie celular que incluyen, pero no se limitan a, la proteína asociada a la acumulación (Aap) de *Staphylococcus epidermidis*. El módulo de adhesión de zinc comprende una secuencia de polipéptidos que incluye al menos un dominio G5, y opcionalmente una secuencia de aminoácidos adicional.

35 Los términos "quelante" o "quelante de iones metálicos" se refieren a cualquier sustancia que pueda eliminar un ion metálico de un sistema de solución formando un nuevo ion complejo que tiene propiedades químicas diferentes a las del ion metálico original. El término pretende además abarcar sustancias que son capaces de quelar iones metálicos, específicamente metales divalentes.

40 El término "iones metálicos" pretende incluir cualquier ion metálico que esté biodisponible, esto es, cualquier ion metálico implicado en una reacción o vía bioquímica, o cualquier ion metálico que esté disponible en el fluido, tejido o hueso de un sujeto.

El término "quelante de zinc" se refiere a cualquier sustancia que sea capaz de quelar un ion de zinc (Zn^{2+}) y así agotar el zinc de los ambientes acuosos.

45 El término "bacterias gram positivas" se refiere a bacterias que tienen paredes celulares con altas cantidades de peptidoglucano. Las bacterias Gram positivas se identifican por su tendencia a retener cristal violeta y teñir de azul oscuro o violeta en el protocolo de tinción de Gram.

50 El término "bacterias gram negativas" se refiere a bacterias que tienen capas de peptidoglucano más delgadas que no retienen la mancha de cristal violeta en el protocolo de tinción de Gram y en su lugar retienen la contratinción, por lo general safranina. Las bacterias Gram negativas se tiñen de rojo o rosa en el protocolo de tinción de Gram.

El término "mamífero" se refiere a organismos dentro de esa clase taxonómica que pueden sufrir estados asociados a biopelículas. El término incluye humanos, por ejemplo, así como animales y ganado salvaje y domesticado, incluidos, pero no limitando a, caballos, chimpancés, macacos, cerdos, ovejas, cabras, hámsteres, cobayas, monos,

osos, perros, gatos, ratones, conejos, vacas, ardillas y ratas. El término "composición farmacéutica" incluye preparaciones adecuadamente seguras para la administración a mamíferos, por ejemplo, humanos.

5 El término "formulación tópica" se refiere a composiciones farmacéuticas apropiadas para administración dérmica a un mamífero. Las composiciones farmacéuticas tópicas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, geles, cremas, lociones, ungüentos, tinturas, aerosoles y sólidos. En una situación prevista, se aplica una composición farmacéutica tópica de la presente invención en la superficie externa de la piel o en la proximidad de cortes, abrasiones, lesiones por quemaduras de césped, laceraciones, quemaduras o heridas punzantes para tratar, prevenir o inhibir la formación de biopelículas bacterianas.

10 El término "agente antimicrobiano" se refiere a cualquier sustancia que mata o previene el crecimiento de bacterias u otros microbios.

El término "antibiótico" se refiere a una sustancia que es antagónica al crecimiento de microorganismos. Los antibióticos apropiados pueden ser de origen natural, modificados químicamente o producidos sintéticamente.

15 El término "enjuague quirúrgico" se refiere a una solución usada durante la cirugía para irrigar el sitio de un dispositivo médico implantado, con la intención de prevenir la formación inicial de biopelículas en la vecindad del dispositivo médico.

El término "enjuague dental" se refiere a una solución que contiene uno o más quelantes de zinc usados como enjuague bucal o enjuague para prevenir el establecimiento de biopelículas orales que conducen a la caries dental.

20 El término "composición de limpieza personal" se refiere a una composición que se usa para la higiene personal. Las composiciones de limpieza personal incluyen, pero no se limitan a, geles, cremas, suspensiones, coloides, jabones, jabones corporales, champús y similares. En una disposición, las composiciones de limpieza personal de la presente invención inhiben infecciones relacionadas con biopelículas que incluyen, pero no se limitan a, infección por *S. aureus* resistente a meticilina (CA-MRSA) adquirida en la comunidad.

25 El término "superficie dura" se refiere a superficies duras que incluyen, pero no se limitan a, instrumentos quirúrgicos y dispositivos médicos, tanques de almacenamiento, tuberías, bandejas, contenedores, paredes, suelos, encimeras, suelos de vestuarios, bancos, armarios, duchas, baños, inodoros, unidades de filtración de agua, superficies domésticas, artículos de guardería, por ejemplo, componentes del extractor de leche y superficies de cunas, juguetes y otros artículos domésticos y similares.

30 Los términos "inhibir", "inhibiendo" e "inhibido" tal como se usan en este documento con respecto a la formación de biopelículas, se refieren al efecto de un quelante de zinc en la interrupción, dispersión o eliminación de una biopelícula, así como a la prevención de la formación de una biopelícula.

El término "cantidad eficaz", como se usa en este documento con respecto a la inhibición de la formación de biopelículas, se refiere a una cantidad de un quelante de zinc en combinación con un antibiótico suficiente para lograr el resultado inhibitorio deseado.

35 El término "cantidad segura y eficaz" se refiere a una cantidad de quelante de zinc en combinación con un antibiótico que es eficaz para inhibir la formación de biopelículas sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica, proporcional a una proporción razonable de riesgo/beneficio cuando se usa de la manera de la invención.

40 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de un ingrediente para tratar trastornos, en una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de las composiciones de la presente invención será decidido por el médico tratante dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis terapéuticamente efectivo específico para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del quelante específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, la ruta de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidencia con el compuesto específico empleado; y como factores bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, está bien dentro de la habilidad de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado.

50 El acrónimo CFU significa unidad formadora de colonias, que es una estimación de los números de bacterias u hongos viables. En contraste, un conteo microscópico incluye todas las células, muertas y vivas. CFU es una estimación de células viables. La aparición de una colonia visible requiere un crecimiento significativo de las células iniciales enchapadas, y generalmente no es posible al momento de contar las colonias para determinar si la colonia surgió de una célula o 1,000 células. Por lo tanto, los resultados se dan como CFU/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro) para líquidos, y CFU/g (unidades formadoras de colonias por gramo) para que los sólidos reflejen esta incertidumbre (en lugar de células/mL o células/g como en un recuento directo).

