



**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

**PATENTE DE INVENCION**

PCT

21. EXPEDIENTE No.

05-122742

54. TÍTULO COMPOSICIONES, MÉTODOS Y SISTEMAS ANTISÉPTICOS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 0031/0195

71. SOLICITANTE TYCO HEALTHCARE GROUP LP

DOMICILIO MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDÓÑEZ  
T.P. 2081

22. BOGOTÁ, D. C., DICIEMBRE 2, 2005

000001

**IDENTIFICATION AND NAME CHECK:**

04-01-06.

Capítulo II. 285 1749 142

| Número | Cual |
|--------|------|
| 1      | 1    |
| 2      | 2    |
| 3      | 3    |
| 4      | 4    |
| 5      | 5    |
| 6      | 6    |
| 7      | 7    |
| 8      | 8    |
| 9      | 9    |
| 10     | 10   |
| 11     | 11   |
| 12     | 12   |
| 13     | 13   |
| 14     | 14   |
| 15     | 15   |
| 16     | 16   |
| 17     | 17   |
| 18     | 18   |
| 19     | 19   |
| 20     | 20   |
| 21     | 21   |
| 22     | 22   |
| 23     | 23   |
| 24     | 24   |
| 25     | 25   |
| 26     | 26   |
| 27     | 27   |
| 28     | 28   |
| 29     | 29   |
| 30     | 30   |
| 31     | 31   |
| 32     | 32   |
| 33     | 33   |
| 34     | 34   |
| 35     | 35   |
| 36     | 36   |
| 37     | 37   |
| 38     | 38   |
| 39     | 39   |
| 40     | 40   |
| 41     | 41   |
| 42     | 42   |
| 43     | 43   |
| 44     | 44   |
| 45     | 45   |
| 46     | 46   |
| 47     | 47   |
| 48     | 48   |
| 49     | 49   |
| 50     | 50   |
| 51     | 51   |
| 52     | 52   |
| 53     | 53   |
| 54     | 54   |
| 55     | 55   |
| 56     | 56   |
| 57     | 57   |
| 58     | 58   |
| 59     | 59   |
| 60     | 60   |
| 61     | 61   |
| 62     | 62   |
| 63     | 63   |
| 64     | 64   |
| 65     | 65   |
| 66     | 66   |
| 67     | 67   |
| 68     | 68   |
| 69     | 69   |
| 70     | 70   |
| 71     | 71   |
| 72     | 72   |
| 73     | 73   |
| 74     | 74   |
| 75     | 75   |
| 76     | 76   |
| 77     | 77   |
| 78     | 78   |
| 79     | 79   |
| 80     | 80   |
| 81     | 81   |
| 82     | 82   |
| 83     | 83   |
| 84     | 84   |
| 85     | 85   |
| 86     | 86   |
| 87     | 87   |
| 88     | 88   |
| 89     | 89   |
| 90     | 90   |
| 91     | 91   |
| 92     | 92   |
| 93     | 93   |
| 94     | 94   |
| 95     | 95   |
| 96     | 96   |
| 97     | 97   |
| 98     | 98   |
| 99     | 99   |
| 100    | 100  |

79.143.366 de

**Nacionalidad o Domicilio:** BRITÁNICO Y ESTADOUNIDENSE

**Fecha** Diciembre 16, 2004

## 6 TÍTULO (54) COMPOSICIONES, MÉTODOS Y SISTEMAS ANTISÉPTICOS.

**10459413**

**Fecha MAYO 4 DE 2009**

10

ANEXOS

000002 2

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arie final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros:

11

FIGURA CARACTERISTICA

| Opciones       | Estructura COFA |    | Estructura COFA |    | Estructura COFA |     | Estructura COFA |     | Estructura COFA |     |
|----------------|-----------------|----|-----------------|----|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|
|                | MC              | MC | MC              | MC | MC              | MC  | MC              | MC  | MC              | MC  |
| 201 Estructura | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 21 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 22 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 23 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 24 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 25 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 26 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 27 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 28 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 29 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 30 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 31 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 32 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 33 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 34 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 35 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 36 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 37 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 38 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 39 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |
| 40 Estructura  | 0.1             | 1  | 0.1             | 1  | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 | 0.1             | 0.1 |

12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 99.143.366 de  
Usaquén

T.P. 20.261

7044  
3

0011283

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Adicacion : 05122/42 00000000  
Fecha (AMD) : 2005-12-02 16:59:19  
Remite : 011 PCT-PAYMENT 378 PASE/PCCI 411 PRESENTAC  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 183

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 32,462  
FECHA : MAYO 4 DE 2005

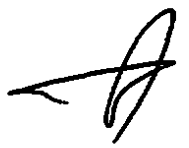
##### CONSIGNACION #####

| DEPOSITANTE           | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | VR. PAGO      |
|-----------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|---------------|
| ALVARO CORREA ORDONEZ | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 37739480 | 04/05/2005 | 96,012,000.00 |

##### CONCEPTO #####

| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 443,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | \$ 443,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS



RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

Traducción del Inglés por Marlen Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia

**APOSTILLA EN PODER DE TYCO HEALTHCARE GROUP LP**

Estado de Massachusetts

William Francis Galvin-

Secretario del Estado

**APOSTILLA**

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América.  
Este documento Público
2. Ha sido firmado por Suzanne E. Gaddy
3. Quien ejerce funciones de notario público
4. Lleva el gran sello de Estado de Massachusetts

**CERTIFICADO**

5. En Boston, Massachusetts. 6. El 27 de junio de 2005
7. Por el Secretario de Estado
8. No. 1077788
9. Gran Sello de Estado de Massachusetts
10. Firma ilegible de William Francis Galvin.  
Secretario de Estado.

**PODER DE REPRESENTACION**

Bilingüe firmada por el Vicepresidente John H. Masterson, el 11 mayo de 2005.

referencia: solicitud de patente PCT/US03 /032514.

**CERTIFICACIÓN NOTARIAL**

Bilingüe, certificando que el Vicepresidente de Tyco Healthcare Group LP es John H. Masterson,

Firmado el 5 de mayo de 2005.

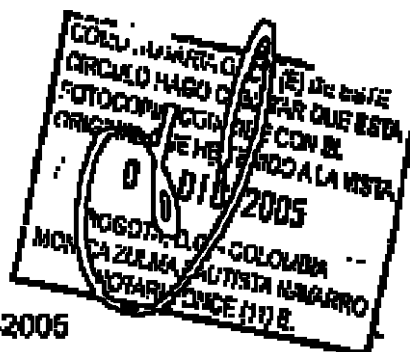
Firma de Notario Publico Suzanne E. Gaddy.

Sello de notario - Suzanne E. Gaddy.

sus funciones vencen el 22 - 3- 2007-

Estado de Massachusetts.

Es traducción conforme con copia para confrontar. Julio 8-2005



*Marlen Neira*  
MARLEN NEIRA CASTRO  
Traductor e Intérprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

*The Commonwealth of Massachusetts*

William Francis Galvin  
Secretary of the Commonwealth

**APOSTILLE**

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

*This public document*

2. has been signed by: Suzanne E. Gaddy

3. acting in the capacity of: Notary Public

4. bears the seal/stamp of: the State of Massachusetts  
whose commission expires on: March 22, 2007

Certified

5. at: Boston, Massachusetts

6. the: 27 June, 2006

7. by: the Secretary of the Commonwealth

8. No.: 1077788

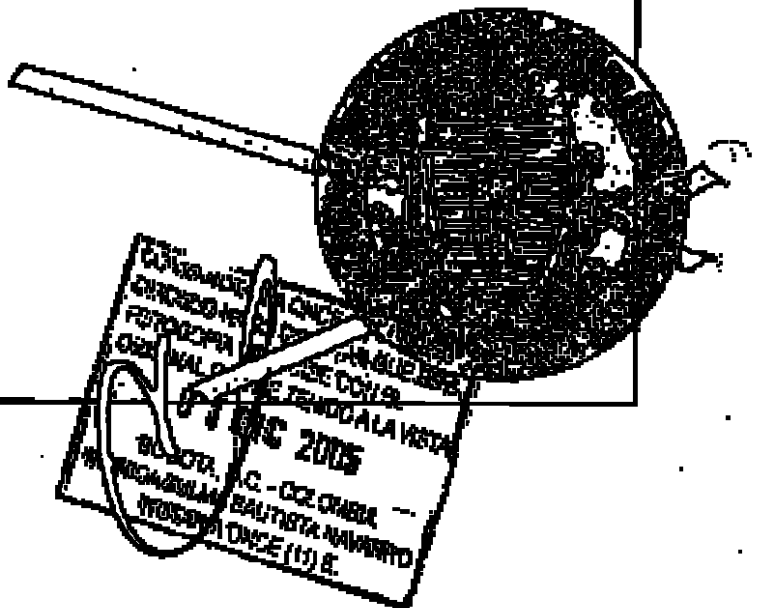
9. Seal/stamp:

*Great Seal of the Commonwealth*

10. Signature:

*William Francis Galvin*

William Francis Galvin  
Secretary of the Commonwealth



000008 6

03/31 '05 16:30

ID:RANSBECK (BLH) JTA COL.

FAC:2762211

PAGE 3

1804K Co.

03/31/05 16:30

Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field  
Boyle, Lora, Washington Field

### POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

**Tyco Healthcare Group LP**  
domiciled in

15 Hampshire St.  
Mansfield, MA 02048 USA  
electronic mail: [tyco@tyco.com](mailto:tyco@tyco.com)

ALVARO CORREA-ORDÓÑEZ under OLGA  
GEORGETTE OTERO under RICARDO NITICE under  
JUAN PABLO DOMENA

with domicile at Av. 52 No. 19 - 52, 1<sup>st</sup> floor, of Bogotá,  
D. C., Colombia, a full and legal owner of authority to  
obtain the protection of PCT/US03/032514  
my (our) industrial property and against the unfair  
competition, for which purpose I (we) authorize the said  
attorneys to represent me (us) before any authorities or  
persons, with or without jurisdiction, especially before  
administrative, administrative-tribunal and judicial, as  
well as before Arbitration Court, in all matters concerning  
the following: a) Objection of patents, utility models,  
industrial designs, integrated circuits, layout-designs and  
topographical maps; the registration of trademarks,  
designations of origin, commercial names, trade  
names, slogans and domain names; the renewal,  
assignments, change of name or domicile, voluntary  
cancellation; and the registration of slogans of any of the  
above rights; b) Proceedings of protection to the consumer,  
unfair competition, opposition, cancellation, nullity,  
provisional injunction, infringement, granting of  
licenses, null mandamus, the protection of trade secrets,  
and in general the civil, penal, or administrative  
proceedings relating to these rights. And that in all the  
above matters they may exercise this Power of Attorney,  
compromise, concede, defend the facts of the case,  
defend, accept, receive, refuse, and ratify acts done by  
representative without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this  
company by the aforementioned attorneys with respect to  
the mentioned matter.

### PODERE

La abajo firmada,  
**Tyco Healthcare Group LP**  
domiciliada en 15 Hampshire St.

15 Hampshire St.

Mansfield, MA 02048 USA

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDÓÑEZ under OLGA GEORGETTE  
OTERO under RICARDO NITICE under JUAN PABLO  
DOMENA

con domicilio en la Av. 52 No. 19 - 52 Piso 1 de Bogotá D. C.,  
Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la  
protección de PCT/US03/032514  
mi (nuestro) propiedad industrial y contra la competencia  
desleal, a cuyo efecto autorizo (autorizamos) a los dichos apoderados  
para que (nos) representen ante cualquier autoridad o  
persona, judicial o no jurisdicción, especialmente ante las del  
orden administrativo, administrativo-tribunal y judicial, así  
como las de Arbitraje, en todo lo concerniente a  
los siguientes asuntos: a) Objeción de patentes de invención,  
modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de layout  
de circuitos integrados y unidades vegetales; el registro de  
marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales,  
señales, lemas comerciales y lemas de diseño; su  
renovación, cesación, cambio de nombre o domicilio,  
cancelación voluntaria; y el registro de slogans de cualquiera  
de las anteriores; b) Los procesos para la protección del consumidor,  
competencia desleal, oposición, cancelación, nulidad,  
infracción provisional, injerencia, concesión de licencias, la  
defensa, la protección de secretos industriales, y en general  
procesos civiles, penales, administrativos relacionados con  
estas materias. Y para que en todos los asuntos antes  
mencionados, puedan realizar todo mandado, transigir, ceder,  
defender los hechos del caso, defender, aceptar, recibir, renunciar  
y ratificar los actos de quienes obren.

Quiero ratificar todos los actos anteriormente mencionados en los  
materiales presentados, por cualquiera de los mencionados  
apoderados en representación de esta sociedad.

