

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 400**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61L 29/16 (2006.01)

A61L 29/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2004 PCT/US2004/017967**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2004 WO04108091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2004 E 04754538 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 1644024**

54 Título: **Soluciones de purgado antimicrobianas**

30 Prioridad:

06.06.2003 US 476555 P

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

20.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

RAAD, ISSAM

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 749 400 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

Soluciones de purgado antimicrobianas

5 **Antecedentes de la invención**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/476 555, presentada el 6 de junio de 2003.

10 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a los campos de medicina y microbiología. Más particularmente, se refiere a soluciones antimicrobianas y métodos de reducción de los organismos microbianos de dispositivos médicos permanentes, equipo médico y otras superficies, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

15

2. Descripción de técnica relacionada

Los dispositivos médicos, tales como catéteres vasculares, han mejorado la calidad del cuidado médico. Sin embargo, infecciones resultantes de la colonización de organismos incluidos en biopelículas son la complicación más frecuente asociada con el uso de estos y otros dispositivos permanentes y/o protésicos. De hecho, las infecciones son las complicaciones más graves asociadas con catéteres venosos centrales permanentes (CVC) (Maki et al., 1998). Se estima que más de 200 000 infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con catéter (CRBSI) se producen anualmente en los Estados Unidos solamente (Kluger et al., 1999). *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y especies de *Candida* son los organismos principales que causan CRBSI (Maki et al., 1998; Raad et al., 2002).

Como la colonización intraluminal es la fuente principal para la migración de organismos que dan lugar a infecciones del torrente sanguíneo en catéteres de silicona a largo plazo (Raad et al., 1993), las recientes directrices por el CDC y la Infectious Diseases Society of America han propuesto el uso de soluciones de bloqueo antimicrobiano intraluminales para la prevención y el tratamiento de CRBSI (Mermel et al., 2001; Centers for Disease Control and Prevention, 2002). La mayoría de los CVC a largo plazo se purgan típicamente con heparina. Una combinación antimicrobiana/anticoagulante que consiste en vancomicina/heparina con y sin ciprofloxacina demostró reducir el riesgo de bacteremia relacionada con catéter causada por organismos grampositivos (Carratala et al., 1999; Henrickson et al., 2002; Schwartz et al., 1990). Sin embargo, con el aumento de las incidencias de infección por bacterias grampositivas resistentes a vancomicina, han surgido preocupaciones sobre el uso de soluciones de purgado de vancomicina y su potencial de aumentar el riesgo de resistencia a vancomicina (Spafford et al., 1994).

Recientemente, el autor de la presente invención demostró que una solución de purgado que comprende minociclina y EDTA (M-EDTA) es muy eficaz en prevenir la colonización relacionada con catéter, bacteremia y endocarditis en conejos (Raad et al., 2002). En comparación con una solución de purgado de heparina, se descubrió que M-EDTA aumenta el riesgo de colonización relacionada con catéter e infección en pacientes de hemodiálisis, así como en pacientes con cáncer pediátrico (Bleyer et al., 2000; Chatzinikolaou et al., 2002). EDTA tiene una actividad anticoagulante equivalente a heparina (Reardon et al., 1991). Un anticoagulante en soluciones de purgado es necesario para prevenir la oclusión trombotica de la luz del catéter.

Aunque se ha descubierto que M-EDTA es eficaz en prevenir CRBSI, esta solución no puede ser aplicable dada algunas de las limitaciones del mundo real de la práctica clínica. En estudios animales y clínicos, se requería que la solución de bloqueo de M-EDTA se expusiera a la superficie del dispositivo médico permanente, tal como la luz de los catéteres, durante al menos 4 horas. Los estudios *in vitro* también han demostrado que M-EDTA requiere al menos 4 horas de tiempo de permanencia para erradicar organismos que colonizan la luz del catéter (véase en particular los datos de la patente de Estados Unidos 5 362 754, columnas 11 y 12, y tablas 3, 4 y 5, así como de la patente de Estados Unidos 5 688 516, columnas 15 y 16, y tablas 3, 4 y 5). Proporcionar un tiempo de exposición de 4 horas para reducir los microbios usando la solución de M-EDTA habitualmente no es posible en pacientes críticos que requieren tratamiento de infusión continua, incluyendo nutrición parenteral.

Por ejemplo, tanto, hay una necesidad importante en la técnica de desarrollar composiciones y métodos para la rápida reducción y/o erradicación de microbios de dispositivos médicos permanentes sin interrupción del uso del dispositivo en pacientes durante un periodo demasiado largo. Además, también hay una necesidad de composiciones antimicrobianas mejores y mejoradas.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención supera estas y otras limitaciones en la técnica y proporciona composiciones que reducen o erradicar los agentes microbianos de superficies, en la que las composiciones comprenden al menos un agente antimicrobiano que es minociclina, al menos un quelante y/o anticoagulante que es EDTA, y al menos un alcohol que es etanol, en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v). La presente

65

invención también proporciona métodos para reducir rápidamente o erradicar agentes microbianos de las superficies.

Por lo tanto, se proporcionan soluciones que comprenden al menos un alcohol que es etanol, al menos un agente antimicrobiano que es minociclina y al menos un quelante y/o anticoagulante que es EDTA, en las que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v). Los "agentes antimicrobianos", además de dicha minociclina, que pueden estar comprendidos en las soluciones de la presente invención incluyen agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, así como agentes antisépticos. Estos componentes están presentes en cantidades eficaces para reducir el crecimiento microbiano.

Como también se define en las reivindicaciones, las soluciones antimicrobianas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos un agente antimicrobiano que es minociclina. En algunas realizaciones de la invención, el agente antimicrobiano comprende además un agente antibacteriano. Aunque puede usarse cualquier agente antibacteriano en la preparación de las presentes soluciones antimicrobianas, algunos agentes antibacterianos ejemplares no limitantes incluyen los clasificados como aminoglucósidos, betalactamas, quinolonas o fluorquinolonas, macrólidos, sulfonamidas, sulfametaxozoles, tetraciclinas, estreptograminas, oxazolidinonas (tal como linezolid), clindamicinas, lincomicinas, rifamicinas, glucopéptidos, polimixinas, antibióticos lipopeptídicos, así como sales de sodio farmacológicamente aceptables, sales de calcio farmacológicamente aceptables, sales de potasio farmacológicamente aceptables, formulaciones lipídicas, derivados y/o análogos de los anteriores.

Cada una de estas clases de agentes antibacterianos tienen diferentes mecanismos de acción y están representados por varios antibióticos cuyo análisis se presenta a continuación. Sin embargo, los expertos en la materia reconocerán que la invención no está limitada de ninguna manera a los agentes expuestos aquí y que estos agentes se describen simplemente como ejemplos.

Los aminoglucósidos son antibióticos bactericidas que se unen al ribosoma 30S e inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Típicamente son activos contra bacilos gramnegativos aeróbicos y estafilococos. Aminoglucósidos ejemplares que pueden usarse en algunos aspectos específicos de la invención incluyen amicacina, canamicina, gentamicina, tobramicina o netilmicina.

Las betalactamas son una clase de antibacterianos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Una mayoría de las betalactamas clínicamente útiles pertenecen al grupo de penicilina (penam) o los grupos de cefalosporina (cefem). Las betalactamas también incluyen los carbapenems (por ejemplo, imipenem) y monobactamas (por ejemplo, aztreonam). También se incluyen en esta categoría inhibidores de betalactamasa tales como ácido clavulánico y sus derivados.

Ejemplos no limitantes del grupo de antibióticos de penicilina que pueden usarse en las soluciones de la presente invención incluyen amoxicilina, ampicilina, benzatina penicilina G, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, piperacilina, o ticarcilina, etc. Ejemplos de cefalosporinas incluyen ceftiofur, ceftiofur de sodio, cefazolina, cefaclor, ceftibuteno, ceftizoxima, cefoperazona, cefuroxima, cefprozil, ceftazidima, cefotaxima, cefadroxil, cefalexina, cefamandol, cefepima, cefdinir, ceftriaxona, cefixima, cefpodoxima proxetil, cefapirina, ceftioxitina, cefotetano, etc. Otros ejemplos de betalactamas incluyen mipenem o meropenem, que son antibióticos parenterales extremadamente activos con un espectro contra casi todos los organismos grampositivos y gramnegativos tanto aeróbicos como anaeróbicos y a los que son particularmente susceptibles los enterococos, *B. fragilis* y *P. aeruginosa*.

Ejemplos de inhibidores de betalactamasa incluyen clavulanato, sulbactam o tazobactam. En algunos aspectos de la presente invención, las soluciones antibacterianas pueden comprender una combinación de al menos una betalactama y al menos un inhibidor de betalactamasa.

Los antibióticos macrólidos son otra clase de agentes bacteriostáticos que se unen a la subunidad 50S de los ribosomas e inhiben la síntesis de proteínas bacterianas. Estos fármacos son activos contra cocos grampositivos aeróbicos y anaeróbicos, con la excepción de enterococos, y contra anaerobios gramnegativos. Los macrólidos ejemplares incluyen eritromicina, azitromicina, claritromicina.

Las quinolonas y fluoroquinolonas típicamente funcionan mediante su capacidad de inhibir la actividad de la ADN girasa. Los ejemplos incluyen ácido nalidíxico, cinoxacina, trovafloxacina, ofloxacina, levofloxacina, grepafloxacina, trovafloxacina, esparfloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, moxifloxacina y gatifloxacina.

Las sulfonamidas son antibióticos bacteriostáticos sintéticos con amplio espectro contra la mayoría de organismos grampositivos y muchos gramnegativos. Estos fármacos inhiben la multiplicación de las bacterias actuando como inhibidores competitivos del ácido *p*-aminobenzoico en el ciclo de metabolismo del ácido fólico. Los ejemplos incluyen mafenide, sulfisoxazol, sulfametoxazol y sulfadiazina.

El grupo de antibióticos de tetraciclina incluye derivados de tetraciclina tales como tigeciclina que es un nuevo fármaco en investigación (IND), minociclina, doxiciclina o demeclociclina y análogos tales como anhidrotetraciclina, clorotetraciclina o epioxitetraciclina. Los autores de la presente invención han demostrado previamente que la

minociclina tiene una mayor penetración de la capa de biopelícula microbiana que la vancomicina y que el EDTA es único en evitar de forma eficaz y disolver la glucocálix microbiano rico en polisacáridos (patente de Estados Unidos 5 362 754).

- 5 La clase de agentes antibacterianos de estreptogramina se ejemplifica por quinupristina, dalfopristina o la combinación de dos estreptograminas.

Los fármacos de la clase de rifamicina típicamente inhiben la ARN polimerasa dependiente de ARN, que da lugar a la supresión de la síntesis de ARN y tienen un espectro muy amplio de actividad contra la mayoría de bacterias grampositivas y gramnegativas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Mycobacterium*. Una rifamicina ejemplar es rifampicina.

Otros fármacos antibacterianos son glucopéptidos tales como vancomicina, teicoplanina y derivados de los mismos. Otros fármacos antibacterianos más son las polimixinas que se ejemplifican por colistina.