Las realizaciones de la invención proporcionan nuevas composiciones farmacéuticas que tienen una eficacia mejorada en la inhibición de la formación de biopelículas y una eficacia antibacteriana mejorada en exceso de lo que uno podría predecir basándose en la eficacia inhibitoria y antibacteriana de los componentes individualmente. Las composiciones comprenden al menos un antibiótico aminoglicosídico, esto es, gentamicina y al menos un agente quelante de iones de zinc, esto es, DTPA, en la que una concentración de agente quelante de iones de zinc está entre 5 y 15 mg/ml. En algunas realizaciones, el alcohol se excluye expresamente como un componente de la composición.

Otros antibióticos aminoglicosídicos incluyen etimicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, dibekacina, kanamicina, arbekacina, sagamicina, isopamicina, sisomicina, neomicina, paromocina, estreptomocina, espectinomocina, micronomicina, astromicina, ribostamicina, sales o hidratos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores, o combinaciones de los mismos. Antibióticos aminoglicosídicos particulares son gentamicina o kanamicina, y según las realizaciones de la invención, el antibiótico aminoglicosídico es gentamicina. La concentración de antibiótico puede variar desde 0.01 % a 5%, desde 0.01% a 1%, desde 0.01% a 0.5%, desde 0.05% a 0.5%, desde 0.05% a 0.1%, desde 0.06% a 0.1%, desde 0.07% a 0.1%, desde 0.08% a 0.1%, desde 0.09% a 0.1%, y similares. Según una realización de la invención, la concentración de gentamicina es del 0.1% en peso.

Los agentes quelantes de zinc incluyen ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), N, N, N'-tetrakis(2-piridinilmetil)-1,2-etanodiamina (TPEN), 1,10-fenantrolina, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido etilendiamina-N, N'-diacético (EDDA) y sales o hidratos de los mismos. Según las realizaciones de la invención, el agente quelante de iones zinc es DTPA. Se prevé cualquier quelante de iones que quela zinc en un grado sustancialmente similar en un entorno acuoso como DTPA. El quelante de zinc se puede agregar a las composiciones en forma de sal o hidrato, y en realizaciones específicas se puede agregar como Na₅DTPA o Na₃CaDTPA, mientras que en realizaciones muy específicas se puede agregar DTPA como Na₃CaDTPA. En algunas realizaciones, el DTPA puede estar presente en la composición en forma ácida y en esas realizaciones puede ser deseable agregar un agente solubilizante tal como ácido clorhídrico (HCl). Otros agentes solubilizantes son bien conocidos en la técnica.

Los investigadores actuales descubrieron sorprendentemente que la cantidad de quelante de zinc presente en la composición influye en la eficacia antibacteriana resultante de una manera impredecible. Como se ilustra en la figura 3, a concentraciones muy bajas de agente quelante de zinc, la eficacia antibacteriana de la gentamicina se reduce de hecho. Sin embargo, a concentraciones crecientes, la eficacia antibacteriana se mejora con respecto a la gentamicina sola, y a concentraciones aún más altas se mejora en exceso de un efecto aditivo que demuestra una sinergia positiva verdadera a concentraciones particulares. En realizaciones específicas, la concentración de agente quelante de zinc está entre 5 mg/ml y 15 mg/ml. Con formulaciones de gentamicina al 1% en peso, la eficacia parece maximizada (sin carga bacteriana medible) a aproximadamente 15 mg/ml de DTPA; sin embargo, se prevé que la concentración de DTPA pueda ajustarse más bajo en otras condiciones, a otras concentraciones de antibióticos y en combinación con otros antibióticos; por ejemplo, la concentración de quelante de zinc puede ser tan alta como 50 mg/ml.

La concentración de quelante puede variar desde 0.5 mg/ml a 50 mg/ml, o desde 1 mg/ml a 45 mg/ml, o desde 1.5 mg/ml a 30 mg/ml. Se prevé que la concentración de quelante puede variar desde 2.5 mg/ml a 15 mg/ml, desde 5 mg/ml a 15 mg/ml, desde 7.5 mg/ml a 15 mg/ml, desde 10 mg/ml a 15 mg/ml, desde 12.5 mg/ml a 15 mg/ml, y similares. En una realización muy específica, el quelante es DTPA y la concentración de la composición es 30 mM, equivalente a 15 mg/ml.

El crecimiento bacteriano y la colonización son inhibidos por las composiciones según la invención. Las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Acidothermus cellulyticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Alkaliphilus oremlandii*, *Arthrobacter aurescens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Carboxydothemus hydrogenoformans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium leptum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium thermocellum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Desulfitobacterium hafniense*, *Desulfotomaculum reducens*, *Eubacterium ventriosum*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Fingoldia magna*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Janibacter sp.*, *Kineococcus radiotolerans*, *Lactobacillus fermentum*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Moorella thermoacetica*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Nocardioides sp.*, *Nocardia farcinica*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharopolyspora erythraea*, especies de *Staphylococcus coagulasa* negativas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina, (MRSE), *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*,

5 *Thermoanaerobacter tengcongensis*, y combinaciones de los mismos. Según realizaciones más específicas, las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Corynebacterium urealyticum*, *Fingoldia magna*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE), *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus suis*, y combinaciones de los mismos, y en realizaciones aún más específicas, las bacterias se seleccionan del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE) y combinaciones de los mismos.

10 Según algunas realizaciones de la invención, la composición puede proporcionarse como una composición adherente (una composición que comprende componentes destinados a aumentar el tiempo de contacto de los activos con una superficie diana), una composición de enjuague, un baño o formulada como un recubrimiento. En realizaciones específicas, la composición está formulada para inhibir la formación de biopelícula en una superficie. Ejemplos no limitantes de superficies duras incluyen instrumentos quirúrgicos y dispositivos médicos, tanques de almacenamiento, tuberías, bandejas, contenedores, paredes, suelos, encimeras, suelos de vestuarios, bancos, armarios, duchas, baños, inodoros, unidades de filtración de agua, superficies domésticas, artículos de guardería, por ejemplo, componentes del extractor de leche y superficies de cunas, juguetes y otros artículos domésticos. Otras superficies incluyen superficies textiles, que incluyen, entre otras, ropa, zapatillas/zapatos, pañuelos, ropa de utilidad para el personal médico y otras personas expuestas a riesgos elevados de contaminación bacteriana, pañales y similares. Una superficie también puede ser una superficie corporal, tal como piel u otras estructuras corporales que contienen queratina, tal como uñas, cabello, pelaje y pezuñas. En realizaciones específicas, la superficie se pone en contacto con una composición que comprende el antibiótico aminoglicosídico gentamicina y el agente quelante de iones zinc DTPA, en la que una concentración de agente quelante de iones zinc está entre 5 y 15 mg/ml. Estos métodos son particularmente efectivos contra las biopelículas que comprenden una o más de las células bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pseudintermedius*. En realizaciones muy específicas, la biopelícula comprende células de *S. aureus*.