  
John H. Masterson, Vice President

Dated and subscribed in

Mansfield, MA

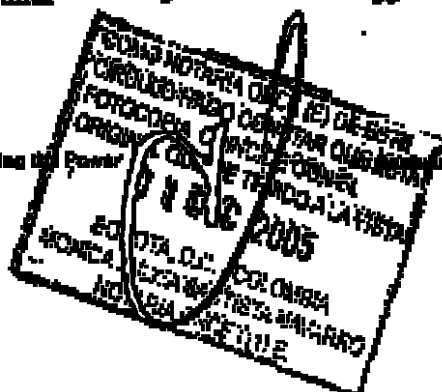
On the 11<sup>th</sup> day of May of 2005

Given and signed in

Mansfield, MA

At the 11<sup>th</sup> day of May of 2005

Signature of the person issuing the Power of Attorney to the person who signs the Power







## (12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property  
Organization  
International Bureau



INTERNATIONAL PATENT COOPERATION TREATY

(43) International Publication Date  
16 December 2004 (16.12.2004)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2004/108093 A2

(51) International Patent Classification<sup>4</sup>

A61K

(21) International Application Number:

PCT/US2004/018093

(22) International Filing Date: 4 June 2004 (04.06.2004)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60476,274

4 June 2003 (04.06.2003)

US

10629,413

10 September 2003 (09.09.2003)

US

(71) Applicant (for all designated States except US): ABBVOTTICA, INC. (US/US); 4603 N.E. University Village, No. 183, Seattle, WA 98105 (US).

(72) Applicants and

(72) Inventors: KITT, Peter (GB/GB); 48 King George Avenue, Lewis Vale, Wrexham, L27 4NP (GB); PATTON, David (US/US); 4603 N.E. University Village, No. 183, Seattle, WA 98105 (US).

(74) Agents: RATTAT, Janet et al.; Spackman Law Group, 1301 Western Avenue, Suite 100, Seattle, WA 98101 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AT, AU, A1, AM, AL, AR, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CZ, CU, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI, FR, GB, GR, GU, HK, HN, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PA, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SV, TH, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(86) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TT, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CH, CI, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(Continued on next page)

(84) Title: ANTIHERPOTIC COMPOSITIONS, METHODS AND SYSTEMS

| OpenCite ID           | Diagnosis EPTA |     | Diagnosis EPTA |     | Diagnosis EPTA |      | Diagnosis EPTA |      | Diagnosis EPTA |      |
|-----------------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
|                       | MIC            | MBC | MIC            | MBC | MIC            | MBC  | MIC            | MBC  | MIC            | MBC  |
| 104 Symp. composition | <0.1           | 1   | <0.1           | 1   | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 11 Symp. composition  | <0.1           | 1   | <0.1           | 1   | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 102 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 1   | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | 10   |
| 103 Symp. system      | <0.1           | 10  | <0.1           | 1   | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | 10   |
| 104 Symp. system      | <0.1           | 10  | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 105 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 106 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 107 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 108 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 109 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 110 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 111 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 112 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 113 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 114 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 115 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 116 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 117 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 118 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 119 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |
| 120 Symp. system      | <0.1           | 1   | <0.1           | 10  | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 | <0.1           | <0.1 |

(57) Abstract: Antiviral compositions comprising at least one unit of NTA are disclosed. These compositions have broad spectrum antiviral and antifungal activity together with antiseptic properties. The antiviral compositions also have demonstrated activity in generating and breaking down microbial films, or biofilms. They are safe for human and medical uses, and may be used to prevent infection, or to reduce the proliferation of and/or eliminate existing or established infections.

WO 2004/108093 A2



For non-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

000015 10

1                   **ANTISEPTIC COMPOSITIONS, METHODS AND SYSTEMS**

**Technical Field of the Invention**

          The present invention relates to antiseptic compositions, methods and systems for  
10 use in various medical applications, as well as sanitizing applications in general,  
including industrial and environmental sanitizing applications. Compositions of the  
present invention possess antimicrobial, anti-fungal, anti-viral and anti-amoebic  
properties and may also serve as anti-coagulants. Specified salts and compositions of  
ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ( $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$ ) are employed at specified  
15 concentrations and pH levels. Exemplary applications include inhibiting, reducing or  
eliminating the presence of microbial and/or fungal organisms on surfaces, in solutions,  
or in complexed forms, such as in biofilms. Exemplary methods include providing an  
antiseptic coating on surfaces of objects to reduce the incidence of infection, and  
contacting objects and/or surfaces by flushing, soaking and/or rinsing with an antiseptic  
20 solution to inhibit the proliferation of, reduce or eliminate microbial populations.

**Background of the Invention and Description of Prior Art**

          Infections are a significant problem in many fields where sanitary conditions are  
important, such as in healthcare. Problematic infections may arise from bacterial, fungal,  
25 anaerobic, protozoan and/or viral organisms. Challenges are encountered both in  
preventing infection and in reducing or eliminating the infection once it is established.  
Infected environments may include surfaces of objects, fluids and fluid contacts, and/or  
humans or animals.

          Alcohol solutions and isopropyl alcohol wipes are commonly used to sanitize  
30 surfaces and have been shown to have antibacterial activity. The most effective  
inhibitory anti-microbial effect is seen with 70% isopropanol solutions. Alcohol solutions  
at this concentration are quite expensive and evaporate rapidly, which substantially  
diminishes their efficacy and increases their cost. Moreover, although isopropanol  
solutions may be used on surfaces, including human skin, and in a variety of medical  
35 applications, alcohol solutions of this concentration cannot be administered to humans for  
medical purposes, other than topically.

9. In the healthcare field, infections of various types and causes are common and often result in longer hospital stays, leading to higher hospital costs. Even worse, over 90,000 patient deaths annually are attributed to nosocomial infections – that is, infections acquired at a hospital or in other healthcare environments. Surveillance for nosocomial infection has become an integral part of hospital practice. Studies conducted more than  
10 20 years ago by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) documented the efficacy of these surveillance activities in reducing the occurrence of nosocomial infection. Despite the attention given to problems of nosocomial infection, however, infection rates have not been dramatically reduced, and nosocomial infections remain a substantial risk and a substantial health concern.

15 One problematic source of infections in the medical and veterinary fields is found in catheters, and particularly in in-dwelling catheters. Catheters have become essential in the management of critical care patients, yet the inside of a catheter is often the major source of infection. Catheters are used for delivery of fluids, blood products, drugs, and nutrients, as well as for hemodialysis, hemofiltration, peritoneal dialysis, retrieval of  
20 blood samples, monitoring of patient conditions, etc. Transcutaneous catheters often become infected through skin penetration of the catheter. It has been found that seventy percent (70%) of all nosocomial bloodstream infections occur in patients with central venous catheters. Daouiche *et al.* *New Engl. J. Med.* 340:1-8 (1999).

In particular, during some procedures, a catheter must be implanted in, and remain  
25 implanted in, a patient for a relatively long period of time, e.g. over thirty days. Intravenous (IV) therapy catheters and urinary catheters typically remain implanted for a substantial period of time. As a result of trauma to the areas of insertion, and pain to the patients, such catheters cannot be removed and implanted frequently. Catheter-borne bacteria have been implicated as a primary source of urinary tract infections. Patients  
30 who receive a peripherally inserted central catheter during pregnancy have also been found to be at significant risk for infectious complications. Ogura *et al.* *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188(5):1223-5 (2003). In addition, central venous catheter infection, resulting in catheter related sepsis, has been cited as the most frequent complication during home parenteral nutrition. Richmond *et al.* *Clinical Nutrition*, 21(1):33-38 (2002). Because of  
35 the risk of infections, catheterization may be limited to incidences when the procedure is absolutely necessary. This seriously compromises patient health.

After most prescribed medical access procedures involving a catheter, the catheter is flushed with saline and then filled with a liquid, such as saline or a heparin solution, to

- 5 prevent blood from clotting inside of the catheter, inhibit the patient's blood from backing up into the catheter, and prevent gases from entering the catheter. The liquid that is used to flush the catheter is referred to as a "lock-flush," and the liquid used to fill the catheter following flushing or during periods of non-use is referred to as a "lock" solution.

Traditionally, catheters have been locked with normal saline or heparin solutions,  
10 which provide anticoagulant activity. Heparin and saline are sometimes used in combination. Normal saline is generally used to lock short term peripheral intravenous catheters, but has no anticoagulant or antimicrobial activity. Heparin solutions are generally used to lock vascular catheters. Heparin has anticoagulant activity but it does not function as an antimicrobial and does not prevent or ameliorate infections. There are  
15 also strong indications that heparin in lock solutions may contribute to heparin-induced thrombocytopenia, a serious bleeding complication that occurs in a subset of patients receiving heparin injections.

Catheter locking solutions comprising Taurolidine, citric acid and sodium citrate have been proposed. A recent publication (*Kidney International*, Sept. 2002) describes  
20 the use of a 70% alcohol solution as a lock solution for a subcutaneous catheter port. The use of alcohol as a lock solution is questionable, since it is not an anticoagulant, and since there would be risks associated with this solution entering the bloodstream. The inventors are also unaware of any evidence indicating that a 70% alcohol solution has any biofilm eradication activity.

25 An emerging trend and recommendation from the Center for Infectious Disease (CID) is to treat existing catheter infections systemically with either a specific or a broad range antibiotic. Use of an antibiotic in a lock solution to prevent infection is not recommended. The use of antibiotics to treat existing catheter infections has certain risks, including: (1) the risk of development of antibiotic-resistant strains; (2) the inability of  
30 the antibiotic to kill sessile, or deep-layer biofilm, bacteria, which may require the use of antibiotics at toxic concentrations; and (3) the high cost of prolonged antibiotic therapy. Catheters coated with an antiseptic or antibiotic material are available. However, these coated catheters may only provide limited protection for a relatively short period of time.

In general, free-floating organisms may be vulnerable to antibiotics. However,  
35 bacteria and fungi may become impervious to antibiotics by aggregating on surfaces and producing a slimy protective substance, often referred to as extra-cellular polymeric substance (EPS) to form a biofilm. As the microbes proliferate, more than fifty genetic up or down regulations may occur, resulting in the formation of a more antibiotic resistant

5 microbial biofilm. Two-thirds of the bacterial infections that physicians encounter have been attributed to biofilms. Notting, *Science News*, 160:28 (2001).

Biofilm formation is a genetically controlled process in the life cycle of bacteria that produces numerous changes in the cellular physiology of the organism, often including increased antibiotic resistance (of up to 100 to 1000 times), as compared to  
10 growth under planktonic (free floating) conditions. As the organisms grow, problems with overcrowding and diminishing nutrition trigger shedding of the organisms to seek new locations and resources. The newly shed organisms quickly revert back to their original free-floating phase and are once again vulnerable to antibiotics. However, the  
15 free-floating organism may enter the bloodstream of the patient, creating bloodstream infections which produce clinical signs, e.g. fever, and more serious infection-related symptoms. Sessile rafts of biofilm may slough off and attach to tissue surfaces, such as heart valves, causing proliferation of biofilm and serious problems, such as endocarditis.

In industrial settings, the formation of biofilms is very common and is generally referred to as biofouling. For example, biofilm growth on mechanical structures, such as  
20 filtration devices, is a primary cause of biological contamination of drinking water distribution systems. Biofilm formation in industrial settings may lead to material degradation, product contamination, mechanical blockage and impedance of heat transfer in processing systems. Biofilm formation and the resultant contamination is also a common problem in food preparation and processing facilities.

25 To further complicate matters, conventional sensitivity tests measure only the antibiotic sensitivity of the free-floating organisms, rather than organisms in a biofilm state. As a result, a dose of antibiotics is administered to the patient, such as through a catheter, in amounts that rarely have the desired effect on the biofilm phase organisms that may reside in the catheter. The biofilm organisms may continue to shed more  
30 planktonic organisms or may go dormant and proliferate later as an apparent recurrent infection.

In order to eradicate biofilm organisms through use of antibiotics, a laboratory must determine the concentration of antibiotic required to kill the specific genetic biofilm phase of the organism. Highly specialized equipment is required to provide the minimum  
35 concentration for biofilm eradication. Moreover, the current diagnostic protocols are time consuming, and results are often not available for many days, e.g. five days. This time period clearly does not allow for prompt treatment of infections. This delay, and the well-justified fear of infection, may result in the overuse of broad-spectrum antibiotics

5 and continued unnecessary catheter removal and replacement procedures. Overuse of broad-spectrum antibiotics can result in the development of antibiotic resistant bacterial strains which cannot be effectively treated. Unnecessary catheter removal and replacement is painful, costly and may result in trauma and damage to the tissue at the catheter insertion site.