Además de estos otros varios agentes antibacterianos tales como prestinomicina, cloranfenicol, trimetoprim, ácido fusídico, metronidazol, bacitracina, espectinomicina, nitrofurantoína, daptomicina u otros leptopéptidos, oritavancina, dalbavancina, ramoplanina, cetólido, etc. pueden usarse en la preparación de las composiciones descritas en este documento. De estos, el metronidazol es activo únicamente contra protozoos, tales como *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, y bacterias estrictamente anaeróbicas. La espectinomicina es un antibiótico bacteriostático que se une a la subunidad 30S de ribosoma, inhibido de este modo la síntesis de proteínas bacterianas y la nitrofurantoína se usa por vía oral para el tratamiento o la profilaxis de UTI que es activa contra *Escherichia coli*, especies de *Klebsiella-Enterobacter*, estafilococos y enterococos.

En otras realizaciones, el agente antimicrobiano comprende además un agente antifúngico. Algunas clases ejemplares de agentes antifúngicos incluyen imidazoles o triazoles tales como clotrimazol, miconazol, cetoconazol, econazol, butoconazol, omoconazol, oxiconazol, terconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol (documento UK 109 496), posaconazol, ravuconazol o flutrimazol; los antifúngicos de polieno tales como anfotericina B, anfoterecina B liposómica, natamicina, nistatina y formulaciones lipídicas de nistatina; los antifúngicos lipopeptídicos cíclicos activos en la pared celular, incluyendo las equinocandinas tales como caspofungina, micafungina, anidulfungina, cilofungina; LY121019; LY303366; el grupo de antifúngicos de alilamina tal como terbinafina. Otros ejemplos no limitantes más de agentes antifúngicos incluyen naftifina, tolnaftato, mediocidina, candicidina, tricomicina, hamicina, aurefungina, ascosina, alfatina, azacolutina, tricomicina, levorina, heptamicina, candimicina, griseofulvina, BF-796, MTCH 24, BTG-137586, pradimicinas (MNS 18184), benanomicina; ambisome; nikomicina Z; flucitosina o perimicina.

En otras realizaciones más de la invención, el agente antimicrobiano comprende además un agente antivírico. Ejemplos no limitantes de agentes antivíricos incluyen cidofovir, amantadina, rimantadina, aciclovir, ganciclovir, penciclovir, famciclovir, foscarnet, ribavirina o valciclovir. En algunas realizaciones, el agente antimicrobiano comprende además un péptido o proteínas de inmunidad innata. Algunas clases ejemplares de péptidos o proteínas de inmunidad innata son transferrinas, lactoferrinas, defensinas, fosfolipasas, lisozima, catelicidinas, serprocidinas, proteínas que aumentan la permeabilidad bactericida, péptidos alfa helicoides anfipáticos y otras proteínas antimicrobianas sintéticas.

En otras realizaciones de la invención, el agente antimicrobiano comprende además un agente antiséptico. Se conocen en la técnica varios agentes antisépticos y estos incluyen un derivado de taurinamida, un fenol, un tensoactivo de amonio cuaternario, un agente que contiene cloro, un quinaldino, una lactona, un tinte, una tiosemicarbazona, una quinona, un carbamato, urea, salicilamida, carbanilida, una guanida, una amidina, un biocida de imidazolina, ácido acético, ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiónico, ácido bórico, ácido deshidroacético, ácido sulfuroso, ácido vainillíco, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, isopropanol, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol, alcohol feniletílico, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, formaldehído, glutaraldehído, hipoclorito de calcio, hipoclorito de potasio, hipoclorito de sodio, yodo (en diversos disolventes), povidona-yodo, hexametilentetramina, noxitiolina, cloruro de 1-(3-cloroalil)-3,5,7-triazo 1-azoniaadamantano, taurolidina, taurultam, N(5-nitro-2-furfuriliden)-1-amino-hidantoína, 5-nitro-2-furaldehído semicarbazona, 3,4,4'-triclorocarbanilida, 3,4',5-tribromosalicilanilida, 3-trifluorometil-4,4'-diclorocarbanilida, 8-hidroxiquinolina, ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinacarboxílico, ácido 1,4-dihidro-1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolinacarboxílico, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, fenol, oxiclorseno de sodio, paraclorometaxilenol, 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenol, timol, clorhexidina, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, sulfadiazina de plata o nitrato de plata.

En algunas realizaciones de la invención, el agente antiséptico es como se expone en la memoria descriptiva de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/261 447, solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/316 165 y solicitud de patente no provisional de Estados Unidos n.º de serie 10/044 842. Por ejemplo, tanto, en algunas realizaciones el agente antiséptico comprende un reactivo básico y un tinte.

El reactivo básico puede ser un compuesto de guanidinio, una biguanida, una biperidina, un antiséptico de fenóxido, un óxido de alquilo, un óxido de arilo, un tiol, un haluro, una amina alifática o una amina aromática. En algunos

aspectos específicos, el reactivo básico es un compuesto de guanidinio. Ejemplos no limitantes de compuestos de guanidinio incluyen clorhexidina, alexidina, hexamidina. En otras realizaciones específicas, el reactivo básico es una biperidina. Un ejemplo de una biperidina es octenidina. En otros aspectos más, el reactivo básico es un antiséptico de fenóxido.

5 El tinte puede ser un tinte de triarilmetano, un tinte monoazo, un tinte diazo, un tinte indigoide, un tinte de xanteno, un tinte de antraquinona, un tinte de quinolina, un tinte FD&C. Ejemplos no limitantes de tinte de triarilmetano incluyen violeta de genciana, violeta de cristal, violeta de etilo o verde brillante. Los tintes monoazo ejemplares incluyen amarillo FD&C n.º 5 o amarillo FD&C n.º 6. Otros ejemplos no limitantes de tinte FD&C incluyen azul n.º 1 o verde n.º 3. Un ejemplo no limitante de tintes diazo es rojo D&C n.º 17. Un ejemplo de un tinte indigoide es azul FD&C n.º 2. Un ejemplo de un tinte de xanteno es rojo FD&C n.º 3; de un tinte de antraquinona es verde D&C n.º 6; y de un tinte de quinolina es amarillo D&C n.º 1.

15 Otros ejemplos de antisépticos que pueden usarse para preparar las soluciones antimicrobianas de la invención son los antisépticos de fenóxido tales como clofocetol, cloroxilenol o triclosán. Otros agentes antisépticos más que pueden usarse para preparar las soluciones antimicrobianas de la invención son gendina, genlenol, genlosano o genfocetol.

20 Un experto en la materia apreciará que se puede usar uno o más agentes antimicrobianos, es decir, se puede usar minociclina en solitario o junto con uno o más agentes antibacterianos, y/o uno o más agentes antifúngicos y/o uno o más agentes antivíricos y/o uno o más agentes antisépticos, y/o combinaciones de los mismos.

25 Las soluciones antimicrobianas de acuerdo con la presente invención comprenden al menos un quelante y/o anticoagulante, que es EDTA. En particular, las soluciones antimicrobianas pueden comprender quelantes tales como ácido libre EDTA, EDTA 2Na, EDTA 3Na, EDTA 4Na, EDTA 2K, EDTA 2Li, EDTA 2NH₄, 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 o La(III)-EDTA. Quelantes adicionales, tales como CyDTA, DHEG, ácido dietilenetriaminapentaacético (DTPA), DTPA-OH, EDDA, EDDP, EDDPO, EDTA-OH, EDTPO, EGTA, HBED, HDTA, HIDA, IDA, Metil-EDTA, NTA, NTP, NTPO, O-Bistren, TTHA, EGTA, DMSA, deferoxamina, dimercaprol, citrato de cinc, una combinación de bismuto y citrato, penicilamina, succímero o etidronato también se contemplan como útiles en la preparación de las soluciones antimicrobianas de la invención (que comprenden EDTA). Se contempla que será aceptable cualquier quelante que se una a bario, calcio, cerio, cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, níquel, estroncio o cinc para su uso en la presente invención.

35 Como alternativa, se puede usar al menos un anticoagulante, que incluye EDTA y opcionalmente un anticoagulante adicional tal como heparina, hirudina, EGTA, urocinasa, estreptocinasa, peróxido de hidrógeno etc., en la preparación de las soluciones antimicrobianas de la invención.

40 Aunque se contempla una diversidad de alcoholes como útiles en la preparación de la presente solución antimicrobiana, e incluyen cualquier alcohol antimicrobiológicamente activo, la solución antimicrobiana de la presente invención comprende al menos un alcohol que es etanol. Además de etanol, ejemplos no limitantes de alcoholes incluyen además metanol, isopropanol, propilenglicol, alcohol bencílico, clorobutanol, alcohol feniletílico y similares. La concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v), preferiblemente en el intervalo de un 15 % a un 40 %, más preferiblemente en el intervalo de un 20 % a un 30 %, siendo el más preferible aproximadamente un 25 %. Por tanto, la concentración más preferida de alcohol incluirá un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 % o un 45 % (v/v) del alcohol en la preparación de las presentes soluciones antimicrobianas. Esto incluye el uso de concentraciones intermedias de alcohol tales como un 11 %, 22,5 %, 26 % y similares.

50 Un experto en la materia apreciará que las soluciones de la presente invención pueden comprender diversas combinaciones de al menos un alcohol, al menos un agente antimicrobiano y al menos un quelante/anticoagulante, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

55 La solución antimicrobiana de acuerdo con la invención comprende etanol, minociclina y EDTA, en la que en una realización la concentración de minociclina es de 0,001 mg/ml a 100 mg/ml. En otra realización, la concentración de minociclina es de aproximadamente 3 mg/ml. En otro aspecto, la concentración de EDTA está en el intervalo de 10-100 mg/ml. En una realización de este aspecto, la concentración de EDTA es de aproximadamente 30 mg/ml.

60 La invención también proporciona métodos para reducir organismos microbianos de una superficie, que comprende: a) obtener una solución antimicrobiana de la invención como se expone anteriormente; y b) poner en contacto la superficie con la solución antimicrobiana, por lo que dicho contacto reduce los organismos microbianos de la superficie, con la condición de que los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia se excluyan.

65 En una realización del método, el contacto se realiza durante 4 horas o menos. En otras realizaciones del método, el contacto se realiza durante 2 horas o menos, durante 1 hora o menos, durante 30 minutos o menos o durante 15 minutos o menos.

En otro aspecto, el método comprende además erradicar microbios de la superficie, en el que el contacto se realiza durante aproximadamente 15 minutos o más.

Los métodos de la invención pueden usarse para reducir agentes microbianos de la superficie de un dispositivo médico tal como un catéter, un tubo endotraqueal, un tubo de nefrostomía, un stent biliar, un dispositivo ortopédico, una válvula protésica, un implante médico, dispositivos dentales o implantes dentales, dispositivos de apoyo cardiaco, injertos vasculares, dispositivos de traqueostomía, dispositivos de ventriculostomía o dispositivos intratecales. En algunos aspectos, el catéter es un catéter permanente tal como un catéter venoso central, un catéter intravenoso periférico, un catéter arterial, un catéter de Swan-Ganz, un catéter de hemodiálisis, un catéter urinario, un catéter peritoneal, un catéter umbilical, un catéter de silicona no tunelizado percutáneo, un catéter venoso central no tunelizado con camisa o un acceso venoso central subcutáneo.

En otras realizaciones, los métodos de la invención son útiles en la reducción de los agentes microbianos de una superficie tal como una superficie orgánica o una superficie inorgánica. Una superficie orgánica se ejemplifica por suturas quirúrgicas. Una superficie inorgánica puede ser la superficie de una tubería o conducto, un suelo, una mesa, un mostrador, equipo hospitalario o una silla de ruedas, etc. Ejemplos no limitantes de una tubería son un conducto de aceite, un conducto de agua, una tubería de máquina de hielo o una tubería para dispensar bebidas.