25 El contacto se puede lograr mediante pulverización, depósito o limpieza, y en algunos aspectos se proporciona una toallita lista para usar impregnada con composiciones según la invención. En otros aspectos, se contemplan botellas de pulverización que comprenden composiciones de pulverización. Otros sistemas apropiados de contención/distribución y distribución son bien conocidos en la técnica.

30 En una realización, un instrumento quirúrgico o dispositivo médico se baña o recubre en una composición que comprende un antibiótico y una cantidad eficaz de al menos un quelante de zinc. Por ejemplo, el dispositivo se puede sumergir en la composición y opcionalmente dejarse secar. En otra realización, se puede pulverizar un dispositivo con una composición que comprende un antibiótico y una cantidad eficaz de al menos un quelante de zinc y, opcionalmente, se deja que se seque. En un entorno quirúrgico, el presente método podría usarse, por ejemplo, para bañar un dispositivo médico antes o después de la implantación antes del cierre. Alternativamente, un dispositivo médico podría recubrirse con una composición que comprende un antibiótico y una cantidad eficaz de al menos un quelante de zinc antes de la implantación.

40 Los ejemplos no limitantes de dispositivos médicos implantables incluyen marcapasos, válvulas cardíacas, articulaciones de reemplazo, catéteres, puertos de acceso a catéteres, tubos de diálisis, bandas gástricas, derivaciones, placas de tornillo, reemplazos de discos espinales artificiales, desfibriladores implantables internos, dispositivos de terapia de resincronización cardíaca, monitores cardíacos implantables, dispositivos de reparación del anillo de la válvula mitral, dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI), corazones artificiales, bombas de infusión implantables, bombas de insulina implantables, stents, neuroestimuladores implantables, pernos/varillas/grapas quirúrgicas, dispositivos de reemplazo de articulaciones de plantillas, implantes maxilofaciales e implantes dentales.

50 La composición que comprende un antibiótico y al menos un quelante de zinc puede estar en cualquier forma que permita la aplicación de la solución al dispositivo particular. En una realización específica, la composición se formula como un gel. En otra realización específica, la composición se formula como una espuma, y en otras realizaciones específicas, la composición se puede formular como un recubrimiento de polímero. Opcionalmente, la composición puede formularse de manera que se libere gradualmente una cantidad eficaz de antibiótico y quelante de zinc, lo que proporciona la inhibición de la formación de biopelículas durante un periodo de tiempo.

55 Las composiciones según la invención también se pueden proporcionar como un aspecto de formulaciones para el cuidado personal, por ejemplo, champús, esmalte de uñas u otros productos para el cuidado de las uñas, gel de baño, jabón, exfoliante quirúrgico, enjuagues/acondicionadores, lociones, ungüentos, productos para el cuidado dental tales como enjuagues bucales o pasta de dientes, o cremas dentales, bases de maquillaje, o contenidos en productos cosméticos asociados con un riesgo conocido de contaminación bacteriana, tal como rímel/delineador de ojos y similares. La clave para la eficacia de cualquiera de estas formulaciones es la concentración de agente quelante de zinc en relación con el antibiótico. Según la invención, el agente quelante de zinc es DTPA, el agente antimicrobiano es gentamicina, y la concentración de DTPA es de 5 a 15 mg/ml y la concentración de gentamicina es de 0.1% en peso.

Según la invención, la composición farmacéutica se formula en una base de emulsión de aceite en agua. Las composiciones pueden formularse como ungüentos, cremas o lociones. Los ungüentos y cremas pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes apropiados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa, aceitosa o de emulsión y también pueden contener uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes o agentes colorantes. En una realización muy específica, la composición es una composición farmacéutica tópica que comprende Na_3CaDTPA 30 mM (~ 15 mg/ml), gentamicina al 0.1% y una base de emulsión de aceite en agua.

Una formulación ilustrativa se expone en el ejemplo 3, a continuación. En un ejemplo específico descrito generalmente, el método comprende proporcionar un recipiente base de una base de emulsión de aceite en agua apropiada mantenida a aproximadamente 60 °C; preparar una solución alícuota en un primer recipiente agregando una cantidad de DTPA a una cantidad de agua estéril y mezclando hasta que sea uniforme; transferir un volumen especificado de la parte alícuota a un segundo recipiente y agregar sulfato de gentamicina mientras se mezcla hasta que el sulfato de gentamicina se disuelva sustancialmente por completo; calentar la base en el recipiente base a aproximadamente 90 °C mientras se agita; filtrar y transferir todo el contenido del segundo recipiente al recipiente base; mezclando hasta que sea uniforme; enfriar a aproximadamente 55 °C; transferir a un recipiente de esterilización y esterilizar.

Las composiciones formuladas para aplicación tópica son particularmente útiles para el tratamiento de heridas e incisiones quirúrgicas. El "tratamiento" se entiende que incluye la inhibición del crecimiento de bacterias, la inhibición de la formación de colonias bacterianas y biopelículas, así como la eficacia antibacteriana. Cabe señalar que un agente quelante de zinc solo no se considera bactericida; sin embargo, actúa para prevenir la colonización de células bacterianas y la formación de biopelículas. En combinación con un antibiótico, por ejemplo, gentamicina, tanto la colonización bacteriana como el recuento bacteriano parecen estar reducidos, lo que indica una inhibición mejorada de la colonización/formación de biopelículas, así como una mayor actividad bactericida de la composición en su conjunto. También se prevé que las formulaciones tópicas sean útiles para prevenir infecciones en heridas e incisiones recientes.

Otras realizaciones proporcionan artículos de fabricación tales como apósitos para heridas y vendajes que comprenden al menos una porción impregnada o recubierta con una composición farmacéutica que comprende 0.1% de gentamicina en peso y 5 a 15 mg/ml de DTPA. En un aspecto, el artículo es una prenda de vestir que lleva un sujeto implicado en una actividad de alto riesgo mortal, tal como actividades militares o policiales. En el caso de una herida, la ropa impregnada con la composición se puede presionar dentro de la herida abierta para inhibir o prevenir la infección.