10 The antibiotic resistance of biofilms, coupled with complications of antibiotic use such as the risk of the development of antibiotic resistant strains, has made antibiotic treatment an unattractive option. As a result, antibiotic use is limited to symptomatic infections and prophylactic antibiotics are not typically employed to prevent contamination. Because the biofilm can act as a selective phenotypic resistance barrier to  
15 most antibiotics, the catheter must often be removed in order to eradicate a catheter related infection. Removal and replacement of the catheter is time consuming, stressful to the patient, and complicates the medical procedure. Therefore, there is a need for convenient and effective methods for killing organisms, and especially those dwelling inside of catheters, without the necessity of removing the catheter from the body.

20 In addition to bacterial and fungal infections, amoebic infections can be very serious and painful, as well as potentially life threatening. Several species of *Acanthamoeba*, for example, have been found to infect humans. *Acanthamoeba* are found worldwide in soil and dust, and in fresh water sources as well as in brackish water and sea water. They are frequently found in heating, venting and air conditioning units,  
25 in humidifiers, dialysis units, and in contact lens paraphernalia. *Acanthamoeba* infections, in addition to microbial and fungal infections, may also be common in connection with other medical and dental devices, including toothbrushes, dentures and other dental appliances, and the like. *Acanthamoeba* infections often result from improper storage, handling and disinfection of contact lenses and other medical devices  
30 that come into contact with the human body, where they may enter the skin through a cut, wound, the nostrils, the eye, and the like.

There are numerous different kinds of microbes that present problematic infections, including varieties of bacteria and fungi. However, present methods of eliminating infections generally employ solutions that are effective against a limited  
35 number of different microbes. Root *et al.* (*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32:1627-1633 (1988)) describe the *in vitro* use of disodium EDTA against a particular catheter-associated *Staphylococcus epidermidis* pathogen isolate.

5 EDTA has traditionally been useful as a metal chelator and has been used, in combination with other active compounds, for a variety of purposes. EDTA is often used, in low concentrations, as an *in vitro* anticoagulant for blood specimen collection and testing and as an antioxidant synergist, and is also added to solutions, for example, as a chelator, a stabilizer, or a preservative for pharmaceutical preparations. EDTA may exist  
10 in a variety of forms, some of which are sodium salt forms, such as disodium, trisodium, and tetrasodium salts, and others of which are metal chelates such as iron, copper, magnesium, etc. Certain forms of EDTA have been utilized, in conjunction with other substances as an adjuvant, in compositions for treating infected catheters. When used in a clinical setting, or in a composition employed with humans or animals, the solutions are  
15 generally adjusted to a physiological, or neutral, pH range.

A combination of an alcohol with an additive, such as a non-sodium salt form of EDTA, is described in PCT publication WO 02/05188. PCT publication WO 00/72906 A1 describes a lyophilized mixture of an antimicrobial agent, e.g. an antibiotic, and a second agent, that may be a non-sodium salt form of EDTA, as a chelating agent for  
20 catheter flushing. In U.S. Patent No. 5,688,516, compositions having an anticoagulant, a chelating agent, such as EDTA, and an antimicrobial agent, such as Minocycline, are described for coating medical devices and inhibiting catheter infection. In particular described examples, a disodium form of EDTA is brought to a physiological pH of 7.4 and is used in the composition. PCT publication WO 99/09997 describes the treatment of  
25 fungal infection with a combination of an antifungal agent and a chelator, such as EDTA.

Other areas in which infections present a problem include medical devices and materials used in connection with the eyes, such as contact lenses, scleral buckles, suture materials, intraocular lenses, and the like. In particular, there has been emphasis on the development of methods to disinfect ocular prostheses, e.g. contact lenses. Bacterial  
30 biofilms may participate in ocular infections and allow bacteria to persist on abiotic surfaces that come in contact with, or are implanted in, the eye. Biofilms may also form on the biotic surfaces of the eye. Zegans *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 21:415-20 (2002). A severe form of keratitis can also be initiated by a protozoan amoeba which can contaminate lens disinfectant fluids. An ophthalmic formulation of tetrasodium EDTA and alkali salts, buffered to a pH of 6-8, for the disinfection of contact lenses is described  
35 in U.S. Patent No. 5,300,296. U.S. Patent No. 5,998,488 describes an ophthalmic composition of EDTA and other substances, such as cyclodextrin and boric acid.



WFO 2M47108193

PCT/US2004/018909

5 In the dental field, items to be placed in a mouth, such as dental tools, and dental and orthodontic devices such as retainers, bridges, dentures, and the like, used to be maintained in a sterile condition, particularly during storage and prior to placement in the mouth. Otherwise, infection may be transmitted to the bloodstream and become serious. U.S. Patent No. 6,077,501 describes the use of EDTA in a denture cleanser composition  
10 with other active components.

The water supply is also prone to microbial and other types of infectious. Water storage devices, as well as water supply and withdrawal conduits, often become infected. The internal surfaces of fluid-bearing tubing in medical and dental offices present an environment that is suitable for microbial infection and growth, and the adherence of  
15 microbes and formation of highly protective biofilm layers is often problematic in fluid storage and supply devices.

There is a need for improved methods and compositions to prevent and destroy infections in a variety of environments. Such antiseptic solutions should have a broad range of antimicrobial properties. In particular, the solutions should be capable of  
20 penetrating biofilms to eradicate the organisms in the biofilms. The methods and solutions should be safe enough to be used as a preventive measure as well as in the treatment of existing infections.

#### Summary of the Invention

25 The present invention provides antiseptic solutions comprising, consisting essentially of, or consisting of, one or more salt(s) of EDTA at a pH that is higher than physiologically pH and at a prescribed concentration. The inventors have discovered that certain EDTA compositions possess powerful antiseptic activities and function as broad-spectrum anti-microbial agents, as well as functioning as fungicidal agents against many strains of pathogenic yeast. EDTA compositions of the present invention are also highly  
30 effective in killing pathogenic biofilm organisms and in reducing and eliminating existing biofilms, as well as preventing biofilm formation. The inventive EDTA compositions and combinations further exhibit both anti-protozoan and anti-amoebic activity. Based on published reports, the EDTA compositions of the present invention are further expected  
35 to exhibit anti-viral activity.

The EDTA formulations of the present invention are safe for human administration, and are biocompatible and non-corrosive. They may also have anticoagulant properties and are thus useful for preventing and/or treating a variety of

WO 2004/108043

PCT/US2004/018043

5 catheter-related infections. The antiseptic solutions of the present invention have numerous applications, including as lock and lock flush solutions for various types of catheters, use as antiseptic agents or solutions for sanitizing a range of medical, dental and veterinary devices, instruments and other objects, surfaces, and the like. Furthermore, they have sanitizing applications in industrial, and in food preparation and  
10 handling settings.

The inventive antiseptic compositions may be employed prophylactically to prevent infection, or to reduce and/or eliminate existing or established infections. Methods for preventing or treating infection of an object or surface with an undesirable microorganism are provided, such methods comprising contacting the surface or object  
15 with a composition of the present invention. The inventive compositions may thus be employed to inhibit the growth and proliferation of microbial populations and/or fungal pathogens, including inhibiting the formation and proliferation of biofilms; inhibit the growth and proliferation of protozoan populations; inhibit the growth and proliferation of amoebic populations; and prevent amoebic infection, particularly *Acanthamoeba*  
20 infections.

The present invention also provides methods for substantially eradicating microbial populations, including both planktonic microbial populations and microbial populations in the form of biofilms, together with methods for substantially eradicating an *Acanthamoeba* population. Such methods comprise contacting an infected object or  
25 surface, or an object or surface suspected of being infected, with a composition of the present invention. Depending on the antiseptic composition used in the various methods, various contact time periods may be required to inhibit the formation and proliferation of various populations, and/or to substantially eradicate various populations. Suitable contact time periods for various compositions are provided in the examples and may also  
30 be determined by routine experimentation.

In one embodiment, antiseptic compositions of the present invention have at least four, and preferably at least five, of the following properties: action against properties; inhibitory and/or bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria in a planktonic form; inhibitory and/or fungicidal activity against a spectrum of fungal pathogens;  
35 inhibitory and/or bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria in a sessile, or biofilm, form; inhibitory activity against protozoan infections; inhibitory activity against *Acanthamoeba* infections; safe and biocompatible, at least in modest volumes, in contact

1 with a patient; safe and biocompatible, at least in modest volumes, in a patient's bloodstream; and safe and compatible with industrial objects and surfaces.

Soluble salts of EDTA are used in the compositions of the present invention. Sodium salts of EDTA are commonly available and are generally used, including di-sodium, tri-sodium and tetra-sodium salts, although other EDTA salts, including  
 10 ammonium, di-ammonium, potassium, di-potassium, cupric di-sodium, magnesium di-sodium, ferric sodium, and combinations thereof, may be used, provided that they have the desired antibacterial, fungicidal, anti-protazoan and/or anti-amoebic properties, and that they are sufficiently soluble in the desired solvent. Various combinations of EDTA salts may be used and may be preferred for particular applications. Importantly, in most  
 15 embodiments, compositions and methods of the present invention do not employ traditional antibiotic agents and thus do not contribute to the development of antibiotic resistant organisms.

The inventive antiseptic compositions comprise, consist of, or consist essentially of one or more salt(s) of EDTA in solution at a pH higher than physiological pH.  
 20 Preferably such compositions have a pH of at least 8.0. Preferably, the inventive compositions have a pH in the range between 8.5 and 12.5, between 9.5 and 11.5, or between 10.5 and 11.5. The salt of EDTA is generally present at an amount of at least 0.01% w/v. In preferred embodiments, the inventive compositions comprise at least one salt of EDTA in an amount of 0.2% to 10% w/v, more preferably 0.2% to 6.0% w/v and  
 25 most preferably 0.2% to 4.0% w/v.

In specific embodiments, the inventive compositions comprise, or consist essentially of, a solvent and at least one salt of EDTA at a concentration of between 0.01% and 10% w/v, wherein the solution has a pH of at least 9.0 and possesses bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria. Preferably, the at least one salt  
 30 of EDTA is tri-sodium or tetra-sodium EDTA. The solvent is generally selected from the group consisting of: water, saline, alcohols, and combinations thereof. In one embodiment, the solvent is a combination of water and ethanol.

The inventive antiseptic compositions may be employed as lock and lock flush solutions for various types of in-dwelling access catheters, including vascular catheters  
 35 used for delivery of fluids, blood products, drugs and nutrition, withdrawal of fluids or blood, dialysis, monitoring of patient conditions, and the like. Antiseptic solutions of the present invention may also be used as lock and lock flush solutions for urinary catheters, nasal tubes, throat tubes, and the like. The general solution parameters described below

are suitable for these purposes. In one embodiment, an antiseptic solution comprising, consisting of or consisting essentially of one or more sodium EDTA salt(s) at a pH higher than physiological pH is employed to maintain the patency of in-dwelling intravascular access devices. Methods for sanitizing catheters and other medical tubes, such as nasal tubes, throat tubes and the like, are also provided and involve contacting the catheter or other medical tube with a sanitizing composition of the present invention.

In another embodiment, antiseptic compositions of the present invention comprising, consisting of or consisting essentially of one or more sodium salt(s) of EDTA at a pH greater than physiological pH are provided as sanitizing solutions for medical devices such as dentures and other dental, orthodontic and/or periodontal devices, for contact lenses and other optical devices, for medical and veterinary instruments, devices and the like, and as sanitizing solutions for sanitizing surfaces and objects. Methods of sanitizing such devices are also provided, the methods comprising contacting a device with an antiseptic composition of the present invention. In general, antiseptic compositions of the present invention may be used as soaking solutions for dental, orthodontic and periodontal devices, including toothbrushes, and may also used as soaking solutions for contact lenses and other optical devices, as well as medical and veterinary instruments, devices and the like. For these applications, antiseptic compositions of the present invention are generally formulated as solutions, or are provided in a dry form which, upon addition of a suitable solvent, forms a solution.

In yet another embodiment, antiseptic compositions of the present invention are formulated for use in solutions, gels, creams and other preparations designed for topical use as antiseptic agents, wipes, antibacterial treatments and the like. Antiseptic compositions of the present invention may also be used as anti-bacterial agents in connection with bandages, dressings, wound healing agents and devices, and the like. In related embodiments, coverings for use in wound healing, such as bandages and dressings, are provided wherein the covering is impregnated with one or more of the compositions of the present invention.

Antiseptic compositions of the present invention may also be employed in industrial settings such as water storage and distribution systems, water purification, humidification and dehumidification devices, and in food preparation, handling and packaging settings, to inhibit, reduce or substantially eliminate microbial populations in both free floating and sessile forms, as well as many fungal, amoebic and protozoan populations. Industrial equipment and surfaces may be contacted with, flushed with, or

5 soaked in, antiseptic compositions of the present invention. Time release antiseptic composition formulations may also be provided to provide treatment over time, particularly in locations that are difficult to access frequently.