Se contempla que las soluciones antimicrobianas de la presente invención encontrarán utilidad particular como soluciones de enjuague bucal antimicrobiano. Dichas soluciones de enjuague bucal se contemplan como útiles tanto junto con procedimientos dentales como esterilización oral, así como en aplicaciones dentales generales y de higiene oral. El enjuague bucal antimicrobiano está llegando a ser extremadamente importante en la prevención de infecciones de la cavidad oral, así como en neumonía por aspiración. Los agentes microbianos en la boca particularmente alrededor de los dientes, incluidos por sí mismos en biopelícula y en la patogenia de infección y colonización es similar a la observada en, por ejemplo, catéteres vasculares. A este respecto, se contempla que se preferirá aplicar las combinaciones triples de la presente invención, que incluirán un antimicrobiano con EDTA y alcohol a baja concentración como se define en las reivindicaciones, como un enjuague bucal o solución de lavado bucal.

La invención también proporciona un kit para desinfectar una superficie para reducir los microorganismos de la misma, en el que el kit comprende componentes que incluyen al menos un agente antimicrobiano que es minociclina, al menos un anticoagulante/quelante que es EDTA y al menos un alcohol que etanol, contenidos en un recipiente adecuado. Los componentes pueden combinarse en un único recipiente, o componentes en polvo pueden liofilizarse, combinarse y compartimentarse por separado, o todos los componentes pueden colocarse en recipientes diferentes. En algunas realizaciones, únicamente el(los) agente(s) antimicrobiano(s) se incluye como un polvo seco. En aspectos que comprenden componentes en polvo, el kit puede incluir opcionalmente una segunda solución de vehículo para reconstituir el(los) agente(s) antibiótico(s) liofilizado(s).

En aspectos preferidos, el kit incluirá una dosis unitaria de una cantidad farmacológicamente eficaz de minociclina y EDTA, proporcionadas por separado como una dosis liofilizada o en polvo o ya mezcladas en una solución de etanol. En una realización específica, la dosis unitaria contiene al menos aproximadamente 9 mg de minociclina y al menos aproximadamente 90 mg de EDTA. Dicho kit puede comprender además una cantidad preseleccionada de una solución de etanol de modo que cuando se mezcla la solución de etanol con la dosis unitaria liofilizada, la concentración de minociclina es 3 mg/ml y la concentración de EDTA es 30 mg/ml.

Los kits de acuerdo con la presente invención pueden usarse para reducir/eliminar microbios sobre la superficie de un dispositivo médico, una tubería o conducto, un suelo, una mesa, un mostrador, equipo hospitalario o una silla de ruedas. Se contempla que los kits de la invención comprenderán además un medio para introducir los componentes del kit en el dispositivo médico, la tubería o superficie.

En algunos aspectos específicos de la invención, una jeringa o vial que comprende una dosis unitaria liofilizada de una cantidad farmacológicamente eficaz de uno o más de los tres componentes de las soluciones de purgado de la presente invención. Por ejemplo, dicha jeringa puede comprender minociclina y EDTA mezclados en una solución de etanol. En una realización específica, la dosis unitaria contiene al menos aproximadamente 9 mg de minociclina y al menos aproximadamente 90 mg de EDTA. Dicha jeringa o vial puede comprender además una cantidad preseleccionada de una solución de etanol de modo que cuando se mezcla la solución de etanol con la dosis unitaria liofilizada, se obtiene la concentración deseada del agente particular, tal como aproximadamente 3 mg/ml en el caso de minociclina y aproximadamente 30 mg/ml en el caso de EDTA.

En otras realizaciones de la invención, se contempla una solución de bloqueo para rellenar y/o purgar un dispositivo permanente médico tal como, aunque sin limitación, un catéter implantado. La solución de bloqueo comprende al menos un agente antimicrobiano que es minociclina, al menos un quelante y/o anticoagulante que es EDTA y al menos un alcohol que es etanol; en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v).

Algunos de los términos usados en la presente memoria descriptiva se definen a continuación.

Un "agente antimicrobiano" se define en este documento como un agente que tiene propiedades antibióticas contra bacterias, hongos, virus y otros patógenos e incluye agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivíricos y agentes antisépticos.

Como se usa en este documento, la expresión "agente antifúngico" se define como un compuesto que tiene efecto fungicida o fungistático tras el contacto de los hongos con el compuesto. Como se usa en este documento, el término "fungicida" se define indicando que tiene una acción eliminadora destructiva sobre hongos. Como se usa en este documento, el término "fungistático" se define como indicando que tiene una acción inhibidora sobre el crecimiento de hongos.

Como se usa en este documento, la expresión "agente antibacteriano" se define como un compuesto que tiene efecto bactericida o bacteriostático sobre bacterias en contacto con el compuesto. Como se usa en este documento, el término "bactericida" se define indicando que tiene una acción eliminadora destructiva sobre bacterias. Como se usa en este documento, el término "bacteriostático" se define como indicando que tiene una acción inhibidora sobre el crecimiento de bacterias.

Como se usa en este documento, la expresión "agente antivírico" se define como un compuesto que puede eliminar agentes víricos o uno que detiene la replicación de virus tras el contacto con el compuesto.

Para los fines de esta divulgación, la expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se define como una dosificación suficiente para inducir un efecto microbiocida o microbiostático sobre los microbios en contacto con la composición en una superficie.

La expresión "un quelante" indica uno o más quelantes. Como se usa en este documento, el término "quelante" se define como una molécula que comprende átomos no metálicos, pudiendo dos o más de dichos átomos ligarse o unirse con un ión metálico para formar un anillo heterocíclico que incluye el ión metálico.

Como se usa en este documento, los términos "contacto", "en contacto" y "que contacta", o "expuesto" y "exposición" se usan para describir el proceso por el que cualquiera de las composiciones divulgadas en la presente invención entra en yuxtaposición directa con la superficie de un dispositivo médico o cualquier otra superficie de la que tenga que reducirse o erradicarse el crecimiento microbiano.

Como se usa en este documento en la memoria descriptiva, "un/o" o "una" pueden indicar uno o más. Como se usa en este documento en las reivindicaciones, cuando se usa junto con la palabra "comprendiendo", las palabras "un/o" o "una" puede indicar uno o más de uno. Como se usa en este documento, "otro" puede indicar al menos un segundo o más.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan a modo de ilustración únicamente.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figura 1. Etanol en combinación con M-EDTA como solución de purgado usada durante 15 minutos o 24 horas, como se indica, ensayada contra MRSA en biopelícula.

Descripción de realizaciones ilustrativas

Los microorganismos que se adhieren por sí mismos a superficies inertes, tales como dispositivos médicos incluyendo catéteres vasculares, tubos endotraqueales, catéteres de Foley, *stents* biliares, tubos de nefrostomía, válvulas protésicas, catéteres de ventriculostomía o epidurales o conductos de líquidos, tales como conductos de aceite o conductos de agua, producen una capa hecha de exopolisacárido llamada biopelícula microbiana. Estos organismos se incluyen por sí mismos en esta capa. Esta capa de biopelícula finalmente se convierte en el entorno protector que protege estos organismos sobre la superficie inerte de la actividad antimicrobiana de diversos antibióticos antisépticos. En las patentes de Estados Unidos 5 362 754 y 5 688 516, el autor de la presente invención demostró que una combinación de uno o más agentes antimicrobianos con uno o más quelantes y/o anticoagulantes (tal como EDTA o heparina) reduce o erradica estos microorganismos incluidos en biopelícula resistentes a antibióticos si se deja que la combinación de antimicrobiano y quelante permanezca sobre la superficie durante al menos 4 horas. Sin embargo, tanto en situaciones clínicas como ambientales, típicamente no es factible permitir un tiempo de permanencia de 4 horas para que el quelante y el agente antimicrobiano reduzcan o erradiquen los

microbios. Por ejemplo, no es posible interrumpir el tratamiento de pacientes críticos que reciben tratamiento de infusión continua a través de un catéter vascular durante 4 horas. Tampoco es posible interrumpir una situación ambiental que implica conductos de líquidos durante 4 horas para permitir dicho tiempo de permanencia prolongado de solución antimicrobiana/quelante.

5

A. La presente invención

La presente invención permite una rápida reducción y/o erradicación de microorganismos incluidos en una biopelícula en un tiempo tan corto como aproximadamente 15 minutos de exposición a una combinación de al menos un antimicrobiano y al menos un quelante/anticoagulante, si esta combinación se prepara en un alcohol, en la que esta combinación es minociclina-EDTA en una solución de etanol, como se describe en detalle en esta memoria descriptiva.

10

Además, la presente invención proporciona soluciones antimicrobianas que comprenden uno o más agentes antimicrobianos, uno o más quelantes/anticoagulantes, y una solución alcohólica, como se define adicionalmente en las reivindicaciones. La presente invención también proporciona métodos para la rápida reducción o erradicación de microorganismos incluidos en una biopelícula sobre una superficie, que comprende poner en contacto o exponer la superficie a una solución de purgado de la invención, con la condición de que los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia se excluyan. Por tanto, la invención proporciona métodos para reducir o erradicar microbios de las superficies de dispositivos médicos, incluyendo dispositivos médicos permanentes, así como otras superficies, conductos y similares.

15

20

Las composiciones y los métodos de la presente invención tienen una eficacia inesperada y sorprendente no proporcionada por composiciones que comprenden únicamente soluciones alcohólicas, o composiciones que comprenden combinaciones de antimicrobianos con quelantes/anticoagulantes. En un ejemplo específico, la combinación del agente antimicrobiano minociclina con el quelante/anticoagulante EDTA requiere aproximadamente 4 horas de exposición o tiempo de permanencia para reducir los microbios de la superficie de un dispositivo médico. Por otro lado, una solución de etanol al 25 % en solitario suprime la colonización de organismos incluidos en la biopelícula, pero no los erradica. Sin embargo, una composición ejemplar de la presente invención, que comprende minociclina, EDTA y etanol al 25 % proporciona una rápida reducción y/o erradicación de los organismos microbianos en 15 minutos de exposición y también evita que vuelvan a crecer los microbios.

25

30

1. Aplicaciones médicas

Una de las aplicaciones de las soluciones de purgado antimicrobianas de la invención es reducir o erradicar los microbios de las superficies de dispositivos médicos especialmente dispositivos médicos permanentes tales como catéteres, tubos endotraqueales, tubos de nefrostomía, *stents* biliares, dispositivos ortopédicos, dispositivos protésicos e implantes médicos.

35

Hay al menos 5 millones de catéteres venosos centrales insertados anualmente en los Estados Unidos, 1,5 millones de los cuales son catéteres a largo plazo que permanecen en su sitio durante un promedio de 100 días, y al menos 3,5 millones de catéteres a corto plazo que permanecen durante un promedio de 7 días. Todos estos catéteres venosos se purgan con heparina en una base diaria. Se estima que al menos 150-175 millones de purgados de catéteres se producen anualmente en los Estados Unidos solamente. La heparina tiene buena actividad anticoagulante y, por tanto, evita oclusiones trombóticas. Sin embargo, la heparina no tiene actividad antimicrobiana y, de hecho, dado el medio alcalino que crea la heparina, se ha demostrado que es un promotor de la colonización microbiana de las superficies de los catéteres. Independientemente de si se usa heparina, casi un 90 %-100 % de los catéteres vasculares permanentes acaban siendo colonizados con organismos incluidos en biopelícula sobre la superficie de estos dispositivos, particularmente en la superficie luminal. Por tanto, la complicación más grave y frecuente de los catéteres vasculares es la infección, por el que según se purga líquido a través de la luz del catéter, los microorganismos migran al torrente sanguíneo y causan infecciones del torrente sanguíneo relacionadas con el catéter. Los catéteres venosos centrales permanentes están asociados con una frecuencia de aproximadamente un 5 %-8 % de infección del torrente sanguíneo relacionada con catéter, que a su vez está asociada con una mortalidad atribuible de un 25 % en pacientes críticos. Tal evento también está asociado con una alta morbilidad y un coste por episodio de un promedio de 30 000 \$ americanos.