En algunas realizaciones, se pueden agregar entre 5 y 15 mg/ml del agente quelante de zinc DTPA a una composición de antibiótico de gentamicina para aumentar la actividad antibiótica de la gentamicina.

Los siguientes ejemplos se exponen para ilustrar realizaciones y aspectos específicos de la invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance completo de la invención tal como se define en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la eficacia antibacteriana inesperada de las composiciones según la invención. Los presentes investigadores descubrieron una sinergia positiva inesperada en los efectos de una nueva formulación quelante de antibiótico-zinc, y en particular formulaciones de gentamicina-DTPA en heridas infectadas con *S. aureus*. En resumen, se crearon cuarenta y cuatro heridas profundas de espesor parcial en el área paravertebral en dos cerdos. Se asignaron al azar cuatro heridas cada una a once grupos de tratamiento y se inoculó con *S. aureus* ATCC 6538. Las heridas se trataron con aproximadamente 200 mg de cada tratamiento. En el día 2, las heridas se evaluaron usando una técnica de enjuague y fregado para recuperar el recuento de bacterias asociadas con biopelícula y planctónicas, respectivamente. Todos los grupos de tratamiento a diferentes concentraciones de DTPA solo redujeron los recuentos bacterianos (plancton y biopelícula) en comparación con las heridas de control no tratadas. La concentración más alta de DTPA (30000 μM) sola mostró la mayor reducción de los recuentos de bacterias planctónicas y de biopelícula en comparación con otras concentraciones de DTPA. El DTPA a concentraciones de 5000, 10000 y 30000 μM cuando se combina con gentamicina mostró una reducción del 99.99% del recuento bacteriano planctónico de *S. aureus* en comparación con las heridas no tratadas. La concentración más alta de DTPA (30000 μM) combinada con gentamicina también mostró el mayor porcentaje de reducción (99.99%) en los recuentos de bacterias de la biopelícula de *S. aureus* en comparación con las heridas no tratadas. Este ejemplo demuestra que DTPA, a concentraciones de 2500 a 30000 μM , en combinación con gentamicina mostró una reducción en *S. aureus* asociado a biopelícula y del plancton en comparación con la gentamicina sola, lo que indica un fuerte efecto sinérgico de este compuesto con este antibiótico a concentraciones específicas de DTPA. Esto es particularmente sorprendente e impredecible a la vista de los datos que indican una sinergia negativa a concentraciones muy bajas de DTPA.

A. Materiales y métodos.

Los cerdos (2 animales) se usaron como animales experimentales debido a las similitudes morfológicas, fisiológicas y bioquímicas entre la piel de cerdo y la piel humana.

Herida de animales:

- 5
- Se realizaron 44 heridas de espesor parcial profundo de 10 mm x 7 mm x 0.5 mm en las áreas peravertebral y torácica de cada animal
 - Se asignaron al azar 4 heridas a cada uno de los 11 grupos de tratamiento.

Inoculación:

- 10
- Se inocularon 25 μ l de inóculo de 10^6 CFU/ml en cada herida y se frotaron ligeramente con una espátula de teflón estéril.

Diseño experimental:

Cerdo 1: Grupos de tratamiento

- A. DTPA 30 μ M
- B. DTPA 100 μ M
- 15 C. DTPA 300 μ M
- D. DTPA 1000 μ M
- E. DTPA 30 μ M + gentamicina al 0.1%
- F. DTPA 100 μ M + gentamicina al 0.1%
- G. DTPA 300 μ M + gentamicina al 0.1%
- 20 H. DTPA 1000 μ M + gentamicina al 0.1%
- I. Vehículo
- J. Gentamicina al 0.1%
- K. Sin tratamiento

Cerdo 2: Grupos de tratamiento

- 25 A. DTPA 2500 μ M
- B. DTPA 5000 μ M
- C. DTPA 10000 μ M
- D. DTPA 30000 μ M
- E. DTPA 2500 μ M + gentamicina al 0.1%
- 30 F. DTPA 5000 μ M + gentamicina al 0.1%
- G. DTPA 10000 μ M + gentamicina al 0.1%
- H. DTPA 30000 μ M + gentamicina al 0.1%
- I. Vehículo
- J. gentamicina al 0.1%
- 35 K. Sin tratamiento

La figura 1 ilustra el diseño experimental y representa un diagrama esquemático de grupos de tratamiento y heridas de animales.

Aplicación de tratamiento:

- Dentro de los 20 minutos posteriores a la inoculación, cada herida se trató con el tratamiento apropiado. Cada herida se trató con \cong 200mg del tratamiento apropiado (días 0 y 1).

- Todas las heridas estaban cubiertas con apósitos de película de poliuretano.

Recuperación de herida:

5 • Se colocó un cilindro de acero quirúrgico estéril (22 mm de diámetro interno) sobre el área de la herida y se pipeteó 1 ml de solución neutralizadora para todo uso.

- El sitio se enjuagó suavemente pipeteando hacia adentro y hacia afuera tres veces para eliminar las bacterias (a) sueltas, esta alícuota representa la bacteria planctónica.

10 • Luego se rodeó la misma herida usando otro cilindro estéril y se pipeteó nuevamente 1 ml de solución neutralizadora de uso múltiple en el cilindro y esta vez se lavó con una espátula de teflón estéril durante 30 segundos para eliminar las bacterias (b) firmemente unidas, esta parte alícuota fue aspirada y representa la bacteria de biopelícula.

Cuantificación bacteriana:

15 • Las diluciones (c) en serie se realizaron y cuantificaron usando el sistema (d) de placa en espiral (que deposita una cantidad definida (50 ml de suspensión sobre la superficie de una placa de agar giratoria).

- Se cultivó *Staphylococcus aureus* en medio diferencial y selectivo de agar sal de manitol (e) a 37 ± 2 °C, durante 24 horas.

B. Resultados

Heridas tratadas con DTPA solo:

20 • Las heridas tratadas con DTPA 30000 μ M contenían los recuentos más bajos de *S. aureus* en comparación con todas las demás concentraciones de DTPA.

- El tratamiento con esta concentración resultó en una reducción del 99.96% en comparación con el grupo no tratado.

25 • Los aumentos en la concentración de DTPA fueron directamente proporcionales a los aumentos en el porcentaje de reducción bacteriana tanto de plancton como de biopelícula.

- Todas las heridas, con excepción de las tratadas con DTPA 30 μ M, contenían más *S. aureus* en el fenotipo de biopelícula que en un estado planctónico.