#### Brief Description of the Drawings

10 Figs. 1A-1D show minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations for various gram-positive and gram-negative bacterial organisms against EDTA salt solutions consisting essentially of: di-potassium EDTA; di-ammonium EDTA; di-sodium EDTA; tri-sodium EDTA; and tetra-sodium EDTA, using the agar dilution method. The bacterial organisms were isolated from catheter-related  
15 infections in human patients. Experimental techniques are described in Example 1.

Fig. 2 shows MIC and MBC concentrations for various fungal organisms against different formulations of EDTA, using the agar dilution method. Experimental techniques are described in Example 1. The fungal organisms were collected from human patient samples.

20 Figs. 3A and 3B show MIC and MBC data for gram-positive and gram-negative bacterial organisms against EDTA salt solutions consisting essentially of: cupric di-sodium EDTA; magnesium di-sodium EDTA; and ferric sodium EDTA. The bacterial organisms were isolated from catheter-related infections in human patients. Experimental techniques are described in Example 1.

25 Figs. 4A-4C show MIC and MBC data for various gram-positive and gram-negative bacterial organisms against combination EDTA salt solutions consisting essentially of: cupric di-sodium and tetra-sodium EDTA; cupric di-sodium and di-potassium EDTA; and cupric di-sodium and di-ammonium EDTA. The bacterial organisms were isolated from catheter-related infections in human patients. Experimental  
30 techniques are described in Example 1.

Figs. 5A-5C show MIC and MBC data for various gram-positive and gram-negative bacterial organisms against combination EDTA salt solutions consisting essentially of: tetra-sodium and di-ammonium EDTA; tetra-sodium and di-potassium EDTA; and di-ammonium and di-potassium EDTA. The bacterial organisms were  
35 isolated from catheter-related infections in human patients. Experimental techniques are described in Example 1.

5 Fig. 6 shows the minimum biofilm eradication concentration (MBEC) values for various organisms, expressed in mg/ml tetra-sodium EDTA (w/v) using the methodology described in Example 2.

Fig. 7 shows experimental results from the treatment of infected renal hemodialysis catheters with an antiseptic composition consisting essentially of tetra-  
10 sodium EDTA at a concentration of 40 mg/ml (w/v).

Fig. 8 shows experimental results from the treatment of infected renal hemodialysis catheters, as well as one arterial and one venous catheter, with an antiseptic composition consisting essentially of tetra-sodium EDTA at concentrations of 20-100 mg/ml (w/v).

15

#### Detailed Description of the Invention

EDTA is used at low concentrations in many compositions, in combination with other active components, as a stabilizer or preservative agent. Antiseptic compositions of the present invention comprise generally higher concentrations of EDTA and preferably  
20 comprise at least 0.01% EDTA salt(s), by weight per volume of solution (w/v), and may comprise up to 15% (w/v) EDTA salt(s). For many applications, the inventive antiseptic compositions preferably comprise at least 0.1% (w/v) EDTA salt(s) and less than 10% (w/v) EDTA salt(s), more preferably between 0.1% (w/v) EDTA salt(s) and 3.0% (w/v) EDTA salt(s), and most preferably between 0.1% and 6.0% EDTA salt(s). Exemplary  
25 compositions, described below, comprise 3.6-4.4% (w/v) EDTA salt(s) in aqueous solution, or 0.01-0.2% (w/v) EDTA salt(s) in a mixture of water and ethanol.

The desired EDTA salt(s) concentration for various applications may depend on the EDTA salt, or combination of salts, employed, the type of infection being treated and, to some degree, the solvent used for the antiseptic compositions. For example, when  
30 aqueous solvents comprising ethanol are used, the concentration of EDTA salt(s) required to provide the desired level of activity may be reduced compared to the EDTA salt(s) concentration used in compositions having water as the solvent. Antiseptic compositions comprising one or more EDTA salt(s) have demonstrated inhibitory and/or bactericidal efficacy at concentration ranges of 0.01% to 30% or more, as shown in the exemplary data provided below. "Effective" concentrations of desired EDTA salt(s) in antiseptic  
35 compositions of the present invention for inhibitory, bactericidal, fungicidal, biofilm eradication and other purposes, may be determined by routine experimentation, as described in the examples provided below.

5       The British Pharmacopoeia (BP) specifies that a 5% solution of di-sodium EDTA has a pH of 4.0 to 5.5. The BP also specifies a pH range of 7.0 to 8.0 for solutions of tri-sodium EDTA. The pH values for other EDTA salts in aqueous solution are provided in Example 10, below. At physiological pH, the sodium salts of EDTA exist as a combination of di-sodium and tri-sodium EDTA, with the tri-sodium salt of EDTA being  
10       predominant. In the U.S., pharmaceutical "di-sodium" EDTA prepared for injection has generally been titrated with sodium hydroxide to a pH of 6.5 to 7.5. At this pH, the EDTA solution actually comprises primarily tri-sodium EDTA, with a lesser proportion of the di-sodium salt. Other compositions comprising sodium salts of EDTA that are used in medical or healthcare applications are generally adjusted to a pH that is  
15       substantially physiological.

      In certain embodiments, antiseptic compositions of the present invention comprise, consist essentially of, or consist of, a sodium EDTA salt (or a combination of sodium EDTA salts) in solution at a pH higher than physiological, preferably at a pH of greater than 8.0, at a pH greater than 8.5, at a pH greater than 9, at a pH greater than 9.5,  
20       or at a pH greater than 10. In other embodiments, antiseptic compositions of the present invention comprise, consist essentially of, or consist of, a sodium EDTA salt (or a combination of sodium EDTA salts) in solution at a pH in the range between 8.5 and 12.5, at a pH between 9.5 and 11.5, or at a pH between 10.5 and 11.5. When used herein, the term "EDTA salt" may refer to a single salt, such as a di-sodium, tri-sodium or tetra-  
25       sodium salt, or another EDTA salt form, or it may refer to a combination of such salts. The composition of EDTA salt(s) depends both on the EDTA salts used to formulate the composition, and on the pH of the composition. For antiseptic compositions of the present invention comprising sodium EDTA salt(s) at the desired pH ranges (specified above), the sodium EDTA salts are predominantly present in both the tri-sodium and  
30       tetra-sodium salt forms.

      In one embodiment, antiseptic compositions of the present invention comprise, or consist essentially of, a combination of at least the tri-sodium and tetra-sodium salts of EDTA. In another embodiment, antiseptic compositions of the present invention comprise, or consist essentially of, a combination of at least the tri-sodium and tetra-  
35       sodium salts of EDTA, in which at least 10% of the EDTA in the composition is present in the tetra-sodium salt form. In yet other embodiments, antiseptic compositions of the present invention comprise, or consist essentially of, a combination of at least tri-sodium and tetra-sodium salts of EDTA, in which at least 50% or at least 60% of the EDTA in the

WFO 2004/100193

PCT/US2004/014009

5 composition is present in the tri-sodium salt form. In another embodiment, antiseptic compositions of the present invention comprise, or consist essentially of, a combination of di-sodium, tri-sodium and tetra-sodium EDTA, in which less than 10% of the EDTA in the composition is present in the di-sodium salt form.

Antiseptic compositions comprising, consisting essentially of, or consisting of  
10 EDTA salt(s) other than, or in addition to, sodium EDTA salts have different "effective" pH ranges. "Effective" pH ranges for desired EDTA salt(s) in antiseptic compositions of the present invention for use in inhibitory, bactericidal, fungicidal, biofilm eradication and other purposes, may be determined by routine experimentation.

In some embodiments, antiseptic compositions of the present invention consist of  
15 the EDTA salt(s), as described above, and antiseptic solutions consist of EDTA salts dissolved in a solvent, generally an aqueous solvent such as water or saline. In other embodiments, antiseptic compositions of the present invention consist essentially of the EDTA salt(s), as described above, generally in an aqueous solvent such as water or saline. Antiseptic compositions of the present invention consisting essentially of an EDTA salt,  
20 or a combination of EDTA salts, are substantially free from other active substances having substantial antimicrobial and/or anti-fungal activity. Substantial antimicrobial and/or anti-fungal activity, in this context, means anti-microbial and/or antifungal activity that is at least 50% of the anti-microbial and/or antifungal activity of a sodium EDTA salt(s) composition in aqueous solution at a concentration of 4.0% (w/v) at a pH of 10.5.

In some embodiments, antiseptic compositions of the present invention comprise  
25 EDTA salt(s) having specified concentration(s), at specified pH ranges, and may contain materials, including active components, in addition to the EDTA salts described above. Other antimicrobial or biocidal components may be incorporated in antiseptic compositions of the present invention, although the use of traditional antibiotics and  
30 biocidal agents is generally discouraged as a consequence of the dire consequences of the development of antibiotic- and biocidal-resistant organisms. In some embodiments, antiseptic compositions of the present invention comprising EDTA salt(s) at specified concentration(s) and pH ranges, are substantially free from other active substances having substantial antimicrobial and/or anti-fungal activity.

35 Other active and inactive components may also be incorporated in the antiseptic compositions of the present invention, provided that they do not deleteriously affect the activity and/or stability of the EDTA salt(s). Proteolytic agents may be incorporated in antiseptic compositions for some applications. Antiseptic compositions formulated for



WV 2004/102093

PCT/US2004/015069

5 topical application may include various creams, emulsions, and skin care compositions such as aloe vera, and the like, for example. Antiseptic compositions of the present invention provided in a solution formulation may also comprise other active and inactive components, provided they do not negatively interfere with the activity and/or stability of the EDTA salt(s).

10 The compositions of the present invention may be used in a solution or a dry form. In solution, the EDTA salt(s) are preferably dissolved in a solvent, which may comprise an aqueous solution, such as water or saline, or another biocompatible solution in which the EDTA salt(s) are soluble. Other solvents, including alcohol solutions, may also be used. In one embodiment, EDTA salt compositions of the present invention are  
15 formulated in a mixture of water and ethanol. Such solutions are highly efficacious and may be prepared by making a concentrated EDTA salt(s) stock solution in water and then introducing the desired concentration of ethanol. EDTA salt concentrations of from about 0.01% to 10%, w/v, are suitable, and ethanol concentrations of between about 0.1% and about 10%, w/v, provide effective antiseptic compositions. In some embodiments, EDTA  
20 salt concentrations of about 2 mg/ml (0.2% w/v) in water with an ethanol concentration of about 1% (v/v) are highly effective against a broad spectrum of bacterial strains. When sodium EDTA salts are used, the pH ranges of these antiseptic compositions are as described above. Bio-compatible non-aqueous solvents may also be employed, provided the EDTA salt(s) can be solubilized and remain in solution during storage and use.

25 EDTA solutions of the present invention are preferably provided in a sterile and non-pyrogenic form, and may be packaged in any convenient fashion. In some embodiments, antiseptic EDTA compositions of the present invention may be provided in connection with or as part of a medical device, such as in a pre-filled syringe or other medical device. The compositions may be prepared under sterile, aseptic conditions, or  
30 they may be sterilized following preparation and/or packaging using any of a variety of suitable sterilization techniques. Single or multiple use vials, syringes or containers of EDTA solutions may be provided. Systems of the present invention include such vials, syringes or containers containing the EDTA solutions of the present invention.

The compositions of the present invention may also be provided in a substantially  
35 "dry" form, such as a substantially dry coating on a surface of tubing or a conduit, or a medical or industrial device such as a catheter or conduit, or a container, or the like. Such substantially dry forms of the inventive EDTA compositions may be provided in a powder or lyophilized form that may be reconstituted to form a solution with the addition

WO 2004/108893

PCT/US2004/018899

5 of a solvent. Substantially dry forms of EDTA compositions may alternatively be provided as a coating, or may be incorporated in a gel or other type of carrier, or encapsulated, or otherwise packaged, and provided on a surface as a coating or in a container. Such substantially dry forms of the inventive EDTA compositions are formulated such that, in the presence of a solution, the substantially dry composition  
10 forms an EDTA solution having the composition and properties described above. In certain embodiments, different encapsulation or storage techniques may be employed such that effective time release of the EDTA is accomplished upon extended exposure to solutions. In this embodiment, the substantially dry EDTA solutions may provide antiseptic activity over an extended period of time and/or upon multiple exposures to  
15 solutions.

Compositions comprising EDTA have a well established safety profile in connection with medical usage and administration to humans. Doses of up to 3000 mg diodium EDTA are infused over 3 hours, on a daily basis, for the treatment of hypercalcemia in humans and are well tolerated. EDTA salts are also present, in  
20 combination with other components, in many solutions used in medical and human health applications, and have been established as safe for human use, both *in vitro* and *in vivo*. EDTA salts are readily available at a reasonable cost, and are stable over time in solution.