40

45

50

55

El EDTA es un quelante bien conocido de hierro y calcio, así como un anticoagulante activo usado en tubos de extracción sanguínea. Se ha demostrado que el EDTA tiene actividad anticoagulante equivalente a la heparina. Además, el EDTA tiene actividad antibiopelícula y potencia la actividad antimicrobiana de otros agentes antimicrobianos, tales como minociclina. Sin embargo, para una combinación de un antimicrobiano con un quelante (tal como minociclina-EDTA) para erradicar organismos incluidos en biopelícula, se requiere el contacto de la superficie durante al menos 4 horas con esa combinación. Esto se demuestra en la patente de Estados Unidos 5 362 754 (véase especialmente los datos de las tablas 3, 4 y 5) y en la patente de Estados Unidos 5 688 516 (véase especialmente las columnas 15 y 16 y las tablas 3, 4 y 5). Este periodo prolongado de contacto o tiempo de permanencia no es posible en la población de pacientes de máximo riesgo (es decir, en pacientes que reciben nutrición parenteral total o pacientes críticos), ya que estos pacientes requieren una infusión continua, a menudo

60

65

ininterrumpida, a través del catéter. Para permitir una rápida reducción o erradicación de los microorganismos, se ha desarrollado una mejora en la presente invención en la que el(los) antimicrobiano(s) y quelante(s)/anticoagulante(s) se preparan en una solución alcohólica. En un ejemplo, esto se plasma por una combinación de minociclina-EDTA en una solución de etanol al 25 %.

La presente invención, por tanto, proporciona que los dispositivos médicos permanentes tales como catéteres se purguen con este antimicrobiano y quelante/anticoagulante en una solución de base alcohólica (como se define en las reivindicaciones. Esto proporcionará quelación/anticoagulación a través del quelante (EDTA). Además, la combinación de antibiótico/quelante con el alcohol provoca reducción de amplio espectro o erradicación de organismos microbianos incluidos en biopelícula. El alcohol aumenta además la eficacia de la combinación.

Algunos ejemplos de dispositivos médicos permanentes que pueden tratarse con las soluciones de la presente invención incluyen bolsas de drenaje en la cavidad abdominal conectores y tubos usados por pacientes de colostomía, derivadores vasculares, dispositivos protésicos ortopédicos, intraoculares o de pene. Los dispositivos de angioplastia, válvulas cardíacas y marcapasos también se incluyen dentro de la presente invención. Los catéteres tales como catéteres urinarios, venosos, arteriales y peritoneales pueden tratarse con las soluciones de purgado de la invención. Además, pueden tratarse dispositivos de traqueotomía, derivaciones, suturas quirúrgicas y otros dispositivos médicos o prótesis.

Además, los dispositivos médicos que son susceptibles al recubrimiento de las composiciones de la invención en general tienen superficies compuestas de materiales termoplásticos o poliméricos tales como polietileno, Dacron, nailon, poliésteres, politetrafluoroetileno, poliuretano, látex, elastómeros de silicona y similares. Los dispositivos con superficies metálicas también son susceptibles a recubrimientos con las combinaciones antibióticas. Dichos dispositivos se ejemplifican por prótesis óseas y articulares. También se contempla que las soluciones de la invención se usarán para preparar un medicamento para desinfectar superficies orgánicas tales como la piel, así como superficies mucosas.

Una solución de bloqueo antimicrobiano de la presente invención comprende al menos un alcohol que es etanol, al menos un agente antimicrobiano que es minociclina y al menos un quelante y/o anticoagulante que es EDTA; en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v). Diversas sustancias antimicrobianas como se divulga en este documento y que son bien conocidas para los expertos en la materia pueden combinarse con la solución de bloqueo para inhibir la infección. La solución de bloqueo antimicrobiano de la presente invención puede usarse para rellenar o purgar un dispositivo médico tal como un dispositivo permanente tal como un catéter implantado. Otros dispositivos médicos que se contemplan para su uso en la presente invención se divulgan en este documento.

2. Aplicaciones ambientales

Distinto a la reducción/erradicación de microbios en dispositivos médicos, las soluciones de purgado de la presente invención también son útiles en la erradicación de microbios de otras superficies en las que pueden crecer microbios, tales como tuberías, conductos, etc. Los conductos de líquidos, tales como conductos de aceite y agua, a menudo se obstruyen por biopelícula luminal que se produce por microorganismos que colonizan la superficie interna de estos conductos. A menudo estos conductos se purgan con agentes antimicrobianos. Sin embargo, los agentes antimicrobianos y antisépticos tienen poca actividad contra los organismos incluidos en biopelícula. Toneladas de antibióticos, tales como gentamicina, se usan a menudo para purgar la luz de conductos de aceite, en vano. La presente invención proporciona composiciones nuevas y eficaces y métodos para la erradicación de organismos, así como la biopelícula que se incluye en la luz de conductos (aceite, agua), así como otros dispositivos, tales como máquinas de hielo. Estos conductos o máquinas pueden purgarse o aclararse con las composiciones de la invención que comprenden al menos un agente antimicrobiano que es minociclina y al menos un quelante o anticoagulante que es EDTA preparado en una solución básica de etanol. El purgado de los conductos, máquinas o tubos con las composiciones de la invención proporciona rápida reducción y/o erradicación de la biopelícula y los organismos en la biopelícula, evitando de ese modo cualquier obstrucción o contaminación del agua, aceite o las máquinas de hielo en determinados entornos ambientales.

B. Agentes antimicrobianos y microbios

Se contemplan que las presentes composiciones tienen uno o más agentes antimicrobianos. Comprenden al menos un agente antimicrobiano que es minociclina. Los "agentes antimicrobianos" se definen en este documento como agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivíricos y/o agentes antisépticos.

Aunque la invención no se limita a ningún agente antimicrobiano particular además de minociclina, algunas clases ejemplares y ejemplos de agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, así como agentes antisépticos se describen anteriormente en la sección titulada "sumario de la invención" y, como apreciarán los expertos en la materia, cualquier combinación, así como agentes de los diferentes tipos y clases de los agentes antimicrobianos, pueden combinarse con minociclina para preparar las soluciones de la invención.

Algunos microbios bacterianos y fúngicos ejemplares no limitantes que pueden reducirse o erradicarse por las composiciones y métodos de la invención incluyen especies de *Staphylococcus* tales como *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*; especies de *Aspergillus* tales como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*; *Fusarium oxysporum*, especies de *Candida* tales como *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Además, también pueden erradicarse virus.

C. Quelantes y/o anticoagulantes

Un quelato es el tipo de compuesto de coordinación en que un ion metálico central se adhiere por enlaces coordinados a dos o más átomos no metálicos en la misma molécula. De este modo se forman anillos heterocíclicos durante la quelación, con el átomo metálico como parte del anillo. La molécula que comprende los átomos de unión no metálicos se denomina quelante. Los quelantes se usan en diversas aplicaciones químicas, por ejemplo, como agentes de titulación o como aceptores iones metálicos. Los quelantes pueden usarse para eliminar iones de la participación en reacciones biológicas. Por ejemplo, el quelante bien conocido ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA) actúa como anticoagulante porque puede combinarse con iones de calcio de la sangre.

Se ha demostrado previamente que los quelantes tienen efecto inhibitor del crecimiento significativo contra varios microbios. Se sabe que el hierro y otros oligometales son esenciales en el ciclo vital de los microorganismos tales como hongos y bacterias. Sin estos oligometales, los microbios son incapaces de crecer y reproducirse. Aunque el hierro es abundante en la naturaleza, su disponibilidad para la asimilación microbiana está limitada debido a la insolubilidad de iones férricos a pH neutro o alcalino. Como consecuencia, muchos microbios han desarrollado sus propias moléculas especializadasceptoras de oligometales, llamadas sideróforos, que se unen con oligometales y los hacen disponibles para la captación por los microbios. Los quelantes usados junto con la presente invención proporcionan un efecto inhibitor sobre los patógenos microbianos compitiendo con los sideróforos por cualquier ion oligometálico disponible. De esta manera, los quelantes presentes en las preparaciones farmacéuticas de la presente invención "roban" los iones metálicos esenciales para el crecimiento microbiano, causando de forma eficaz que el microbio "muera de hambre". Los agentes antibióticos adicionales y el etanol de las composiciones de la presente invención entonces llegan y atacan al microbio debilitado, destruyéndolos de ese modo o inhibiendo su crecimiento.

La siguiente tabla 1 proporciona una lista representativa de quelantes útiles junto con la presente invención, incluyendo EDTA (que está comprendido en la solución antimicrobiana, el kit o la solución de bloqueo de acuerdo con la invención), así como quelantes adicionales. Sin embargo, la lista proporcionada en la tabla 1 no pretende ser detallada. Los quelantes preferidos son aquellos que se unen a iones oligometálicos con una constante de unión que varía de 10^1 a 10^{100} . Los quelantes más preferidos son aquellos que se unen a iones oligometálicos con una constante de unión que varía de 10^{10} a 10^{80} ; y los quelantes mucho más preferidos son aquellos que se unen a iones oligometálicos con una constante de unión que varía de 10^{15} a 10^{60} . Además, los quelantes preferidos son aquellos que han demostrado tener un efecto inhibitor sobre patógenos microbianos diana, por ejemplo, la sal disódica de EDTA.