- El control positivo de 0.1% de gentamicina produjo una reducción sustancialmente mayor en la carga biológica de la herida que cualquiera de las concentraciones de DTPA solo.

30 La figura 2 proporciona un resumen del gráfico de barras para facilitar la comparación que muestra las heridas tratadas con DTPA solo en concentraciones crecientes y el efecto sobre los recuentos de bacterias tanto planctónicas como de biopelículas de *S. aureus* ATCC6538

Heridas tratadas con la combinación DTPA/gentamicina:

35 • Los recuentos más bajos de *S. aureus* planctónico se observaron en heridas tratadas con DTPA 5000, 10000 y 30000 μ M + gentamicina al 0.1%. En comparación con las heridas no tratadas, las tres concentraciones redujeron la carga biológica en un 99.99% a niveles por debajo del límite de cuantificación.

- El DTPA 30000 μ M + gentamicina al 0.1% resultó en la menor cantidad de bacterias en el fenotipo de biopelícula, reduciendo los recuentos por debajo del límite de cuantificación.

40 • Las reducciones de las bacterias planctónicas y de biopelículas fueron directamente proporcionales a las concentraciones de DTPA usadas.

- Todas las heridas, con excepción de las tratadas con DTPA 1000 μ M + gentamicina al 0.1% o DTPA 30000 μ M + gentamicina al 0.1%, contenían más *S. aureus* en el fenotipo de biopelícula que en el estado planctónico. Las excepciones tuvieron niveles igualmente bajos (indetectables) tanto en biopelícula como en estado planctónico.

45 • Los tratamientos con DTPA 2500 μ M, 5000 μ M, 10000 μ M y 30000 μ M + gentamicina al 0.1% resultaron en recuentos tanto de plancton y biopelícula más bajos que en las heridas tratadas con solo gentamicina al 0.1%.

- Notablemente, parece que la adición de concentraciones muy bajas de DTPA a la gentamicina en realidad resultó en una disminución en la eficacia general de los antibióticos de la composición, esto es, prediciendo una sinergia

negativa, que inesperadamente se revierte a una sinergia positiva a concentraciones crecientes de DTPA en relación con la gentamicina.

La figura 3 presenta un resumen de gráfico de barras de heridas tratadas con una combinación de DTPA/gentamicina a concentraciones crecientes de DTPA y el efecto sobre los recuentos bacterianos de plancton y biopelícula de *S. aureus* ATCC6538

Como es evidente a partir de los datos, la mayor reducción de *S. aureus* dentro de las heridas fue directamente proporcional a la mayor concentración de DTPA (con y sin gentamicina al 0.1%). La concentración de 30000 µM (= 15 mg/ml) de DTPA usado solo produjo un recuento bacteriano planctónico de 5.19±0.29 Log CFU/ml y un recuento de biopelícula de 6.09±0.12 Log CFU/ml, mientras que el DTPA 30000 µM usado junto con la gentamicina al 0.1% resultó en heridas que contenían cargas bacterianas de plancton y biopelícula por debajo del nivel de cuantificación (1.30 Log CFU/ml). Estos fueron más de 3.89±0.29 y 4.79±0.1.2 Log diferencias en unidades formadoras de colonias por mililitro, respectivamente. Los tratamientos con DTPA 2500 µM, 5000 µM, 10000 µM y 30000 µM (equivalentes a 1.25, 2.5, 5 y 15 mg/ml respectivamente) + gentamicina al 0.1% produjeron reducciones mayores en los recuentos bacterianos de plancton y biopelículas de *S. aureus* que la gentamicina al 0.1% sola. Estos datos indican que el quelante de zinc, DTPA, tiene un efecto antimicrobiano que es sinérgico cuando se usa en combinación con gentamicina.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra una formulación de pulverización de ejemplo de realizaciones de las composiciones de la invención. Los componentes esenciales comprenden desde aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml (30 a 100 mM) de DTPA, gentamicina al 0.1%, agente regulador (para mantener el pH), y opcionalmente uno o más excipientes tales como modificadores de la viscosidad y/o conservantes. Los excipientes apropiados y las concentraciones apropiadas serían fácilmente evidentes para una persona de habilidad ordinaria en la composición que formulan las técnicas. La formulación básica se puede ajustar para proporcionar composiciones de pulverización acuosas de concentraciones variables de DTPA. Los métodos de preparación de las composiciones anteriores se pueden ampliar usando métodos comúnmente conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra una formulación de crema tópica de ejemplo.

La formulación tópica:

1. Proporciona una crema/vehículo emoliente de aceite en agua que transportará y dispersará los componentes farmacéuticos activos de DTPA y gentamicina, junto con componentes farmacéuticos adicionales que se pueden incluir en realizaciones alternativas;

2. Proporciona un emulsionante que mantendrá los componentes farmacéuticos activos uniformemente dispersos;

3. Proporciona una crema emoliente que actúa como portador (agente dispersante), hidratante y humectante (mantiene la piel suave), evitando la pérdida de agua y bloqueando la humedad mientras mantiene húmeda el área específica del sitio, proporcionando de este modo un ambiente húmedo para mejorar la cicatrización natural de heridas;

4. Proporciona una crema tópica emoliente que, al entrar en contacto con una herida de mamífero o una incisión quirúrgica, dispersará de manera uniforme y rápida los ingredientes farmacéuticos activos en la aplicación específica del sitio, mientras se absorbe rápidamente en ese sitio específico;

Se incorporaron componentes GRAS seleccionados (generalmente reconocidos como seguros) y se compusieron farmacéuticamente dentro de parámetros establecidos, tales como adiciones oportunas de ingredientes, temperatura, enfriamiento, etc., estando tal incorporación dentro de la habilidad de un profesional ordinario.

Seleccionar los ingredientes GRAS y sus respectivas funciones:

1. Estearato de glicerilo/PEG-100: emulsionante

2. Alcohol de lanolina: emulsionante, emoliente y potenciador de la viscosidad

3. Alcohol cetílico: emulsionante, emoliente, agente espesante e hidratante.

4. Aceite mineral: emoliente

5. Solución de sorbitol al 70%: humectante y acondicionador de la piel.

6. Agua purificada: actúa como portador y agente dispersante.

ES 2 749 223 T3

Los emulsionantes generalmente fomentan la suspensión de un líquido en otro, mientras que los emolientes actúan como humectantes para mantener la piel (herida) suave, al tiempo que aumentan la capacidad de la piel para retener agua y retener la humedad, mientras lubrican la piel (herida). Proporcionar la capacidad de mantener la herida húmeda crea un ambiente óptimo de curación de heridas.