Formulation and production of antiseptic compositions of the present invention is generally straightforward. In one embodiment, desired antiseptic compositions of the  
25 present invention are formulated by dissolving at least one EDTA salt in an aqueous solvent, such as purified water, to the desired concentration and adjusting the pH of the EDTA salt solution to the desired pH. In alternative embodiments, desired antiseptic compositions of the present invention are formulated by dissolving at least one EDTA salt in a solvent in which the EDTA salt, or combination of salts, is soluble to provide a  
30 concentrated, solubilized EDTA salt solution. Additional solvents or components may then be added. Alternatively, the solubilized EDTA salt composition may be formulated in a form other than a solution, such as a topical preparation. The antiseptic solution may then be sterilized using conventional means, such as autoclaving, UV irradiation, filtration, ultrafiltration, and/or other means. The preferred osmolarity range for EDTA  
35 solutions is from 240-500 mOsm/Kg, more preferably from 300-420 mOsm/Kg. The solutions are preferably formulated using USP materials.

Antiseptic compositions comprising, consisting of, or consisting essentially of, tri- or tetra-sodium salt(s), or a mixture thereof, are preferred for many applications and may

5 be prepared using sodium salts of EDTA other than tri- and tetra-sodium salts, such as di-sodium EDTA which is readily available. Di-sodium EDTA solutions have a lower pH in solution than the desired pH range of compositions of the present invention. However, upon pH adjustment to the desired range using a pH adjustment material, such as sodium hydroxide, sodium acetate or other well-known pH adjustment agents, EDTA solutions  
10 prepared using di-sodium salts are converted to the preferred combination di-, tri- and/or tetra-sodium salt EDTA compositions of the present invention. Thus, different forms and combinations of EDTA salts may be used in the preparation of the EDTA compositions of the present invention, provided that the pH of the composition is adjusted to the desired pH range prior to use. In one embodiment, antiseptic compositions consisting of a  
15 mixture of primarily tri- and tetra-sodium EDTA are provided by dissolving di-sodium EDTA in an aqueous solution in an amount 3%-5% on a weight/volume basis, and adding sodium hydroxide in an amount sufficient to provide the desired pH of between 8.5 and 12.0.

Antiseptic compositions of the present invention comprising, consisting  
20 essentially of or consisting of, at least one EDTA salt as described above are also useful for many other applications. EDTA solutions may be used as antiseptic solutions for soaking, rinsing, or contacting medical, dental and veterinary surfaces and objects. EDTA solutions of the present invention may be used, for example, for storing and/or sanitizing contact lenses and other optical devices; for storing and/or sanitizing dental  
25 devices such as dentures, bridges, retainers, tooth brushes, and the like; and for storing and/or sanitizing medical, dental and veterinary devices and instruments. In these applications, the devices or surfaces may be contacted with, or soaked in, EDTA solutions of the present invention for a time sufficient to substantially eliminate microbial and/or fungicidal infections. EDTA compositions of the present invention may additionally be  
30 used to sanitize water and other fluid supply lines. Sanitizing of fluid supply lines may be accomplished by intermittently flushing the lines with EDTA compositions of the present invention. Similarly, EDTA compositions of the present invention may be used to eradicate biofilms, and microbial (including some virus and protozoa) and fungal populations in water supply and storage devices.

35 Numerous experimental tests and procedures have been carried out using EDTA-containing compositions of the present invention to establish their properties and their efficacy as antiseptic compositions. Several experimental procedures are described in

WO 2004/08193

PCT/US2004/01809

- 5 detail below. These procedures and the experimental results are provided for illustrative purposes only and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

#### Example 1

- 10 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) data for organisms against different formulations of EDTA, using the agar dilution method

- The minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC) for various gram-positive and gram-negative bacterial and yeast  
15 organisms were established for several different formulations of EDTA using the agar dilution method described below. The MICs and MBCs for various organisms were also tested in combinations of EDTA salt(s).

- The gram-positive and gram-negative bacterial organisms were isolated from human patients having catheter-related infections to ensure that the bacterial strains were  
20 actively pathogenic and were of the type common in human catheter-related bacterial infections. The yeast organisms were collected from patients having serious septicemic infections. The organisms were catalogued and maintained in the laboratory of Peter Kite at the University of Leeds.

- Various EDTA salt solutions and combination EDTA salt solutions were prepared  
25 by dissolving relevant reagent grade EDTA salts in distilled water to the desired EDTA salt concentration (w/v). Concentrated stock EDTA salt solutions were prepared for each EDTA salt or EDTA salt combination and were employed for determining the MIC and MBC for various organisms. Tetra- and tri-sodium EDTA solutions were prepared using the tetra- and tri-sodium salts of EDTA rather than using di-sodium EDTA and adjusting  
30 the pH of the solution to achieve the desired pH ranges. EDTA salt solutions were sterilized prior to use and stored at 4°C.

#### Agar Dilution Method Protocol

##### Making the agar

- 35 • Place 2 liters of nutrient agar into a steam bath and leave for about 1 hour (until molten).  
• Allow the agar to cool to 50°C.

WO 2004/108093

PCT/US2004/018009

- 5 • Collect 20 sterile (125mL) glass bottles and allocate 100mL of the nutrient agar to each one. To this add 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100mg/mL of Tetra-sodium EDTA (or other EDTA salt or EDTA salt combination being tested), using a stock solution at 200mg/mL.
- Pour 20mL agar into a sterile petri dish and allow to set. Pour 3 further plates. Label  
10 the plates with the concentration of EDTA they contain. Do this for each concentration.
- These plates can then be stored, until they are needed, in a 4°C fridge.

#### Inoculating the plates

- 15 • Grow overnight cultures of 23 Gram-positive organisms and 19 Gram-negative organisms in nutrient broth.
- Dilute each culture to  $10^6$  cfu/mL, using phosphate buffered saline (PBS).
- Use an automatic plate inoculator to inoculate each plate with 21 organisms.
- Incubate the plates overnight at 37°C.
- 20 • Next day score + or - for growth.
- Use sterile filter paper to transfer the growth from the initial plates to fresh Cled agar plates to determine the MBC's.
- Incubate the replica plates overnight at 37°C.
- Next day score + or - for growth. The MIC and MBC were described as the lowest  
25 concentration at which there was no growth.

The results are shown in Figs. 1A-5C. Figs. 1A-1D show MIC and MBC data (presented as mg/ml EDTA solution, w/v) for many gram-positive and gram-negative organisms against EDTA salt solutions consisting essentially of: di-potassium EDTA; di-ammonium EDTA; di-sodium EDTA; tri-sodium EDTA and tetra-sodium EDTA.  
30

Fig. 2 shows MIC and MBC data (presented as mg/ml EDTA solution, w/v) for yeasts against EDTA salt solutions consisting essentially of: tetra-sodium EDTA; di-potassium EDTA; and di-ammonium EDTA.

Figs. 3A and 3B show MIC and MBC data (presented as mg/ml EDTA solution, w/v) for gram-positive and gram-negative organisms against EDTA salt solutions consisting essentially of: cupric di-sodium EDTA; magnesium di-sodium EDTA and ferric sodium EDTA.  
35

5        Figs. 4A-4C show MIC and MBC data (presented as mg/ml EDTA solution, w/v) for gram-positive and gram-negative organisms against combination EDTA salt solutions consisting essentially of: cupric di-sodium and tetra-sodium EDTA; cupric di-sodium and di-potassium EDTA; and cupric di-sodium and di-ammonium EDTA.

10        Figs. 5A-5C show MIC and MBC data (presented as mg/ml EDTA solution, w/v) for gram-positive and gram-negative organisms against combination EDTA salt solutions consisting essentially of: tetra-sodium and di-ammonium EDTA; tetra-sodium and di-potassium EDTA; and di-ammonium and di-potassium EDTA.

15        Several of the EDTA salts and EDTA salt combinations were effective in inhibiting and/or eliminating a broad spectrum of bacterial strains at reasonable concentrations. Prior medical testing and use has established good biocompatibility profiles for the use of sodium EDTA salts in humans and animals, while the biocompatibility of other EDTA salts has not yet been established. Tetra- and tri-sodium EDTA salts appeared to be the most efficacious against a broad spectrum of pathogenic bacteria. In addition, they have been, or could easily be, established to be biocompatible  
20        for human and veterinary use, and they are cost effective and stable. Tetra-sodium EDTA salt is additionally active as an anticoagulant and is highly soluble in aqueous solvents. Based on these factors and the experiments outlined above, tetra- and tri-sodium EDTA salts were chosen as the most promising candidates for antiseptic compositions of the present invention.

25

#### Example 2

Minimum biofilm eradication concentration (MBEC) data for organisms against Tetra-sodium EDTA, using the modified Calgary device method

30        Biofilm formation is an important factor in bacterial contamination. An effective antiseptic composition preferably has the ability to reduce the proliferation of biofilm, or prevent or inhibit the formation of biofilms. We therefore tested our candidate tetra-sodium EDTA antiseptic solution to determine whether it could prevent or inhibit the formation of biofilms. The minimum biofilm eradication concentration (MBEC) for various organisms against tetra-sodium EDTA was established using a modified Calgary  
35        device method. The Calgary method is described in Olsen *et al.*, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66:86-92 (2002) and in U.S. Patent 6,599,714. The method and results are described below.

WO 2004/08093

PCT/US2004/018009

5 Tetra-sodium EDTA salt solutions were prepared by dissolving reagent grade tetra-sodium EDTA salt in distilled water to the desired EDTA salt concentration (w/v). Concentrated stock tetra-sodium EDTA salt solutions were prepared for determining the MBEC for various organisms in a sessile, or biofilm, form. Tetra-sodium EDTA solutions were sterilized prior to use and stored at 4°C.

10

#### Method

##### **Forming biofilm:**

- Use 100mL of Muller Hinton overnight broth of required organism.
- Pipette 200uL into all the wells in a 96 well microtitre tray. Place on lid with 96 pins. Incubate on an orbital shaker for 24 hours at 37°C at a speed of 200rpm.

15

##### **Susceptibility test:**

- Use biofilm formed above.
- Place lid (with pins) into a new 96 well microtiter tray containing 250uL of required concentrations of test agent. Incubate for 1 to 24 hours at 37°C. (Not on shaker).
- At time intervals of 1, 3, 6, and 24 hours, remove 4 pins for each concentration from the lid by inserting a screwdriver and snapping pin off into the well.
- Place 3 pins for each concentration into a 5ml wash of PBS and invert once.
- Place the three pins into 3mL of PBS and sonicate for 15 minutes. Plate out 2µL onto 3X CLED plates and spread using a sterile plastic spreader. Incubate at 37°C overnight. Read colony counts next day.
- Place the remaining loose pin (for each concentration) into 600µL of 4% formal saline for SEM.

20

25

30

The MBEC values for various organisms, expressed in mg/ml tetra-sodium EDTA (w/v) determined using this method, are shown in Fig. 6. The results demonstrate that 40 mg/ml tetra-sodium EDTA (4% w/v) was an effective biofilm eradication concentration for all microbial populations tested.

35

Exemplary data generated by MBEC experiments for various microorganisms are provided below. Tetra-sodium EDTA was used for all experiments, which were performed in triplicate.

5

Table 1: Organism: 250 *E. coli*

| Conc.<br>EDTA<br>mg/mL | Colony<br>count/mL<br>after 1<br>hour | Colony<br>count/mL<br>after 3<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 6<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 24<br>hours |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                      | 40152                                 | 53285                                  | 64234                                  | 6133                                    |
|                        | 48175                                 | 62044                                  | 56934                                  | 4560                                    |
|                        | 43796                                 | 61314                                  | 76642                                  | 5120                                    |
| 5                      | 0                                     | 520                                    | 80                                     | 0                                       |
|                        | 0                                     | 540                                    | 80                                     | 0                                       |
|                        | 0                                     | 620                                    | 133                                    | 730                                     |
| 10                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 15                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 20                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |

For 250 *E. coli*, the MBEC = 10 mg/mL tetra-sodium EDTA.

10

Table 2: Organism: J26 *Pseudomonas aeruginosa*

| Conc.<br>EDTA<br>mg/mL | Colony<br>count/mL<br>after 1<br>hour | Colony<br>count/mL<br>after 3<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 6<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 24<br>hours |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                      | 86561                                 | 4400                                   | 92701                                  | 66667                                   |
|                        | 89781                                 | 3060                                   | 79562                                  | 39036                                   |
|                        | 94891                                 | 3080                                   | 83212                                  | 41606                                   |
| 5                      | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 10                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 15                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 20                     | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |

For J26 *Pseudomonas aeruginosa*, the MBEC = < 5 mg/mL tetra-sodium EDTA.