Tabla 1: Quelantes

Abreviatura	Nombre completo
Ácido libre EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético
EDTA 2Na	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal disódica, dihidrato
EDTA 3Na	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal trisódica, trihidrato
EDTA 4Na	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal tetrasódica, tetrahidrato
EDTA 2K	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal dipotásica, dihidrato
EDTA 2Li	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal de dilio, monohidrato
EDTA 2NH ₄	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal de diamonio
EDTA 3K	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, sal tripotásica, dihidrato
Ba(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de bario
Ca(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de calcio
Ce(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de cerio
Co(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de cobalto
Cu(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato cobre
Dy(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de disprosio
Eu(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de europio
Fe(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de hierro
In(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de indio

Abreviatura	Nombre completo
La(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de lantano
Mg(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de magnesio
Mn(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de manganeso
Ni(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de níquel
Sm(III)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de samario
Sr(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de estroncio
Zn(II)-EDTA	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético, quelato de cinc
CyDTA	Ácido trans-1,2-diaminociclohexano-N,N,N',N'-tetraacético, monohidrato
DHEG	N,N-bis(2-hidroxietil)glicina
DTPA-OH	Ácido 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-N,N,N',N'-tetraacético
DTPA	Ácido 1,3-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético
EDDA	Ácido etilendiamina-N,N'-diacético
EDDP	Diclorhidrato de ácido etilendiamina-N,N'-dipropiónico
EDDPO	Ácido etilendiamina-N,N'-bis(metilenfosfónico), hemihidrato
EDTA-OH	Ácido N-(2-hidroxietil)etilendiamina-N,N',N'-triacético
EDTPO	Ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraquis(metilenfosfónico)
EGTA	Ácido O,O'-bis(2-aminoetil)etilenglicol-N,N,N',N'-tetraacético
HBED	Ácido N,N'-diacético
HDTA	Ácido 1,6-hexametilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético
HIDA	Ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético
IDA	Ácido iminodiacético
Metil-EDTA	Ácido 1,2-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético
NTA	Ácido nitrilotriacético
NTP	Ácido nitrilotripropiónico
NTPO	Ácido nitrilotris(metilenfosfónico), sal trisódica
O-Bistren	Hexabromhidrato de 7,19,30-trioxa-1,4,10,13,16,22,27,33-octabicyclo[11,11,11]pentatricontano
TTHA	Ácido trietilentetramina-N,N,N',N'',N''',N''''-hexaacético

Además, como varios anticoagulantes tienen actividad quelante similar y, por tanto, antimicrobiana, el uso de al menos un anticoagulante que es EDTA y opcionalmente anticoagulantes adicionales tales como EGTA, heparina, urocinasa, estreptocinasa, heparina de bajo peso molecular, enoxaparina, cumarina de sodio, indanodiona, anisindiona, warfarina, sulfato de protamina, antitrombina III, ácido nitrilotriacético, tartrato de potasio y sodio, D-tartrato de potasio e hidrógeno, sal dipotásica de ácido L-tartárico, sal disódica de ácido L-tartárico, sal monosódica de ácido L-tartárico, tris(carboximetil)amina, warfarina, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, indometacina, prostaglandinas, sulfpirazona, estreptocinasa, urocinasa, activador de plasminógeno tisular, cumarina, sulfato de protamina, antitrombina III, cumadina, proteína C/proteína S, nicumalona, fenprocumina, hirudina, hirulog, o glucosaminoglucanos, etc., también se contemplan en la presente invención. Además, pueden encontrarse quelantes adicionales, anticoagulantes y/o agentes adicionales útiles en la práctica de la presente invención en la patente de Estados Unidos 5 688 516.

D. Alcoholes

Se contempla que las soluciones de purgado de la presente invención comprenden al menos un alcohol, tal como un alcohol antiséptico o desinfectante, que es etanol. Alcoholes ejemplares adicionales incluyen metanol, isopropanol, alcohol bencílico, clorobutanol, alcohol fenilético, 2-bromo-nitropropano-1,3-diol y similares. La presente invención emplea una concentración final de alcohol en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v), preferiblemente en el intervalo de un 15 % a un 40 %, más preferiblemente en el intervalo de un 20 % a un 30 %, siendo la más preferible aproximadamente un 25 %. Por tanto, la concentración más preferida de alcohol incluirá un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 % o un 45 % (v/v) del alcohol en la preparación de las presentes soluciones antimicrobianas. Esto incluye el uso de concentraciones intermedias de alcohol tales como un 11 %, un 22,5 %, un 26 % y similares.

Los alcoholes tales como etanol se conocen desde hace tiempo por tener propiedades desinfectantes. En el documento EP 1245247 y la patente de Estados Unidos 6 350 251, se informa de que la combinación de etanol con

EDTA proporciona un bloqueo biocida para dispositivos médicos permanentes. Por el contrario, también se ha demostrado que una combinación de etanol con EDTA es menos eficaz en eliminar microbios que el etanol en solitario (Sherertz *et al.*, 2002). Por tanto, la técnica está en constante cambio acerca de la función exacta de la combinación de etanol con EDTA.

5 El autor de la presente invención ha demostrado que el etanol en solitario, aunque requiere únicamente una duración relativamente corta de contacto, es parcialmente eficaz únicamente en la eliminación o control de microbios sobre la superficie de un dispositivo médico permanente u otra superficie. Por el contrario, una combinación de un agente antimicrobiano y un quelante tal como EDTA puede ser eficaz, aunque requiere una duración algo más larga de contacto (por ejemplo, a veces del orden de 4 horas). Sin embargo, en la presente invención se demuestra que la combinación triple de un alcohol, un antimicrobiano y un quelante/anticoagulante, como se define en las reivindicaciones, proporciona propiedades antimicrobianas inesperadamente eficaces en una duración muy corta y además de erradicar los microbios rápidamente de una superficie también evita que vuelva a crecer el patógeno microbiano en la superficie. Una ventaja adicional de la combinación triple, como se muestra en los estudios expuestos en este documento a continuación, es que es eficaz en erradicar una gama más amplia de organismos microbianos (bacterias y hongos), incluso a las duraciones más cortas de contacto con la superficie tratada.

E. Agentes adicionales

20 También se contempla que cualquier ingrediente farmacológicamente activo adicional o agente de esterilización puede estar comprendido en las soluciones de la presente invención o puede usarse por separado para purgar o tratar los dispositivos de la presente invención para reducir adicionalmente o eliminar los microbios y virus patógenos. Los ingredientes farmacológicamente activos típicos incluyen agentes antifibrina, agentes antitrombóticos y agentes antiinflamatorios. Los agentes antiinflamatorios incluyen esteroides y agentes antiinflamatorios no esteroideos y salicilatos. Los fármacos antitrombóticos que incluyen ácido acetilsalicílico, dipiridamol, heparina, ibuprofeno, indometacina, prostaglandinas, sulfpirazona, warfarina, enzimas trombolíticas tales como estreptocinasa, urocinasa o activador de plasminógeno. También pueden usarse agentes que forman complejos tales como ditiocarbonato de amonio-1-pirrolidina. Sin embargo, los ejemplos anteriores no pretenden ser limitantes.

30 En determinadas aplicaciones, será suficiente proporcionar un único ingrediente farmacológicamente activo en el dispositivo. En otras situaciones, será deseable combinar ingredientes compatibles. Por ejemplo, puede demostrarse que es útil proporcionar un agente antimicrobiano junto con un anticoagulante y/o un agente antiinflamatorio. En otro ejemplo, puede demostrarse que es útil proporcionar múltiples agentes antimicrobianos con diferentes especificidades de diana, modos de acción o duración, en solitario o en combinación con anticoagulantes o agentes antiinflamatorios.

F. Envasado y kits

40 En este documento se describen diversas técnicas de envasado que pueden emplearse en proporcionar las soluciones de purgado de la invención como parte de un kit disponible en el mercado. El kit incluirá opcionalmente un prospecto de instrucciones para identificar la manera en que usar el kit.

45 Los kits descritos en esta sección comprenden una solución que comprende minociclina como antibiótico, EDTA como quelante/anticoagulante y etanol. El kit puede comprender uno o dos o tres o más compartimentos. Los componentes del kit pueden proporcionarse en compartimentos diferentes o en el mismo compartimento. Los componentes del kit pueden proporcionarse por separado o mezclados. Los componentes mezclados pueden contener dos o más agentes tales como el antibiótico, el quelante/anticoagulante o etanol, o componente adicional.

50 Una de las opciones de envasado a continuación mantiene los ingredientes, por ejemplo, el antibiótico minociclina y el agente quelante/anticoagulante que es EDTA, en una forma no combinada. Estos componentes tienen que combinarse poco antes de su uso. Estas opciones de envasado se contemplan como parte de un sistema de recipiente de 2 compartimentos o tres compartimentos para proporcionar un volumen total de aproximadamente 3 ml de la preparación lista para su uso. Cualquier sistema de recipiente compartimentado puede usarse para envasar las composiciones de la presente invención. Un sistema de recipiente ejemplar está disponible en Becton Dickinson.

55 **Opción 1:** Un sistema de 3 compartimentos que comprende dos componentes secos tales como 3-9 mg de minociclina (seca), 10-100 mg de EDTA (en polvo) y un componente húmedo que comprende 3 ml de diluyente (alcohol en solitario o diluido en solución salina o agua destilada). Cuando están listos para su uso, los componentes secos, minociclina y EDTA, se permitirá que se mezclen con el diluyente. La concentración final de la mezcla debe ser de aproximadamente 3 mg/ml de minociclina y 30 mg/ml de EDTA.

60 **Opción 2:** Un sistema de 2 compartimentos de antibiótico y quelante/anticoagulante (uno húmedo, uno seco) que comprende, por ejemplo, 3-9 mg/ml de minociclina y 10-100 mg de EDTA. Cuando está listo para su uso, el EDTA seco en polvo se combinará con la minociclina en solución. La minociclina puede suspenderse en solución salina, agua destilada, solución alcohólica u otro diluyente fisiológicamente aceptable. Como alternativa la minociclina

puede estar en una forma seca en polvo y el EDTA en solución. Puede usarse un sistema de recipiente de doble cámara wet/wet®, disponible en Becton-Dickinson, en estas aplicaciones.

Opción 3: Un sistema de 2 compartimentos que comprende ambos compartimentos húmedos que comprenden agente(s) antimicrobiano(s) y quelante/anticoagulante que comprende en un ejemplo solución de 10-100 de EDTA y solución de 3-9 mg/ml de minociclina donde la solución comprende alcohol. Cuando está lista para su uso, la solución de EDTA se combinará con la solución de minociclina. Una vez combinadas, la solución tendrá una concentración de 3 mg/ml de minociclina y 30 mg/ml de EDTA. Puede usarse un sistema de recipiente de doble cámara wet/wet®, disponible en Becton-Dickinson en estas aplicaciones.

Opción 4: Un sistema de 2 compartimentos que comprenden ambos polvos secos del agente(s) antimicrobiano(s) y quelante/anticoagulante en un diluyente que comprende, por ejemplo, 10-100 de EDTA (seco) y 3-9 mg de minociclina (seca) y solución diluyente. El EDTA seco y la minociclina seca pueden suspenderse en una solución del alcohol preparada en solución salina, agua destilada u otro diluyente fisiológicamente aceptable. Puede usarse un sistema de doble recipiente liquid/dry®, de Becton-Dickinson. Cuando está listo para su uso, la minociclina seca en polvo se permitirá que se combine con la solución de EDTA. El EDTA puede suspenderse en solución salina o agua destilada, o solución alcohólica u otro diluyente fisiológicamente aceptable.

Las diversas realizaciones compartimentadas de la presente invención como se divulgan anteriormente, pueden proporcionarse en una forma de kit. Dichos kits incluirían un medio de contención que comprende un volumen de diluyente, que comprende el alcohol opcionalmente diluido si se requiere en una solución tal como solución salina o agua estéril, un segundo (o más) medio de contención que comprende uno o más agentes antimicrobianos o biocidas, un tercer (o más) medio de contención que comprende uno o más agentes quelantes/anticoagulantes. Los componentes secos pueden mezclarse opcionalmente en un compartimento. La adición del diluyente entonces se realizaría inmediatamente antes de su uso.

El medio de contención de los kits en general incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio de contención, en que puede colocarse el agente antimicrobiano/quelante/anticoagulante/alcohol y, preferiblemente, dividirse en alícuotas adecuadamente. Cuando se proporciona un segundo o tercer agente antibiótico, otro quelante, alcohol o componente adicional, el kit también contendrá en general un segundo, tercer u otro recipiente adicional en que puede colocarse el componente. Los kits de la presente invención típicamente incluirán un medio para contener el alcohol, agente antimicrobiano, quelante/anticoagulante y cualquier otro recipiente de reactivo en estrecho confinamiento para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado, o de vidrio en que se retienen los viales deseados.

G. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos siguientes representan técnicas descubiertas por el autor de la invención que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtener un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1

Reducción y/o erradicación de microbios usando el modelo de dispositivo de Robbins modificado

Modelo *in vitro* de colonización (dispositivo de Robbins modificado). El modelo *in vitro* utilizó un dispositivo de Robbins modificado (MRD) para estudiar la colonización de segmentos de catéter con organismos incluidos en biopelícula. El dispositivo de Robbins modificado se ha descrito previamente (Nickel *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1987, véase también la patente de Estados Unidos 5 362 754) y se construye a partir de un bloque acrílico, de 42 cm de largo con una luz de 2 X 10 mm. Consiste en 25 tapones de muestra espaciados uniformemente, cada uno conectado a un segmento de catéter de silicona (Allegiance Healthcare Corp., McGaw Park, IL) cuya superficie anterior (0,3 cm²) entre en contacto con el infundido purgado. Después de colocar los segmentos de catéter en el tapón de muestra del dispositivo de Robbins modificado, el aparato completo se esterilizó con gas usando óxido de etileno. Se conectó 500 ml de dextrosa al 5 % en agua (D₅ 5 %/W) al dispositivo de Robbins modificado a través de un equipo de administración con tubos intravenosos y se infectó posteriormente con un inóculo de 10⁸ UFC/ml de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), para producir un infundido infectado a la concentración de 2 X 10⁵ UFC/ml. Los aislados de *S. aureus* que producen biopelícula se obtuvieron de pacientes con CRBSI. En otra serie de experimentos, se infectó una bolsa de 500 ml de D₅ 5 %/W con *C. parapsilosis* productora de biopelícula usando un inóculo de 10⁵ UFC/ml para producir un infundido infectado a una concentración de 2 X 10² UFC/ml de *C. parapsilosis*. El sistema completo se incubó a 37 °C y el infundido infectado se purgó a través del MRD usando una bomba peristáltica que permite que el infundido fluya a una tasa de 60 ml/h durante 8 horas. El dispositivo de Robbins modificado se dejó incubando durante un total de 18 horas (otras 10 horas). Posteriormente, la bolsa infectada se retiró y una bolsa estéril de solución salina de 250 ml que se infundió a través del MRD a 125 ml/h

durante 2 horas para retirar todos los organismos de flotación libre. Para asegurar la formación de biopelícula, al menos tres segmentos de catéter se retiraron aleatoriamente de los 25 segmentos de catéter espaciados uniformemente en el MRD y se estudiaron por microscopia electrónica de barrido. Esto se repitió para cada organismo ensayado.

5 **Exposición a anticoagulantes/antimicrobianos.** Los segmentos de catéter restantes se retiraron y cada segmento se puso en un tubo que contenía 2 ml de una de las siguientes soluciones de caldo: (1) caldo de Mueller-Hinton (Becton Dickinson & Co., Cockeysville, MD); (2) EDTA a una concentración de 30 mg/ml en caldo (Abbott Laboratories, North Chicago, IL); (3) minociclina a 3 mg/ml en caldo (Wyeth-Ayerst Laboratories, Collegeville, PA);
10 (4) combinación de minociclina (3 mg/ml) y EDTA (M-EDTA) en caldo; (5) solución de etanol (EtOH) al 25 % en caldo; (6) minociclina a 3 mg/ml en solución de etanol al 25 % en caldo; (7) EDTA 30 mg/ml en solución de etanol al 25 % en caldo; y (8) M-EDTA en solución de etanol al 25 % en caldo. Los experimentos se repitieron por triplicado o cuadruplicado, y durante cada experimento, se expusieron 2-5 segmentos de catéter a la misma solución durante solamente 15 minutos a 37 °C. Posteriormente, algunos de los segmentos de catéter se retiraron inmediatamente y se cultivaron por sonicación de raspado. Otros segmentos de catéter alternos se retiraron, se colocaron en caldo (TSB), se incubaron durante 24 horas y después se cultivaron por sonicación de raspado. Esta atapa añadida de reincubación de los segmentos de catéter en caldo después de la exposición de 15 minutos se hizo para determinar si estos agentes suprimían el crecimiento de organismos incluidos en biopelícula o los erradicaban. La superficie del segmento de catéter que se expuso al infundido infectado se raspó con una varilla aplicadora de madera estéril y se colocó, junto con la varilla, en un tubo que contenía 0,5 ml de caldo de soja con triptona. Los tubos se sonicaron durante cinco minutos; se pipeteó 0,1 ml de la solución de caldo sonicada en el tubo y se sembró en placa sobre una placa de agar con sangre, que se incubó a 37 °C durante 24 horas. Las placas de agar se comprobaron para cualquier contaminante. Los organismos aislados tenían que ser de la misma especie y morfología de colonia que el organismo original usado para infectar el infundido. El número de colonias cuantificadas de la placa de agar se multiplicó por cinco para corregir el factor de dilución y para determinar el número total de colonias aisladas de un segmento de catéter particular. Se calculó un crecimiento confluyente de 100 o mayor como ≥ 500 colonias.

15 **Definiciones.** La actividad inhibitora o supresión se define como ausencia de crecimiento de organismos microbianos inmediatamente después de 15 minutos de exposición a la solución antimicrobiana. Sin embargo, se observó nuevo crecimiento de los organismos después de 24 horas de incubación en caldo.

La erradicación se define como ausencia de crecimiento de organismos después inmediatamente de 15 minutos de exposición a la solución antimicrobiana son posterior crecimiento tras reincubación durante 24 horas en caldo.

35 **Resultados**

Como se muestra en la tabla 2, el EDTA en solitario no logró erradicar los organismos *S. aureus* resistente a meticilina y *C. parapsilosis* incluidos en biopelícula después de 15 minutos de exposición, lo que provoca nuevo crecimiento después de 24 horas de incubación de los segmentos de catéter en solución de caldo. La minociclina en solitaria (a una concentración de 3 mg/ml) con o sin EDTA provocó alguna disminución en la colonización. Sin embargo, los organismos siguieron crecimiento después de 15 minutos de exposición y después de 24 horas de reincubación en caldo a 37 °C. Una solución de etanol al 25 % suprimía el crecimiento inicialmente hasta un nivel medio de concentración de 138 unidades formadoras de colonias (UFC). Sin embargo, tras la reincubación en caldo a 37 °C durante 24 horas, hubo remultiplicación y crecimiento completos de los organismos estafilococos incluidos en biopelícula hasta un alto nivel de 500 UFC por segmento de catéter, lo que es comparable con el crecimiento de segmentos de catéter de control. La combinación de EDTA y solución de etanol al 25 % provocó una disminución significativa en la colonización inmediatamente después de 15 minutos de exposición a esta solución. Sin embargo, se produjo nuevo crecimiento después de reincubación en solución de caldo a 37 °C durante 24 horas adicionales. La minociclina en etanol al 25 %, con o sin EDTA, provocó erradicación completa de microorganismos incluidos en biopelícula después de 15 minutos de exposición a las soluciones. Además, la reincubación de los segmentos de catéter en caldo durante 24 horas adicionales a 37 °C no permitió el nuevo crecimiento de los organismos, verificando la erradicación completa de los organismos *S. aureus* incluidos en biopelícula.

Tabla 2: Modelo de MRSA en dispositivo de Robbins modificado

Combinación de fármacos ensayada	15 minutos en fármaco Media de UFC de MRSA	24 h de crecimiento después de 15 min en fármaco Media de UFC de MRSA
3 mg/ml minociclina	323,7 ± 199,0	308,3 ± 151,1
30 mg/ml EDTA	479,6 ± 44,9	500,0 ± 0,0
EtOH al 25 % en MHB	138,0 ± 193,8	500,0 ± 0,0
3 mg/ml minociclina / 30 mg/ml EDTA	295,0 ± 182,0	170,8 ± 149,1
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA	25,8 ± 63,5	333,9 ± 234,9

Combinación de fármacos ensayada	15 minutos en fármaco Media de UFC de MRSA	24 h de crecimiento después de 15 min en fármaco Media de UFC de MRSA
EtOH al 25 % / 3 mg/ml minociclina	0	0
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA / 3 mg/ml minociclina	0	0
Control (caldo MH en solitario)	440,3 ± 113,4	500,0 ± 0,0

Como se muestra en la tabla 3, el EDTA en solitario, la minociclina en solitario y el M-EDTA no lograron erradicar organismos *C. parapsilosis* incluidos en biopelícula. Una solución de etanol al 25 % con o sin minociclina, inhibió el crecimiento de *C. parapsilosis* después de 15 minutos de exposición. Sin embargo, se apreció nuevo crecimiento después de 24 horas de incubación en caldo. El EDTA en etanol al 25 % y el M-EDTA en etanol al 25 % erradicaron completamente *C. parapsilosis* en biopelícula después de 15 minutos de exposición son nuevo crecimiento después de incubación en caldo.

Tabla 3: Modelo de *Candida parapsilosis* en dispositivo de Robbins modificado

Combinaciones de fármacos ensayadas	15 minutos en fármaco Media de UFC de <i>C. parapsilosis</i>	24 h de crecimiento después de 15 minutos en fármaco Media de UFC de <i>C. parapsilosis</i>
3 mg/ml minociclina	138,3 ± 111,8	500,0 ± 0,0
30 mg/ml EDTA	160 ± 78,8	500,0 ± 0,0
EtOH al 25 % en MHB	0	142,9 ± 225,9
3 mg/ml minociclina / 30 mg/ml EDTA	152,5 ± 161,3	500,0 ± 0,0
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA	0	0
EtOH al 25 % / 3 mg/ml minociclina	0	83,3 ± 186,3
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA / 3 mg/ml minociclina	0	0
Control (caldo MH en solitario)	500,0 ± 0,0	500,0 ± 0,0

La minociclina en solitario, el EDTA en solitario o la combinación de minociclina y EDTA no lograron erradicar organismos incluidos en biopelícula después de una rápida exposición de únicamente 15 minutos. La solución de etanol al 25 % tampoco logró erradicar organismos incluidos en biopelícula y fue evidente un alto nivel de nuevo crecimiento después de reincubar los segmentos de catéter en caldo ruante 24 horas adicionales a 37 °C.

La combinación de etanol/EDTA no consiguió inhibición o supresión de organismos incluidos en biopelícula después de 15 minutos de exposición de las superficies de catéter a esta solución. Sin embargo, se apreció nuevo crecimiento tras reincubación de los segmentos de catéter en caldo durante 24 horas a 37 °C. La combinación de EDTA/etanol al 25 %, sin embargo, fue superior en su actividad inhibidora en comparación con etanol al 25 % en solitario.

La combinación de minociclina en etanol al 25 % con o sin EDTA fue muy activa en erradicar organismos incluidos en biopelícula después de 15 minutos de exposición a esta combinación. Se produjo nuevo crecimiento de *C. parapsilosis* ocasionalmente después de exposición a minociclina en etanol al 25 %. No se produjo nuevo crecimiento después de exposición a M-EDTA en etanol al 25 %, lo que verifica la erradicación completa de organismos *S. aureus* incluidos en biopelícula después de rápida exposición a esta combinación triple.