- 5 Los siguientes ingredientes en la tabla ilustran una realización muy específica de una composición apropiada como la base de crema para la formulación tópica instantánea.

Tabla 1: Base de crema

	Componente	Cantidad
1	Estearato de glicerilo/PEG-100 (estearato 25F-D)	109.6 g
2	Alcohol de lanolina en polvo	12.146 g
3	Polvo de alcohol cetílico	6.122 g
4	Aceite mineral	7.565 mL
5	Solución de sorbitol al 70%	8.556 mL
6	Agua destilada	348.696 mL

Instrucciones de formulación:

- 10 1. En un vaso de precipitados de vidrio de tamaño apropiado, equipado con una barra de agitación magnética, se agrega el agua y el sorbitol y se mezcla hasta que quede uniforme.
2. Se transfiere la solución desde la etapa 1 a través de un filtro de 0.22 micras a un vial de vidrio del tamaño apropiado.
- 15 3. En un vaso de precipitados de vidrio separado, se agregan los siguientes ingredientes y se inicia el calentamiento a 70 °C, estearato de glicerol/alcohol PEG-100, alcohol de lanolina, alcohol cetílico y aceite mineral.
4. Se toma la solución desde la etapa 3, se coloca en un vial, se tapa, se sella y esteriliza con calor seco durante la noche a 121 °C.
5. En el conjunto aséptico, usando la campana aséptica, se coloca la solución de la etapa 4 en un vaso de precipitados provisto de una barra de agitación magnética y se calienta a aproximadamente 90 °C.
- 20 6. Se calienta la solución de la etapa 2 a aproximadamente 90 °C y se transfiere a la solución de la etapa 5, se inicia la mezcla.
7. Se calienta la mezcla, en la etapa 6, a 90 °C, se suspende el calentamiento y se deja enfriar a 60 °C.
8. Se mantiene la solución a 60 °C hasta que se necesite más.

Tabla 2: Agente quelante-solución de 10 mg/ml

	Componente	Cantidad
1	Na ₃ CaDTPA	0.5 g
2	Agua estéril para inyección	50 mL

- 25 Instrucciones de formulación:
1. En un vaso de precipitados de vidrio de tamaño apropiado equipado con una barra de agitación magnética, se agrega el Na₃CaDTPA.
2. QS con agua estéril para inyección, se inicia la mezcla, se mezcla hasta que se disuelva.

- 30 Tabla 3: Composición tópica: quelante 1000 uM/crema de gentamicina al 0.1%

	Componente	Cantidad
1	Agente quelante, solución de 10 mg/ml	3,221 mL
2	Agua estéril para inyección	2.279 mL
3	Sulfato de gentamicina en polvo	0.08 g
4	Base de crema	45 mL

Instrucciones de formulación:

1. Usando un vaso de precipitados de vidrio de tamaño apropiado, se prepara una solución de alícuota secundaria agregando la cantidad especificada de solución de agente quelante a la cantidad especificada de agua estéril.
- 5 2. Se coloca una barra de agitación magnética en la solución y se mezcla hasta que quede uniforme.
3. Usando una jeringa de tamaño apropiado, se extraen 5 mL de la solución de la etapa 2.
4. Se descarga el contenido en un vaso de precipitados de vidrio de tamaño apropiado equipado con un agitador magnético.
5. Se inicia la mezcla a baja velocidad y se agrega el sulfato de gentamicina y se mezcla hasta que se disuelva.
- 10 6. Se vuelve a cargar la jeringa con el material en la etapa 5, para asegurar una transferencia total.
7. En un vaso de precipitados de vidrio de tamaño apropiado, se agrega la base de crema que se ha mantenido a 60 °C y se calienta a 90 °C.
8. Se agrega una barra de agitación magnética a la base de crema y se inicia la mezcla a baja velocidad.
9. Se conecta un filtro de 0.22 micras a la jeringa que sostiene la alícuota de 5 mL desde la etapa 6 y se transfiere la alícuota a la base de crema en la etapa 8.
- 15 10. Se continúa la mezcla hasta que esté uniforme y permita que la crema se enfríe a aproximadamente 55 °C y se transfiere las cantidades requeridas al recipiente apropiado.
11. Se esteriliza.

20 La formulación anterior se puede ajustar fácilmente para proporcionar composiciones tópicas de concentraciones variables de DTPA que incluyen, por ejemplo, composiciones que comprenden desde aproximadamente 30 μ M a aproximadamente 30 mM de DTPA. Opcionalmente, se puede omitir el antibiótico. Los métodos de preparación de las composiciones anteriores se pueden ampliar usando métodos comúnmente conocidos en las técnicas farmacéuticas.

25 Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en este documento. El alcance de la presente invención no pretende limitarse a ejemplos específicos descritos en la descripción anterior, sino que es como se establece en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo con las reivindicaciones, los artículos tales como "un", "uno" y "el" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, empleado en, o de otra manera relevante para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, empleado o de otra manera es relevante para un producto o proceso dado. Se debe entender que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., desde una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen se introducen para incluir uno o más elementos, limitaciones, cláusulas o términos descriptivos, que se encuentran en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Adicionalmente, cuando la divulgación recita un producto (por ejemplo, un artículo de fabricación o dispositivo), se debe entender que también se prevén métodos para usar el producto según cualquiera de los métodos descritos en este documento, y también se prevén métodos para fabricar el producto, a menos que se indique lo contrario o que sea evidente para un experto en el arte que surgiría una contradicción o inconsistencia. Se prevé que los usos médicos para tratar a un sujeto pueden incluir una etapa para proporcionar a un sujeto que necesita tal tratamiento (por ejemplo, un sujeto que tiene una herida u otra necesidad médica de tratamiento antimicrobiano, incluida una necesidad profiláctica), una etapa para diagnosticar a un sujeto que tiene dicha enfermedad o trastorno, una etapa para seleccionar un sujeto para el tratamiento y/o una etapa para sugerir

un artículo, composición o kit de la invención a un sujeto o prescribir un artículo, composición o kit de la invención para un sujeto o proporcionar instrucciones sobre el uso del artículo, composición o kit, por ejemplo, instrucciones para usar el artículo, composición o kit para uno o más propósitos.