5

Table 3: Organism: 292 *Enterobacter cloacae*

| Conc.<br>EDTA<br>mg/mL | Colony<br>count/mL<br>after 1<br>hour | Colony<br>count/mL<br>after 3<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 6<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 24<br>hours |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                      | 1.00E+06                              | 103704                                 | 94444                                  | 91241                                   |
|                        | 1.00E+06                              | 118519                                 | 131481                                 | 116667                                  |
|                        | 1.00E+06                              | 107407                                 | 100000                                 | 131481                                  |
| 5                      | 69343                                 | 35036                                  | 36496                                  | 0                                       |
|                        | 67153                                 | 15974                                  | 32197                                  | 0                                       |
|                        | 67153                                 | 19697                                  | 39416                                  | 0                                       |
| 10                     | 38686                                 | 12035                                  | 80                                     | 0                                       |
|                        | 42336                                 | 17803                                  | 219                                    | 0                                       |
|                        | 40909                                 | 18561                                  | 0                                      | 0                                       |
| 15                     | 8000                                  | 8133                                   | 379                                    | 0                                       |
|                        | 8533                                  | 8133                                   | 219                                    | 0                                       |
|                        | 7467                                  | 8267                                   | 133                                    | 0                                       |
| 20                     | 13786                                 | 2840                                   | 0                                      | 0                                       |
|                        | 12473                                 | 2820                                   | 0                                      | 0                                       |
|                        | 14661                                 | 2600                                   | 0                                      | 0                                       |

For 292 *Enterobacter cloacae*, the MBEC = < 5 mg/mL tetra-sodium EDTA.

10

Table 4: Organism: H. *Enterococcus* sp.

| Conc.<br>EDTA<br>mg/mL | Colony<br>count/mL<br>after 1<br>hour | Colony<br>count/mL<br>after 3<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 6<br>hours | Colony<br>count/mL<br>after 24<br>hours |
|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0                      | 5600                                  | 3520                                   | 4000                                   | 6133                                    |
|                        | 8133                                  | 3980                                   | 3440                                   | 4720                                    |
|                        | 6800                                  | 3920                                   | 3760                                   | 4640                                    |
| 5                      | 1380                                  | 780                                    | 80                                     | 0                                       |
|                        | 1160                                  | 580                                    | 100                                    | 0                                       |
|                        | 1140                                  | 500                                    | 120                                    | 0                                       |
| 10                     | 40                                    | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 100                                   | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 20                                    | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
| 15                     | 40                                    | 0                                      | 20                                     | 0                                       |
|                        | 0                                     | 0                                      | 0                                      | 0                                       |
|                        | 80                                    | 0                                      | 20                                     | 0                                       |
| 20                     | 1480                                  | 730                                    | 160                                    | 0                                       |
|                        | 1560                                  | 379                                    | 160                                    | 0                                       |
|                        | 2000                                  | 320                                    | 140                                    | 0                                       |

For H. *Enterococcus* sp., the MBEC = < 5 mg/mL tetra-sodium EDTA.

5

Table 5: Organism: J22 *Enterobacter cloacae*

| Conc. EDTA mg/mL | Colony count/mL after 1 hour | Colony count/mL after 3 hours | Colony count/mL after 6 hours | Colony count/mL after 24 hours |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0                | 124074                       | 107407                        | 105556                        | 101852                         |
|                  | 116667                       | 91241                         | 105556                        | 120370                         |
|                  | 112963                       | 98540                         | 92701                         | 100000                         |
| 5                | 6400                         | 267                           | 2040                          | 0                              |
|                  | 5200                         | 133                           | 2160                          | 0                              |
|                  | 8933                         | 379                           | 1820                          | 0                              |
| 10               | 3540                         | 1920                          | 267                           | 80                             |
|                  | 3040                         | 2900                          | 160                           | 1532                           |
|                  | 3760                         | 2340                          | 219                           | 800                            |
| 15               | 2620                         | 1560                          | 740                           | 0                              |
|                  | 2100                         | 1740                          | 720                           | 0                              |
|                  | 2720                         | 1580                          | 920                           | 0                              |
| 20               | 2040                         | 80                            | 960                           | 0                              |
|                  | 2360                         | 1460                          | 840                           | 0                              |
|                  | 1620                         | 133                           | 560                           | 0                              |

For J22 *Enterobacter cloacae*, the MBEC = 15mg/mL tetra-sodium EDTA.

10

Table 6: Organism: R81 *Proteus vulgaris*

| Conc. EDTA mg/mL | Colony count/mL after 1 hour | Colony count/mL after 3 hours | Colony count/mL after 6 hours | Colony count/mL after 24 hours |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0                | 62044                        | 81752                         | 112963                        | 59259                          |
|                  | 55474                        | 73723                         | 103704                        | 68519                          |
|                  | 54015                        | 78832                         | 107407                        | 59124                          |
| 5                | 3160                         | 160                           | 3460                          | 0                              |
|                  | 4000                         | 400                           | 3120                          | 0                              |
|                  | 4000                         | 160                           | 3140                          | 0                              |
| 10               | 1520                         | 730                           | 400                           | 0                              |
|                  | 1920                         | 533                           | 1460                          | 0                              |
|                  | 1900                         | 438                           | 160                           | 0                              |
| 15               | 2960                         | 379                           | 1100                          | 0                              |
|                  | 2580                         | 80                            | 780                           | 0                              |
|                  | 2560                         | 400                           | 1220                          | 0                              |
| 20               | 4560                         | 400                           | 1520                          | 0                              |
|                  | 4480                         | 320                           | 1280                          | 0                              |
|                  | 2820                         | 240                           | 720                           | 0                              |

For R81 *Proteus vulgaris*, the MBEC = < 5 mg/mL tetra-sodium EDTA.

5

## Example 3

*In vitro* catheter lock treatment procedure on patient positive catheters

A catheter lock treatment procedure using the candidate 40 mg/ml (4% w/v) tetra-sodium EDTA solution was developed and used for sample patient hemodialysis catheters that tested positive for various microbial infections. Catheters that were determined to have microbial infections were subjected to the catheter lock treatment using tetra-sodium EDTA, and colony counts were taken at various time points. In a first experiment, all catheters were treated with a 4% w/v tetra-sodium EDTA solution while in a second experiment, catheters were treated with tetra-sodium EDTA solutions at various concentrations. Tetra-sodium EDTA solutions were prepared and stored as described above in Examples 1 and 2. The procedure and results are described below.

## Method:

- Renal hemodialysis catheters removed on suspicion of infection were screened, by flushing 1 mL of sterile phosphate buffered saline down each lumen. Quantitative culture was performed using 1 and 10  $\mu$ L aliquots spread onto blood agar plates and incubated.
- The catheters were initially stored at 4°C until after screening and the external lumen sterilized with an alcohol wipe.
- Prior to lock treatment testing, the screened positive catheters were locked with nutrient broth using a 5 mL syringe and incubated overnight at 37°C to ensure biofilm viability and to ensure total colonization of all the endoluminal surfaces with the infecting organism.
- After overnight incubation, each catheter lumen was flushed with 5 mL of sterile saline and two 1 cm pieces were cut from the distal end, each placed in 1 mL of 1M sterile calcium chloride, (for neutralization of agent) one for Scanning electron microscopy (SEM) and the other for culture, in sterile universal containers.
- For the culture procedure, the universal was placed in a sonication bath for 15 mins at room temperature and then vortexed for 20 secs.
- Quantitative culture was performed using aliquots of 1  $\mu$ L and 10  $\mu$ L plated on blood agar plates and spread by means of sterile plastic L shaped rods, incubated at 37°C overnight, and colonies counted next day.

- 9       • The catheter was flushed and locked with the appropriate concentration of tetra-sodium EDTA lock fluid and incubated at 37°C for 18 hrs.
- At 3, 6 and 18 hrs incubation two 1 cm pieces of the distal end of the catheter were cut off and neutralized in 1 mL of 1M sterile calcium chloride solution.
- The quantitative count procedure was followed, at each time interval, as
- 10       previously described and one piece retained for SEM.

Seventeen (17) infected renal hemodialysis catheters were treated with an antiseptic composition consisting of tetra-sodium EDTA at a concentration of 40 mg/ml (4% w/v). The results are shown in Fig. 7. Ten additional infected renal hemodialysis

13       catheters, as well as one arterial and one venous catheter, were treated with an antiseptic composition consisting of tetra-sodium EDTA at concentrations of 20-100 mg/ml (2-10% w/v). The results are shown in Fig. 8.

The results demonstrate that 40 mg/ml (4% w/v) tetra-sodium EDTA is efficacious in killing, or dramatically reducing, the population of most organisms after a

20       24 hour treatment. This concentration of tetra-sodium EDTA is safe for use in connection with humans and other animals and is considered to be efficacious, and thus is a desired concentration for antiseptic compositions and methods of the present invention.

#### Example 4

25       The effect of tetra-sodium EDTA on *Acanthamoeba* and the effect of tetra-sodium EDTA treated *Klebsiella* on *Acanthamoeba*

Several species of *Acanthamoeba* are capable of infecting humans. Acanthamoebic infections often result as a consequence of improper storage of contact lenses and other medical devices that come into contact with the human body.

30       Acanthamoebae feed on bacterial populations and are resistant to many treatments. The effect of tetra-sodium EDTA, prepared as described above, on *Acanthamoeba* populations was tested as follows. Tetra-sodium EDTA compositions were also prepared using Ringers saline and physiological saline as solvents. The effect of tetra-sodium EDTA-treated *Klebsiella* on *Acanthamoeba* was also tested experimentally using the following

35       methodology.

WU 2004/108093

PCT/US2004/018009

5 The effect of tetra-sodium EDTA on *Acanthamoeba*

## Method:

- Incubate a fresh blood agar plate with *Klebsiella edwardsii* at 37°C 18 hours prior to testing.
- Using a stock solution of tetra-sodium EDTA (100 mg/mL), make a concentration of  
10 22 and 44 mg/mL in Page's saline.
- Place 9 mL of each concentration into a sterile glass test tube. Place 9 mL of sterile Page's saline into another sterile glass test tube to act as a control.
- Make a suspension of *Klebsiella edwardsii* in 6 mL sterile Page's saline. Adjust to McFarland standard 5.
- 15 • Add 1 mL of the suspension to each serial dilution and the control. Due to the dilution factor of the *Klebsiella* suspension each concentration will now be at 20 and 40 mg/mL. The control still contains no tetra-sodium EDTA. Repeat all the concentrations in physiological saline.
- Vortex to mix. Each tube should now contain a suspension of *Klebsiella* at  
20 McFarland 0.5.
- Scrape the surface of the whole of the *Acanthamoeba* plate and suspend in 1.5 mL of Page's saline. Vortex.
- Add 200 µL of the *Acanthamoeba* suspension to each serial dilution and the control.
- Place the test tubes into a 30°C incubator for 24 hours.
- 25 • After incubation centrifuge each universal for 10 minutes at 3000 rpm.
- Pour off the supernatant and resuspend the pellet.
- Place duplicate 10 µL of each dilution and the control onto a non-nutrient agar plate with a lawn of *Klebsiella*. Cut a groove down the center of each plate to prevent migration and place 10 µL of the dilution being tested on each side.
- 30 • Mark each inoculation site with a black marker pen.
- Incubate plates for 72 hours at 30 °C.
- Check for growth of *Acanthamoeba* by direct visualization of the plates using a X10 magnification eyepiece light microscope, starting at each inoculation site.