Como el EDTA tiene actividad anticoagulante y, en estos experimentos, parece haberse añadido a la actividad antimicrobiana del etanol al 25 %, fue prudente usar la combinación triple de minociclina/EDTA en etanol al 25 % como una solución de purgado o bloqueo antibiótico de catéteres venosos centrales. Por el contrario, la vancomicina en solitario o en combinación con heparina no logró erradicar organismos microbianos incluidos en biopelícula de las superficies de catéter, incluso después de un tiempo de permanencia de 4-24 horas (véase la patente de Estados Unidos 5 362 574, columnas 11 y 12, tablas 3, 4 y 5).

Ejemplo 2

Ensayo de M-EDTA en etanol al 25 % usando el modelo *in vitro* de colonización bioprotésica de disco de silicona

El auto de la invención a continuación determinó la eficacia de la combinación de minociclina y EDTA en etanol al 25 % en la erradicación de estafilococos y *Candida* incluidos en biopelícula. La prevención del nuevo crecimiento después de reincubación se evaluó usando un modelo novedoso de colonización bioprotésica de disco de silicona. El procedimiento se describe a continuación.

5

Procedimiento experimental

En el día 1, se prepararon fragmentos de biopelícula. Se colocaron discos de silicona estériles (esterilizados con gas de óxido de etileno) en tubos Falcon estériles de 5 ml con tapa a presión y se añadieron 0,5 ml de plasma combinado. Esto estuvo seguido de incubación (con balanceo) durante una noche a 37 °C.

10

En el día 2, se añadieron las bacterias para formar la biopelícula. Usando pipetas de transferencia de plástico estériles, se succionó el plasma de los tubos y se reemplazó con 0,5 ml de inóculo bacteriano (50 ml de caldo Mueller-Hinton que contenía 4-5 colonias de bacterias recién cultivadas). Los tubos se incubaron durante una noche a 37 °C.

15

En el día 3, se añadió un fármaco en un intento por destruir las bacterias. Antes de la adición del fármaco, los segmentos se lavaron en 0,5 ml de solución salina al 0,9 % para retirar cualquier bacteria planctónica. Los tubos (que contenían los discos de biopelícula y solución salina) se colocaron en la estufa de incubación a 37 °C durante 30 minutos. La solución salina entonces se pipeteó usando pipetas de transferencia de plástico estériles (teniendo cuidado de no alterar los segmentos demasiado). Los discos de silicona entonces se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 5 ml con tapa a presión que contenían 0,5 ml de la solución de fármaco a ensayar. Las soluciones de fármaco ensayadas fueron las siguientes: (1) minociclina 3 mg/ml; (2) EDTA 30 mg/ml; (3) solución de etanol al 25 %; (4) EDTA 30 mg/ml en etanol al 25 %; (5) minociclina 3 mg/ml en etanol al 25 %; (6) minociclina 3 mg/ml con EDTA 30 mg/ml; y (7) combinación triple de minociclina 3 mg/ml y EDTA 30 mg/ml en solución de etanol al 25 %. Se permitió que los discos se asentaran en el fármaco durante 1 hora. El fármaco entonces se succionó usando una pipeta de transferencia de plástico. Los segmentos se lavaron una vez más con 0,5 ml de solución salina (añadida, y agitada durante 30 segundos). Los discos entonces se transfirieron a tubos Falcon de 15 ml con tapa a presión que contenían 5 ml de solución salina al 0,9 %. Los segmentos se sonicaron durante 5 minutos, y después se agitaron con vórtice durante 30 segundos. Después se sembraron en placa 100 microlitros (µl) de la solución salina en una placa de agar con sangre TSAII a temperatura ambiente, y se extendieron uniformemente usando una espátula de vidrio estéril. Las placas se incubaron durante una noche a 37 °C.

20

25

30

Para los estudios de reincubación de 24 horas, se prepararon fragmentos de biopelícula exactamente de la misma manera que los segmentos normales. Antes de añadir el fármaco, los segmentos se lavaron en 0,5 ml de solución salina al 0,9 % para retirar cualquier bacteria planctónica. Los tubos (que ahora contienen los discos de biopelícula y solución salina) se colocaron en la estufa de incubación a 37 °C durante 30 minutos. La solución salina entonces se pipeteó usando pipetas de transferencia de plástico estériles (teniendo cuidado de no alterar los fragmentos demasiado). Los discos de silicona entonces se transfirieron a nuevos tubos Falcon de 5 ml con tapa a presión que contenían 0,5 ml del fármaco a ensayar. Se permitió que los discos se asentaran en el fármaco durante 15 minutos. El fármaco entonces se succionó usando una pipeta de transferencia de plástico. Los fragmentos se lavaron una vez más con 0,5 ml de solución salina (añadida, y agitada durante 30 segundos). Los segmentos entonces se transfirieron a nuevos tubos Falcon estériles de 5 ml con tapa a presión que contienen 0,5 ml de caldo de soja con triptona (TSB) estéril y después se colocaron en la estufa de incubación a 37 °C durante una noche.

35

40

45

En el día 4, se contaron las colonias y se registraron los resultados. Las colonias se contaron a mano, y el recuento se detuvo en 100 colonias. Cualquier recuento mayor se consideró >100 colonias. Los recuentos se registraron, y se multiplicaron por un factor de 50 a causa del factor de dilución entre los 5 ml de solución salina que contenían el disk y los 100 µl que se sembraron en placas de agar con sangre TSAII. Los segmentos entonces se sonicaron (en el mismo TSB que creció durante una noche) durante 5 minutos. Después se añadieron 100 µl a las placas de agar con sangre TSAII, y las placas se colocaron en la estufa de incubación para cultivo durante una noche a 37 °C.

50

En el día 5, se contaron los fragmentos con nuevo crecimiento. Las colonias se contaron a mano, y el recuento se detuvo en 100 colonias. Cualquier recuento mayor se consideró >100 colonias. Los recuentos se registraron, y se multiplicaron por un factor de 5 a causa del factor de dilución entre los 0,5 ml de TSB que contenía el disk y los 100 µl que se sembraron en placas de agar con sangre TSAII.

55

Resultados

El modelo de colonización bioprotésica de disco de silicona se ha descrito previamente por Kuhn *et al.* (2002). Este modelo *in vitro* es más clínicamente pertinente que el modelo *in vitro* de dispositivo de Robbins modificado, porque permite sumergir segmentos de disco de silicona en suero antes de exponerlos a un elevado inóculo de bacterias u hongos. Además, permite una mayor concentración de adherencia de las bacterias y hongos en el disco de silicona de hasta 5000 UFC/disco (el dispositivo de Robbins modificado permite únicamente 500 UFC/segmento de catéter de látex). A causa del elevado inóculo al que se expusieron los segmentos de disco de silicona en el modelo de colonización bioprotésica, los diversos segmentos de disco se expusieron a los diversos agentes antimicrobianos

60

65

durante una hora (en lugar de 15 minutos en el dispositivo de Robbins modificado). Los resultados fueron coherentes con los hallazgos y observaciones en el modelo de dispositivo de Robbins modificado. Como se muestra en la tabla 4, la exposición a minociclina en solitario o EDTA o etanol, o la combinación de minociclina y EDTA, no logró suprimir la colonización bioprotésica de MRSA de los discos de silicona. El EDTA en etanol al 25 % tuvo algo de supresión parcial, pero hubo nuevo crecimiento de los organismos después de 24 horas de incubación. Como se esperaba, los segmentos de disco de silicona de control estaban muy colonizados antes y después de 24 horas de reincubación. La minociclina en etanol al 25 % fue muy supresora, pero hubo nuevo crecimiento después de 24 horas de incubación. Sin embargo, la combinación triple de M-EDTA en etanol al 25 % fue única en erradicar completamente los organismos MRSA, con inhibición completa de nuevo crecimiento después de 24 horas de incubación.

Tabla 4: Modelo de MRSA de colonización bioprotésica de disco de silicona

Combinaciones de fármacos ensayadas	1 hora en fármaco Media de UFC \pm error típ.	24 h de crecimiento después de 1 hora en fármaco Media de UFC \pm error típ.
3 mg/ml minociclina n = 5	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0
30 mg/ml EDTA n = 5	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0
EtOH al 25 % en MHB n= 10	2900,0 \pm 722,8	5000,0 \pm 0,0
3 mg/ml minociclina / 30 mg/ml EDTA n= 10	5000,0 \pm 0,0	3110,0 \pm 637,6
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA n= 10	730,0 \pm 379,3	2770,0 \pm 785,7
EtOH al 25 % / 3 mg/ml minociclina n= 10	0	85,0 \pm 85,0
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA / 3 mg/ml minociclina n= 10	0	0
Control (caldo MH en solitario) n= 10	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0

La tabla 5 muestra una tendencia similar para *Candida parapsilosis*. La minociclina en solitario, el EDTA en solitario o la combinación de M-EDTA no logró suprimir o erradicar el crecimiento de *Candida parapsilosis* en discos de silicona. Además, hubo fuerte crecimiento nuevo de *C. parapsilosis* en discos de silicona después de exposición a estos agentes y reincubación durante 24 horas. Etanol al veinticinco por ciento en solitario, EDTA en etanol al 25 % o minociclina en etanol al 25 % no lograron suprimir completamente el crecimiento de *Candida parapsilosis* después de una hora de exposición y hubo fuerte crecimiento nuevo después de 24 horas de reincubación. La combinación triple de M-EDTA en etanol al 25 % erradicó completamente los organismos sobre los discos de silicona después de 1 hora de exposición. Además, el nivel de nuevo crecimiento asociado con una combinación triple después de 24 horas de reincubación fue significativamente menor que todos los demás agentes alternativos o su combinación doble.

Tabla 5: Modelo de *Candida parapsilosis* de colonización bioprotésica de disco de silicona

Combinaciones de fármacos ensayadas	1 hora en fármaco Media de UFC de <i>C. parapsilosis</i>	24 h de crecimiento después de 1 hora en fármaco Media de UFC de <i>C. parapsilosis</i>
3 mg/ml minociclina n = 5	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0
30 mg/ml EDTA n = 5	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0
EtOH al 25 % en MHB n= 10	1933 \pm 601,6	3875,0 \pm 618,3
3 mg/ml minociclina / 30 mg/ml EDTA n= 10	4080 \pm 585,0	500,0 \pm 0,0
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA n= 10	1666,7 \pm 629,9	2333,0 \pm 666,7
EtOH al 25 % / 3 mg/ml minociclina n= 10	1490,0 \pm 542,4	5000,0 \pm 0,0
EtOH al 25 % / 30 mg/ml EDTA / 3 mg/ml minociclina n= 10	0	582,9 \pm 264,5
Control (caldo MH en solitario) n= 10	5000,0 \pm 0,0	5000,0 \pm 0,0

Por tanto, los dos modelos *in vitro* de colonización (el dispositivo de Robbins modificado, así como el modelo de colonización bioprotésica de disco de silicona) muestran que la combinación triple es excepcional y altamente eficaz en erradicar organismos incluidos en biopelícula en polímero de látex y silicona con nuevo crecimiento mínimo o ausente después de 24 horas de exposición a la combinación. Estos dos modelos son predictivos de la eficacia clínica de esta combinación triple en erradicar organismos incluidos en biopelícula en catéteres a una temperatura

de 37 °C.

Por tanto, la combinación triple es de eficacia superior a la combinación de minociclina y EDTA, EDTA y etanol o minociclina y etanol.

5 Todas las composiciones y/o métodos y/o aparatos divulgados y reivindicados en este documento pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y/o aparatos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en este documento. Más específicamente, será evidente que determinados agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden sustituirse por los agentes descritos en este documento mientras se consigan los mismos resultados o similares.