- 5 Cuando los elementos se presentan como listas, se debe entender que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento (s) se puede eliminar del grupo. La invención proporciona todas estas realizaciones. También se debe entender que, en general, cuando se hace referencia a la invención, o aspectos de la invención, se denomina(n) como que comprende(n) elementos particulares, características, etc., ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etc.
- 10 Los términos "aproximadamente" o "alrededor de" en referencia a un número generalmente incluyen números que caen dentro del $\pm 10\%$, en algunas realizaciones del $\pm 5\%$, en algunas realizaciones $\pm 1\%$, en algunas realizaciones $\pm 0.5\%$ del número a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto (excepto donde tal número excedería inadmisiblemente el 100% de un posible valor). Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos finales. Adicionalmente, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto y la comprensión de un experto en el arte, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor
- 15 específico o subintervalo dentro de los intervalos establecidos en diferentes realizaciones de la invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica formulada para aplicación tópica a un sujeto, la composición comprende un 0.1% de gentamicina en peso, 5 a 15 mg/ml de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), y una emulsión de aceite en agua.
- 5 2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el DTPA se agrega a la composición como Na₅DTPA o Na₃CaDTPA.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que el DTPA está presente en forma ácida, y la composición además comprende un agente solubilizante.
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el agente solubilizante es ácido clorhídrico.
- 10 5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para usar en el aumento de la eficacia antibacteriana de la gentamicina.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, para usar en el tratamiento de una herida en un sujeto.
7. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 6, en la que la herida está sobre una superficie de la piel o cualquier superficie de la estructura del cuerpo que contiene queratina.
- 15 8. Un método de inhibición de la formación de biopelícula en una superficie, el método que comprende poner en contacto la superficie con una composición que comprende aproximadamente 0.1% en peso de gentamicina y 5 a 15 mg/ml de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), en el que la superficie puede ser una superficie dura o una superficie textil.
9. El método según la reivindicación 8, en el que la composición se aplica a la superficie como una formulación pulverizada o mediante una toallita lista para usar.
- 20 10. El método según la reivindicación 8 o 9, en el que la biopelícula comprende una o más de las células bacterianas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, y *S. pseudintermedius*.
11. El método según la reivindicación 8 o 9, en el que la biopelícula comprende células bacterianas de *S. aureus*.
- 25 12. Un artículo fabricado para apósito para heridas que comprende al menos una porción impregnada o recubierta con una composición farmacéutica que comprende aproximadamente 0.1% en peso de gentamicina y 5 a 15 mg/ml de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA).
13. El artículo según la reivindicación 12, en el que el artículo está fabricado como una venda.
- 30 14. El artículo según la reivindicación 12 o 13, en la que el artículo es una prenda de vestir usada por un sujeto implicado en una actividad de alto riesgo mortal de tal manera que la ropa puede presionarse contra una herida abierta tan pronto como el sujeto experimente una lesión que comprende una herida abierta, contactando así la herida con la composición.
15. Un método de formulación de una composición farmacéutica según la reivindicación 1 como una formulación tópica, el método que comprende:
- 35 se proporciona un recipiente base de una base de emulsión de aceite en agua apropiada mantenida a aproximadamente 60 °C;
- se prepara una solución alícuota en un primer recipiente agregando una cantidad de DTPA a una cantidad de agua estéril y se mezcla hasta que sea uniforme;
- se transfiere un volumen específico de la parte alícuota a un segundo recipiente y se agrega sulfato de gentamicina mientras se mezcla hasta que el sulfato de gentamicina se disuelva sustancialmente por completo;
- 40 se calienta la base en el recipiente base a aproximadamente 90 °C mientras se agita;
- se filtra y transfiere todo el contenido del segundo recipiente al recipiente base;
- se mezcla hasta que sea uniforme;
- se enfría a aproximadamente 55 °C; y
- se transfiere a un recipiente de esterilización y se esteriliza.

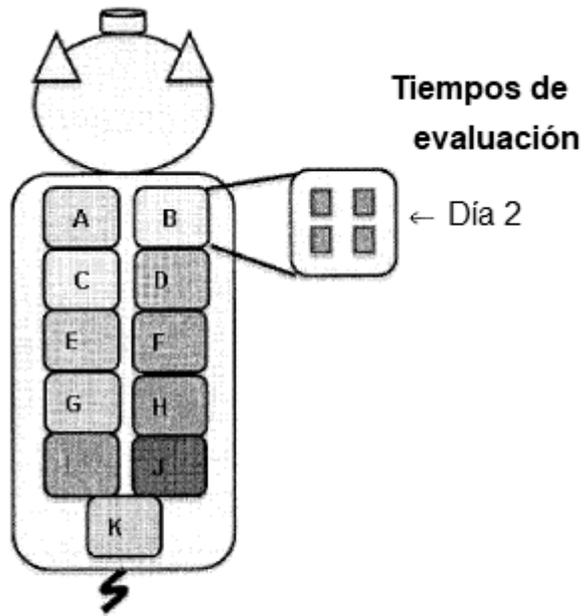


FIGURA 1

Recuentos bacterianos en plancton y biopelícula de *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (DTPA solo)