5 Table 7: Growth after 24 hours incubation with tetra-sodium EDTA

| Concentration of EDTA<br>mg/mL in (solution) | Growth of Acanthamoeba |
|----------------------------------------------|------------------------|
| 0 (Papan saline)                             | +++                    |
| 0 (Papan saline)                             | +++                    |
| 20 (Papan saline)                            | ++                     |
| 20 (Papan saline)                            | ++                     |
| 40 (Papan saline)                            | -                      |
| 40 (Papan saline)                            | -                      |
| 0 (physiological saline)                     | +++                    |
| 0 (physiological saline)                     | +++                    |
| 20 (physiological saline)                    | ++                     |
| 20 (physiological saline)                    | ++                     |
| 40 (physiological saline)                    | -                      |
| 40 (physiological saline)                    | ++                     |

Table 8: Growth after 24 hours incubation with tetra-sodium EDTA (repeat)

| Concentration of EDTA<br>(mg/mL) | Growth of Acanthamoeba    |
|----------------------------------|---------------------------|
| 0 (Papan saline)                 | +++                       |
| 0 (Papan saline)                 | +++                       |
| 20 (Papan saline)                | ++                        |
| 20 (Papan saline)                | ++ (trophozoites present) |
| 40 (Papan saline)                | -                         |
| 40 (Papan saline)                | -                         |
| 0 (physiological saline)         | +++                       |
| 0 (physiological saline)         | +++                       |
| 20 (physiological saline)        | -                         |
| 20 (physiological saline)        | -                         |
| 40 (physiological saline)        | +++                       |
| 40 (physiological saline)        | ++ (trophozoites present) |

10

Table 9: Growth after 48 hours incubation with tetra-sodium EDTA

| Concentration of EDTA<br>(mg/mL) | Growth of Acanthamoeba     |
|----------------------------------|----------------------------|
| 0 (Papan saline)                 | +++ (trophozoites present) |
| 0 (Papan saline)                 | +++ (trophozoites present) |
| 20 (Papan saline)                | -                          |
| 20 (Papan saline)                | -                          |
| 40 (Papan saline)                | -                          |
| 40 (Papan saline)                | -                          |
| 0 (physiological saline)         | +++                        |
| 0 (physiological saline)         | +++                        |

| Concentration of EDTA (mg/mL) | Growth of <i>Acanthamoeba</i> |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 20 (physiological saline)     | -                             |
| 20 (physiological saline)     | -                             |
| 40 (physiological saline)     | -                             |
| 40 (physiological saline)     | -                             |

5       The results demonstrate that 20-40 mg/ml (2-4% w/v) tetra-sodium EDTA in Page's and physiological saline is effective to reduce, or substantially eliminate, *Acanthamoeba* populations after 48 hours of exposure. Tetra-sodium EDTA compositions prepared using water as the solvent were also effective (data not shown).  
10       These results indicate that the antiseptic compositions of the present invention are suitable for application as soaking solutions for various medical instruments and devices, including contact lenses, and dental, orthodontic and/or periodontic devices. Antiseptic compositions of the present invention are also effective to substantially eliminate *Acanthamoeba* populations in other applications, including in fresh and sea water storage  
15       and distribution systems, in heating, venting and air conditioner units, humidifiers, dialysis units, and the like.

*Acanthamoeba* feed on bacterial populations. We therefore tested whether a bacterial population that was treated with antiseptic EDTA compositions of the present invention would have any effect on *Acanthamoeba* feeding on the treated bacterial  
20       population.

The effect of tetra-sodium EDTA treated *Klebsiella* on *Acanthamoeba*  
Method:

- Incubate a fresh blood agar plate with *Klebsiella edwardsii* at 37°C 18 hours prior to  
25       testing.
- Using a stock solution of tetra-sodium EDTA (100 mg/mL), make a concentration of 22 and 44mg/mL in Page's saline.
- Place 9 mL of each concentration into a sterile glass test tube. Place 9 mL of sterile Page's saline into another sterile glass test tube to act as a control.
- 30       • Make a suspension of *Klebsiella edwardsii* in 6 mL sterile Page's saline. Adjust to McFarland standard 5.
- Add 1 mL of the suspension to each serial dilution and the control. Due to the dilution factor of the *Klebsiella* suspension each concentration will now be at 20 and

WQ 2004/108093

PCT/US2004/018093

- 5 40mg/mL. The control still contains no tetra-sodium EDTA. Repeat all the concentrations in physiological saline.
- Vortex to mix. Each tube should now contain a suspension of *Klebsiella* at McFarland 0.5.
  - Incubate tubes at 37°C overnight.
- 10 • Next day, centrifuge tubes at 3000rpm for 10 minutes. Tip off supernatant; add 10 mL fresh saline or Page's saline, resuspend and re-centrifuge. Tip off supernatant and resuspend in 1 mL of either saline or Page's saline.
- Scrape the surface of the whole of the *Acanthamoeba* plate and suspend in 1.5 mL of Page's saline. Vortex.
- 15 • Add 200 µL of the *Acanthamoeba* suspension to 3 tubes containing 9 mL saline and 3 tubes containing 3 mL Page's saline. Label each tube as if they were the EDTA concentrations used in the incubation with the *Klebsiella*.
- Add the 1 mL of resuspended *Klebsiella* to the appropriate tube containing *Acanthamoeba*.
- 20 • Place the test tubes into a 30°C incubator for 24 hours.
- Set up another set of tubes to incubate *Klebsiella* with the EDTA at 37°C, overnight as before.
  - After incubation centrifuge each tube containing the *Acanthamoeba* for 10 minutes at 3000rpm.
- 25 • Pour off the supernatant and resuspend the pellet.
- Place duplicate 10 µL of each dilution and the control onto a non-nutrient agar plate with a lawn of *Klebsiella* (not incubated with EDTA). Cut a groove down the center of each plate to prevent migration and place 10 µL of the dilution being tested on each side.
- 30 • Mark each inoculation site with a black marker pen.
- Incubate plates at 30°C.
  - Check for growth of *Acanthamoeba* by direct visualization of the plates using a X 10-magnification eyepiece light microscope, starting at each inoculation site.
  - Place the remainder of the *Acanthamoeba* suspension into a fresh set of tubes containing either fresh saline or fresh Page's saline.
- 35 • Wash and resuspend the *Klebsiella*, that has been incubated overnight with the EDTA, as before and add to each appropriate tube containing the *Acanthamoeba*.



- 5     • Incubate the tubes at 30°C overnight.
- After incubation centrifuge each universal for 10 minutes at 3000rpm.
- Pour off the supernatant and resuspend the pellet.
- Place duplicate 10uL of each dilution and the control onto a non-nutrient agar plate with a lawn of Klebsiella (not incubated with EDTA). Cut a groove down the center  
10     of each plate to prevent migration and place 10uL of the dilution being tested on each side.
- Mark each inoculation site with a black marker pen.
- Incubate plates at 30 °C.
- Check for growth of Acanthamoeba by direct visualization of the plates using a  
15     X 10-magnification eyepiece light microscope, starting at each inoculation site.

Table 10: Growth of Acanthamoeba after 24 hours incubation with Klebsiella (previously incubated with EDTA)

| Concentration of EDTA (mg/mL) | Growth of Acanthamoeba |
|-------------------------------|------------------------|
| 0 (Pages saline)              | +++                    |
| 0 (Pages saline)              | --                     |
| 20 (Pages saline)             | ++                     |
| 20 (Pages saline)             | ++                     |
| 40 (Pages saline)             | ++                     |
| 40 (Pages saline)             | -                      |
| 0 (physiological saline)      | +++                    |
| 0 (physiological saline)      | +++                    |
| 20 (physiological saline)     | ++                     |
| 20 (physiological saline)     | ++                     |
| 40 (physiological saline)     | -                      |
| 40 (physiological saline)     | -                      |

Table 11: Growth of Acanthamoeba after 48 hours incubation with Klebsiella (previously incubated with EDTA)

| Concentration of EDTA (mg/mL) | Growth of Acanthamoeba |
|-------------------------------|------------------------|
| 0 (Pages saline)              | +++                    |
| 0 (Pages saline)              | +++                    |
| 20 (Pages saline)             | +                      |
| 20 (Pages saline)             | -                      |
| 40 (Pages saline)             | -                      |
| 40 (Pages saline)             | -                      |
| 0 (physiological saline)      | +++                    |
| 0 (physiological saline)      | +++                    |
| 20 (physiological saline)     | -                      |

| Concentration of EDTA (mg/mL) | Growth of <i>Acanthamoeba</i> |
|-------------------------------|-------------------------------|
| 20 (physiological saline)     | -                             |
| 40 (physiological saline)     | -                             |
| 40 (physiological saline)     | -                             |

5 These results demonstrate that growth of *Acanthamoeba* can be arrested and *Acanthamoeba* populations can be substantially eliminated by treating bacterial populations on which they feed with antiseptic EDTA compositions of the present invention. Antiseptic EDTA compositions having a tetra-sodium EDTA concentration of  
 10 from 20-40 mg/mL (2-4% w/v) were effective. This substantiates the usefulness of antiseptic compositions of the present invention for applications such as soaking solutions for various medical instruments and devices, including contact lenses and dental/orthodontic/periodontic devices, as well as for other applications such as fresh and sea water storage and distribution systems, in heating, venting and air conditioner units,  
 15 humidifiers, dialysis units, and the like.

#### Example 5,

Experiments were conducted to determine whether tetra-sodium EDTA compositions prevent the attachment of, and adherence to, silicon tubing of  
 20 microorganisms. If attachment of and adherence to silicon tubing of microorganisms can be prevented, the formation of biofilms can be reduced. The experimental protocol used and the results obtained are provided below.

#### Methods

- 25 • Fill 1cm sections of silicon tubing with molten wax to seal each endolumen, harden at 4°C.
- Place 4 sections into 30mL sterile Phosphate buffered saline (PBS) as a control. Place 8 sections into 30mL 4% tetra-sodium EDTA.
- After 30 minutes, place the 4 sections from the PBS and 4 of the sections from the  
 30 4% tetra-sodium EDTA into clean containers on a hot block, and allow to dry.
- Transfer the remaining 4 sections into 30mL sterile PBS to rinse, then allow to air dry as before.
- Once dried, place all 12 sections into 10<sup>5</sup>cfu/mL mixed organisms (overnight cultures of *Klebsiella pneumoniae* and CNS grown in nutrient broth at 37°C),  
 35 incubate at 37°C.

- 5      • After 30 minutes remove 2 sections of each type and rinse in 2 X 30mL sterile PBS. Air dry as before. Using separate washes and drying vessels for each type prevent contamination.
- Place each section into 1mL PBS in a centrifuge tube, sonicated in a sonicating water bath for 15 minutes.
- 10    • Plate out each tube, in duplicate, on the automatic plate inoculator, 50uL on a log dilution.
- Plate out duplicates of each tube diluted 1/10.
- Incubate the plates at 37°C overnight. Read colony counts on automatic plate reader ProCOL. Repeat after 6 hours.

15

The results for control and EDTA-treated catheter sections are shown below.

Table 12

| Type of catheter section | Time of incubation | Number of catheter sections | Colony count in NEAT (cfu/mL) | Colony count in 1/10 (cfu/mL) |
|--------------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Control                  | 30 min             | 1                           | 240                           | 0                             |
|                          |                    |                             | 220                           | 0                             |
| Control                  | 30 min             | 2                           | 280                           | 1                             |
|                          |                    |                             | 140                           | 0                             |
| Control                  | 6 hours            | 1                           | 1480                          | 0                             |
|                          |                    |                             | 1120                          | 0                             |
| Control                  | 6 hours            | 2                           | 5200                          | 7800                          |
|                          |                    |                             | 5467                          | 5800                          |
| Air-dried EDTA           | 30 min             | 1                           | 240                           | 1333                          |
|                          |                    |                             | 400                           | 800                           |
| Air-dried EDTA           | 30 min             | 2                           | 267                           | 0                             |
|                          |                    |                             | 720                           | 0                             |
| Air-dried EDTA           | 6 hours            | 1                           | 1280                          | 16800                         |
|                          |                    |                             | 1120                          | 9800                          |
| Air-dried EDTA           | 6 hours            | 2                           | 2240                          | 21333                         |
|                          |                    |                             | 2140                          | 16000                         |
| Rinsed EDTA              | 30 min             | 1                           | 267                           | 0                             |
|                          |                    |                             | 379                           | 0                             |
| Rinsed EDTA              | 30 min             | 2                           | 1040                          | 0                             |
|                          |                    |                             | 0                             | 0                             |
| Rinsed EDTA              | 6 hours            | 1                           | 1980                          | 9600                          |
|                          |                    |                             | 1740                          | 12800                         |
| Rinsed EDTA              | 6 hours            | 2                           | 3600                          | 19000                         |
|                          |                    |                             | 3660                          | 8600                          |

5 The results for the neat EDTA solution were found to be more reproducible, and these were therefore analysed further. As sections were placed in 1 mL solution, counts per mL are equal to counts per section.