15 **Referencias**

Las siguientes referencias pueden proporcionar detalles de procedimiento ejemplares u otros detalles complementarios a los expuestos en este documento.

- 20 Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/261 447
 Solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/316 165
 Solicitud de patente no provisional de Estados Unidos n.º de serie 10/044 842
 Patente de Estados Unidos 5 362 754
 Patente de Estados Unidos 5 688 516
 Patente de Estados Unidos 6 350 251
- 25 Bleyer *et al.*, En: Proceedings of the 4th Decennial International Conference on Nosocomial and Healthcare-Associated Infections in conjunction with the 10th Annual Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America, Atlanta, Georgia, pág. 91, 2000.
 Carratala *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 43:2200-2204, 1999.
 Centers for Disease Control and Prevention, *MMWR*, 51(RR-10), 2002.
- 30 Chatzinikolaou *et al.*, Clin. Infect. Dis., 36(1):116-9 (2003).
 Documento EP1245247
 Evans *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 31(6):889-894, 1987.
 Henrickson *et al.*, J. Clin. Oncol., 18:1269-1278, 2002.
 Kuhn *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 46(6):1773-1780, 2002.
- 35 Kluger *et al.*, En: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Abstracts of the 39th Meeting, 514, 1999.
 Maki *et al.*, En: Hospital Infections. Bennett JV, Brachman PS, eds. Lippincott-Raven, Filadelfia, PA., pág. 689-94, 1998.
 Mermel *et al.*, Clin. Infect. Dis. 32:1249-1272, 2001.
- 40 Nickel *et al.*, Dialogues in Pediatric Urology, 14(10):7-8, 1991.
 Raad *et al.*, J. Infect. Dis. 168:400-407, 1993.
 Raad *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., 46(2):327-332, 2002.
 Raad *et al.*, Arch. Intern. Med. 162:871-878, 2002.
 Reardon *et al.*, Medical Laboratory Sciences, 48:72-75, 1991.
- 45 Sherertz *et al.*, En: Proceedings of the 12th Annual Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America (resumen n.º 52676), Salt Lake City, Utah, 7-9 de abril, 2002.
 Schwartz *et al.*, J. Clin. Oncol., 8:1591-1597, 1990.
 Spafford *et al.*, *MMWR*, 44:1-13, 1994.

REIVINDICACIONES

1. Una solución antimicrobiana que comprende:
 al menos un alcohol que es etanol;
 5 al menos un agente antimicrobiano que es minociclina; y
 al menos un quelante y/o anticoagulante, que es EDTA;
 en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v).
2. La solución de la reivindicación 1, en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10-40 % (v/v).
 10
3. La solución de la reivindicación 1 o 2, en la que la concentración de alcohol está en el intervalo de un 15-30 % (v/v).
4. La solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que la concentración del alcohol es de aproximadamente un 25 % (v/v).
 15
5. Un método para reducir los organismos microbianos de una superficie, que comprende poner en contacto la superficie con la solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 durante una cantidad de tiempo suficiente para reducir los organismos microbianos de la superficie, con la condición de que los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia se excluyan.
 20
6. El método de la reivindicación 5, en el que la superficie es la superficie de un dispositivo médico, catéter permanente, superficie orgánica o superficie inorgánica.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la superficie es la superficie de: un catéter; un tubo endotraqueal; un tubo de nefrostomía; un *stent* biliar; un dispositivo ortopédico; una válvula protésica; un implante médico; dispositivo dentales o implantes dentales; dispositivos de apoyo cardiaco; injertos vasculares; dispositivos de traqueostomía; dispositivos de ventriculostomía; un dispositivo intratecal; un catéter venoso central; un catéter intravenoso periférico; un catéter arterial; un catéter de Swan-Ganz; un catéter de hemodiálisis; un catéter urinario; un catéter peritoneal; un catéter umbilical; un catéter de silicona no tunelizado percutáneo; un catéter venoso central tunelizado con camisa; un acceso venoso central subcutáneo; sutura quirúrgica; la superficie de una tubería o conducto; un suelo; una mesa; un mostrador; equipo hospitalario; o una silla de ruedas; un conducto de aceite; un conducto de agua; una tubería de máquina de hielo; o una tubería para dispensar bebidas.
 25
 30
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que la superficie se pone en contacto con una solución antimicrobiana que comprende al menos un alcohol, al menos un agente antimicrobiano y al menos un quelante.
 35
9. El método de la reivindicación 8, en el que el contacto se realiza durante
 40 (a) 2 horas o menos;
 (b) 1 hora o menos;
 (c) 30 minutos o menos; o
 (d) 15 minutos o menos.
10. La solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en reducir los organismos microbianos de una superficie orgánica, en la que la superficie tiene que ponerse en contacto con la solución durante una cantidad de tiempo suficiente para reducir los organismos microbianos de la superficie.
 45
11. Uso de la solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un medicamento para reducir los organismos microbianos de una superficie orgánica, en el que la superficie tiene que ponerse en contacto con la solución durante una cantidad de tiempo suficiente para reducir los organismos microbianos de la superficie.
 50
12. La solución de la reivindicación 10 o el uso de la reivindicación 11, en el que la superficie se selecciona de piel, superficie de membrana mucosa, una superficie epitelial, una cavidad oral u otra superficie mucosa.
 55
13. Un kit para desinfectar una superficie para reducir los microorganismos de la misma, en el que el kit comprende la solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, estando contenida dicha solución en un recipiente diferente o un único recipiente.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que los componentes están contenidos cada uno en recipientes diferentes.
 60
15. El kit de la reivindicación 13, en el que
 (a) dos componentes están contenidos en un medio de contención adecuado; o
 (b) tres componentes están contenidos en un medio de contención adecuado.
 65
16. El kit de la reivindicación 13, en el que el(los) agente(s) antimicrobiano(s) y/o el quelante está liofilizado o

constituido de otro modo como un polvo seco.

- 5 17. El kit de la reivindicación 16, que comprende además una segunda solución de vehículo para reconstituir el(los) agente(s) antimicrobiano(s) o quelante secos.
18. El kit de la reivindicación 16, que comprende una dosis unitaria liofilizada de una cantidad farmacológicamente eficaz de minociclina y EDTA a mezclar en una solución de etanol.
- 10 19. El kit de la reivindicación 18, en el que la dosis unitaria contiene al menos aproximadamente 9 mg de minociclina y al menos aproximadamente 90 mg de EDTA.
20. El kit de la reivindicación 18, que comprende además una cantidad preseleccionada de una solución de etanol de modo que, cuando la solución de etanol se mezcla con la dosis unitaria liofilizada, la concentración de minociclina es de 3 mg/ml y la concentración de EDTA es de 30 mg/ml.
- 15 21. El kit de la reivindicación 16, que comprende una dosis unitaria liofilizada de una cantidad farmacológicamente eficaz de minociclina y heparina mezcladas en una solución de etanol.
- 20 22. Una jeringa, que comprende una dosis unitaria de una cantidad farmacológicamente eficaz de la solución de la reivindicación 1.
23. Un vial, que comprende una dosis unitaria liofilizada de una cantidad farmacológicamente eficaz de minociclina y EDTA mezcladas en una solución de etanol.
- 25 24. Una solución de bloqueo de dispositivo médico que comprende:
al menos un alcohol que es etanol;
al menos un agente antimicrobiano que es minociclina;
y al menos un quelante y/o anticoagulante, que es EDTA;
30 en la que la concentración del alcohol está en el intervalo de un 10 % a un 45 % (v/v).

EtOH en combinación con M-EDTA como una solución de purgado de 15 minutos

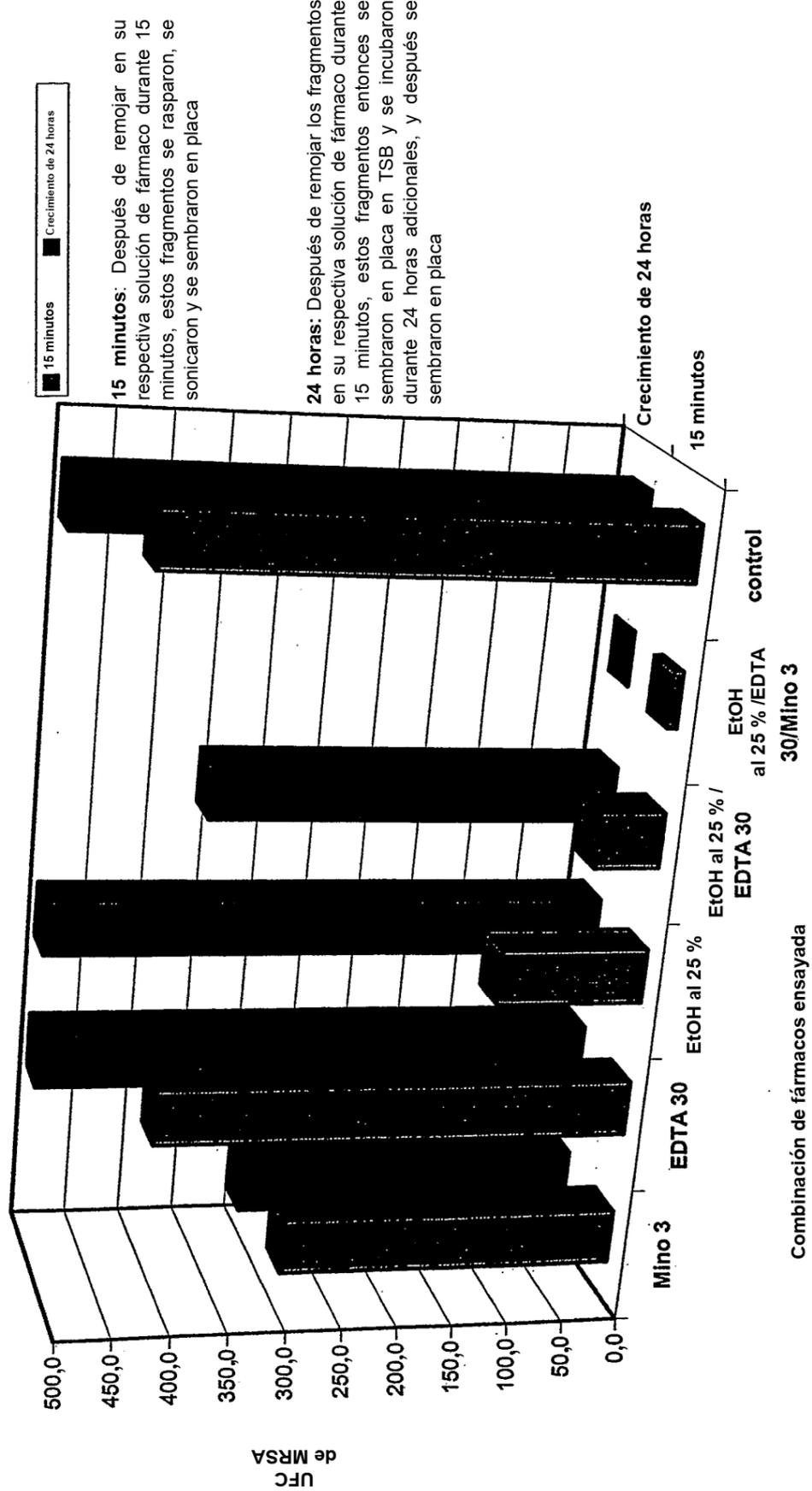


FIG. 1