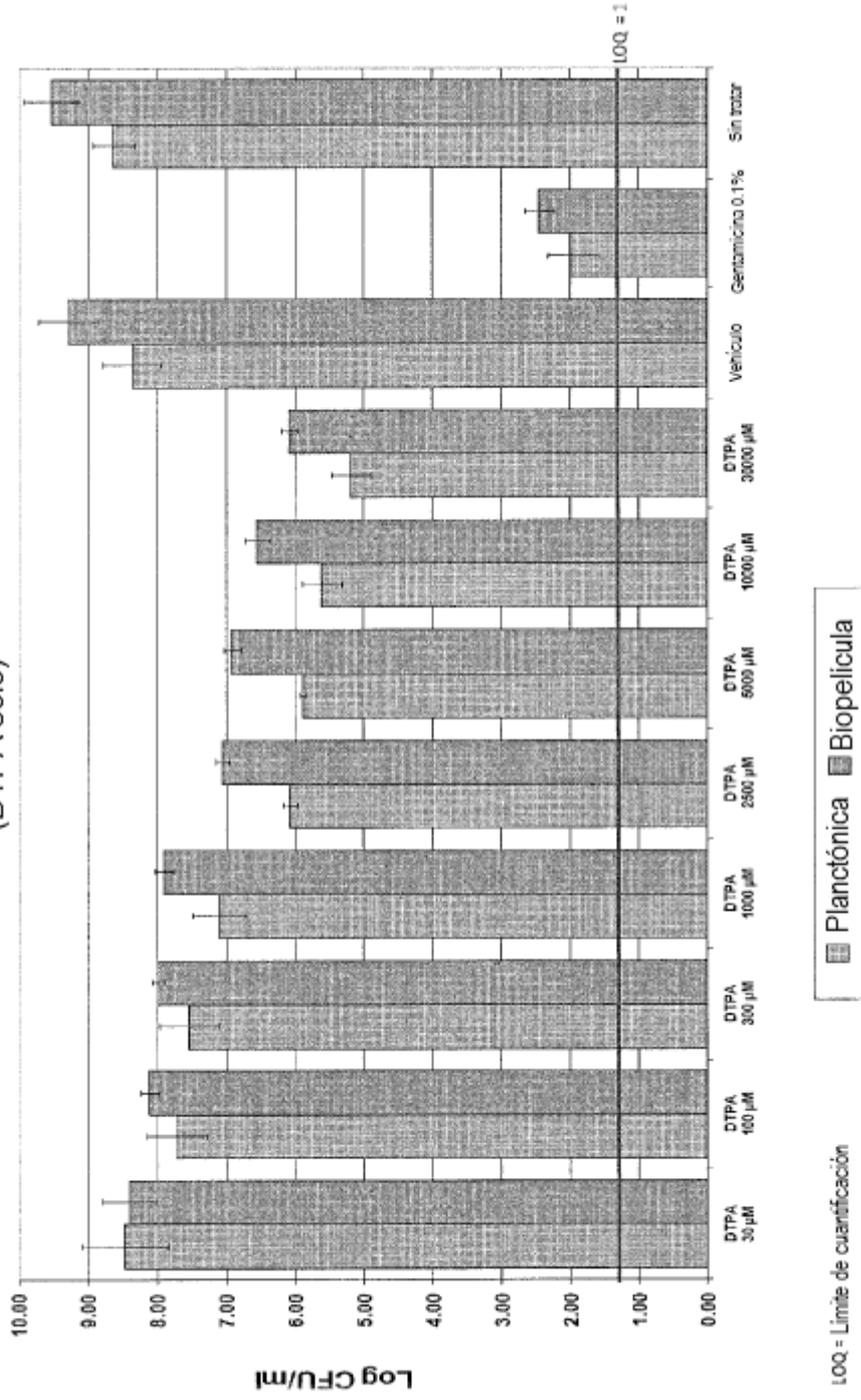


FIGURA 2

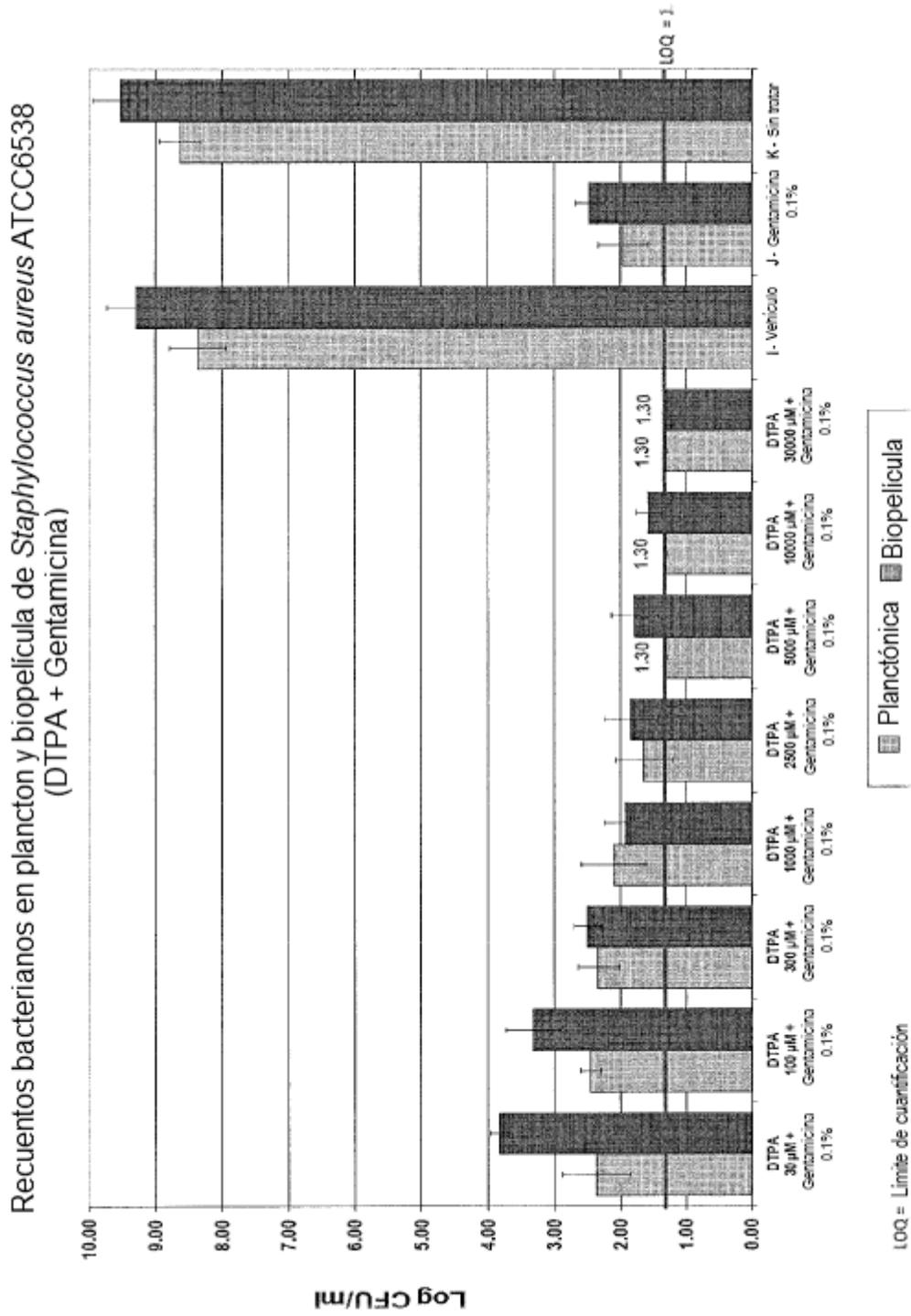


FIGURA 3