10 Table 13

| Type of catheter section | Mean colony count after 30 minutes (cfu/section) | Mean colony count after 6 hours (cfu/section) |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Control                  | 880                                              | 3317                                          |
| Air-dried EDTA           | 407                                              | 1745                                          |
| Rinsed EDTA              | 421                                              | 2745                                          |

15 Table 14

| Type of catheter section | Mean % reduction in cfu/section from the control after 30 minutes | Mean % reduction in cfu/section from the control after 6 hours |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Air-dried EDTA           | 53.8 %                                                            | 47.4 %                                                         |
| Rinsed EDTA              | 52.2 %                                                            | 17.3 %                                                         |

Repeated over 24 hours with Klebsiella + CNS:

20 Table 15

| Type of catheter section | Mean colony count after 30 minutes (cfu/section) | Mean colony count after 6 hours (cfu/section) | Mean colony count after 24 hours (cfu/section) |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Control                  | 377                                              | 9205                                          | 105806                                         |
| Air-dried EDTA           | 273                                              | 3720                                          | 70370                                          |
| Rinsed EDTA              | 474                                              | 9499                                          | 77051                                          |

25 Table 16

| Type of catheter section | Mean % reduction in cfu/section from the control after 30 minutes | Mean % reduction in cfu/section from the control after 6 hours | Mean % reduction in cfu/section from the control after 24 hours |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Air-dried EDTA           | 27.4%                                                             | 59.6%                                                          | 33.5%                                                           |
| Rinsed EDTA              | +25.7%                                                            | +31.9%                                                         | 27.2%                                                           |

+ Denotes increase in mean cfu/section from control

44

000044

5 Results for *Pseudomonas aeruginosa*:

Table 17

| Type of catheter section | Mean colony count after 30 minutes (cfu/section) | Mean colony count after 6 hours (cfu/section) | Mean colony count after 24 hours (cfu/section) |
|--------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Control                  | 6400                                             | 341994                                        | 1290000                                        |
| Air-dried EDTA           | 4108                                             | 30000                                         | 474494                                         |
| Rinsed EDTA              | 5200                                             | 153758                                        | 1150000                                        |

Table 18

| Type of catheter section | Mean % reduction in cfu/section from the control after 30 minutes | Mean % reduction in cfu/section from the control after 6 hours | Mean % reduction in cfu/section from the control after 24 hours |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Air-dried EDTA           | 35.8                                                              | 91.2                                                           | 63.2                                                            |
| Rinsed EDTA              | 18.8                                                              | 55.0                                                           | 10.9                                                            |

These results demonstrate at least a short term reduction in bacterial populations on both air-dried and rinsed catheter sections.

Example 6

Altered MBC values when tetra-sodium EDTA is combined with ethanol

Solutions having a range of tetra-sodium EDTA concentrations (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 8 mg/ml, w/v) were formulated with water and ethanol (to achieve final ethanol concentrations of 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 and 40% in water) to test the efficacy of EDTA solutions alone, alcohol solutions alone, and EDTA/alcohol solutions. Concentrated stock solutions of tetra-sodium EDTA were prepared in distilled water and ethanol was added to the concentrated aqueous stock solutions to provide the appropriate ethanol concentration.

Method:

- Culture an organism in nutrient broth overnight at 37°C.
- Stock solutions of alcohol and tetra-sodium EDTA are used to fill in a grid pattern in 96 well plates (one per culture), using EDTA solutions having 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 and 8 mg/ml tetra-sodium concentration, w/v, in isopropyl alcohol solvents containing 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 and 40% alcohol, w/v, in water.
- Each well contains 150  $\mu$ L of each diluent and 50  $\mu$ L of organism at  $1 \times 10^8$  cfu/ml.

- 3     • At time periods of 5 minutes, 6 hours and 24 hours each well is cultured by placing a 96 pla lid over the plate (and into each well) then transferring the lid to a 96 well plates, containing 300uL fresh nutrient broth in each well. Incubate overnight at 37°C. Incubate each inoculum plate at 37°C during incubation period.
- 6     • Record the turbidity of each well after 24 hours.

10

The results for several organisms are shown below.

Table 19

| Organism              | MBC tetra-sodium EDTA (mg/mL) | MBC alcohol (%) | MBC tetra-sodium EDTA (mg/mL) + alcohol (%) |
|-----------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|
| E. coli               | 3                             | 10              | 0.5 and 0.5                                 |
| Proctus sp.           | 3                             | 10              | 2 and 1                                     |
| CNS (I)               | 8                             | 10              | 2 and 1                                     |
| Klebsiella sp.        | 8                             | 10              | 1 and 1                                     |
| Staphylococcus aureus | 0.1                           | 0.1             | 0.1 and 0.1                                 |
| Pseudomonas sp.       | 2                             | 10              | 2 and 1                                     |
| CNS (II)              | 8                             | 10              | 0.5 and 0.5                                 |

15     Tetra-sodium EDTA solutions in water were more effective in killing the microorganisms tested than were the ethanol (alone) solutions. Combination tetra-sodium EDTA in alcohol solutions killed the microorganisms tested at the lowest concentrations. The 2 mg/ml (0.2 w/v) tetra-sodium EDTA in 1% alcohol solution provided excellent results and had a bactericidal effect on all organisms tested. This antiseptic solution is effective at lower concentrations of tetra-sodium EDTA and ethanol than either tetra-

20     sodium EDTA solutions in water alone or ethanol alone. Furthermore, it is cost effective, safe and convenient to make and use. Antiseptic compositions of the present invention for topical application thus comprehend EDTA salts in a mixed aqueous solvent and ethanol.

25

#### Example 7

##### Solubility of tetra-sodium EDTA in ethanol and effect on pH

The solubility of tetra-sodium EDTA in ethanol was tested, and the pH of various tetra-sodium solutions in alcohol solvents was measured.

30

##### Method:

- Tetra-sodium EDTA was weighed out in duplicates through the range 10 – 100 mg in 1.5 mL size Eppendorf tubes. 1 mL of 74% ethanol was added to each tube

WO 2004/109093

PCT/AU2004/0118009

and vortexed for 30s.

- To the duplicate set of weighed tetra-sodium EDTA, 0.5 ml sterile distilled water was added and vortex mixed, followed by 0.5 ml of 74% ethanol.
- Each of the tubes of tetra-sodium EDTA was tested for pH where solubility was observed.

10

The experimental results demonstrated that tetra-sodium EDTA was completely fusible in a 74% ethanol solution. The results furthermore demonstrated that, when tetra-sodium was dissolved in distilled water in concentrations in the range of 10 – 100 mg/ml, w/v, the tetra-sodium EDTA remained in solution upon addition of ethanol. A preferred technique thus involves solubilizing EDTA salt(s) in an aqueous solution first, and then adding ethanol or another solvent in which the EDTA salt(s) are less soluble or insoluble. Prepared in this fashion, EDTA salt solutions are expected to be stable over time. The measured pH values for various solutions were as follows:

|    |                            |          |
|----|----------------------------|----------|
| 20 | 74% ethanol, alone         | pH 7.8   |
|    | Water                      | pH 7.1   |
|    | + 10 mg tetra-sodium EDTA  | pH 9.0   |
|    | + 20 mg tetra-sodium EDTA  | pH 10.8  |
|    | + 40 mg tetra-sodium EDTA  | pH 11    |
| 25 | + 80 mg tetra-sodium EDTA  | pH 11.15 |
|    | + 100 mg tetra-sodium EDTA | pH 11.25 |

#### Example 8

30 Effect of autoclaving at 121°C on tetra-sodium EDTA solutions

We tested the effect of autoclaving on tetra-sodium EDTA solutions to determine whether autoclaving could be used to sterilize tetra-sodium EDTA solutions prior to use. The methodology used and results are described below.

#### 35 Method:

- Make duplicates of 0, 20, 80 and 100mg/mL of tetra-sodium EDTA in sterile water and sterile, molten nutrient agar at 50°C.
- Leave one set at room temperature (not heated) and autoclave one set (heated).
- Next day place all agar bottles in a steamer to melt for 40 minutes.

40

5 **Measuring the zones of diffusion:**

- Using a cork borer, punch out two holes in 16 fresh blood agar plates.
- Make a 0.5 McFarland suspension of CNS and spread using a sterile swab over the plates to create a lawn.
- Pipette 150ul. of each of the Tetra-sodium solutions into duplicate punched out holes
- 10 and incubate at 37°C overnight.
- Next day measure the zones of diffusion and record the results.

The results, measured in zone sizes (mm), are presented below. The zone sizes of the controls were plotted against concentration, to allow determination of actual EDTA

15 concentrations in the test samples, which are also presented below. These results demonstrate that autoclaving of tetra-sodium EDTA compositions, whether in sterile water or in agar, does not materially affect the antimicrobial activity of the tetra-sodium EDTA compositions.

20 **Table 20: Zone sizes in mm**

| Concentration of EDTA mg/mL | EDTA in Sterile Water (control) | EDTA in autoclaved Sterile Water | EDTA in Agar | EDTA in autoclaved Agar |
|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------------|
| 0                           | 0                               | 0                                | 0            | 0                       |
| 20                          | 13.2                            | 11.6                             | 13.5         | 12.7                    |
| 80                          | 16.1                            | 15.2                             | 17.2         | 15.3                    |
| 100                         | 17.1                            | 17.0                             | 17.1         | 16.4                    |

25 **Table 21: Actual concentration of EDTA**

| Concentration of initial EDTA mg/mL | EDTA in Sterile Water (control) | EDTA in autoclaved Sterile Water | EDTA in Agar | EDTA in autoclaved Agar |
|-------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------|-------------------------|
| 0                                   | 0                               | 0                                | 0            | 0                       |
| 20                                  | 20                              | 16                               | 26           | 19                      |
| 80                                  | 80                              | 60                               | 101          | 62                      |
| 100                                 | 100                             | 98                               | 100          | 83                      |



5 **Example 9**

**Effect of autoclaving at 121°C on different formulations of EDTA**

We tested the effect of autoclaving on different formulations of EDTA solutions to determine whether autoclaving could be used to sterilize various EDTA solutions prior to use. The methodology used and results are described below.

10

**Method:**

**Make up the agar**

- Place 50 mL of Nutrient agar solution into 7X 100mL sterile glass bottles.
- Add no EDTA powder to the first bottle (labeled 0)
- 15 • Add 2000 mg of EDTA powder to the second bottle (labeled 40mg/mL auto)
- Add 4000 mg of EDTA powder to the third bottle (labeled 80mg/mL auto)
- Add 5000 mg of EDTA powder to the fourth bottle (labeled 100mg/mL auto)
- Add no EDTA to bottles five, six and seven (but label them 40, 80 and 100mg/mL NON autoclaved), leave at room temperature.
- 20 • Do this for each EDTA formulation to test, and autoclave all bottles, marker auto, at 121°C for 20 minutes.
- Next day, place all bottles in a steam bath to melt the agar for pouring.
- Once melted, allow to cool to 50 °C before adding the appropriate amount of EDTA to the bottles labeled NON autoclaved. All bottles are now ready to be tested.

25

**Measuring the zones of diffusion**

- Using a cork borer, punch out 2 holes in 7 fresh blood agar plates.
- Make a 0.5 McFarland suspension of CNS and spread using a sterile swab over the plates to create a lawn.
- 30 • Pipette 150 ul of each bottle into 2 separate 'punched out holes' and incubate at 37°C overnight.
- Do this for each EDTA formulation.
- Next day measure the zones of diffusion and record results. Duplicate holes were used and 2 measurements per zone were made.

35

Cupric and ferric EDTA solutions did not produce any zones. The effect of heat upon these solutions therefore cannot be measured using this method. The same sizes

WFO 2004/100093

PCT/DK2004/010009

5 measured for di-ammonium EDTA, di-potassium EDTA and magnesium EDTA solutions are provided below. The zone sizes of the controls (no heat) were plotted against concentration to allow determination of actual EDTA concentrations in the test (heated) samples, and results are provided below.

10 Table 21: Zone sizes (mm)

| Concentra-<br>tion of<br>EDTA<br>(mg/mL) | Di-<br>ammoniu<br>m EDTA<br>No heat | Di-<br>ammoniu<br>m EDTA<br>Heated | Di-<br>potassium<br>EDTA<br>No heat | Di-<br>potassium<br>EDTA<br>Heated | Magnesi-<br>um EDTA<br>No heat | Magnesi-<br>um EDTA<br>Heated |
|------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 0                                        | 0                                   | 0                                  | 0                                   | 0                                  | 0                              | 0                             |
|                                          | 0                                   | 0                                  | 0                                   | 0                                  | 0                              | 0                             |
|                                          | 0                                   | 0                                  | 0                                   | 0                                  | 0                              | 0                             |
|                                          | 0                                   | 0                                  | 0                                   | 0                                  | 0                              | 0                             |
| 40                                       | 18.3                                | 17.9                               | 16.2                                | 15.5                               | 6.8                            | 10.6                          |
|                                          | 18.3                                | 17.9                               | 16.2                                | 15.5                               | 6.8                            | 10.6                          |
|                                          | 18.3                                | 17.9                               | 16.2                                | 15.5                               | 6.8                            | 10.6                          |
|                                          | 18.3                                | 17.9                               | 16.2                                | 15.5                               | 6.8                            | 10.6                          |
| 80                                       | 19.7                                | 19.7                               | 18.9                                | 18.3                               | 10.0                           | 10.8                          |
|                                          | 19.7                                | 19.7                               | 18.9                                | 18.3                               | 10.0                           | 10.8                          |
|                                          | 19.7                                | 19.7                               | 18.9                                | 18.3                               | 10.0                           | 10.8                          |
|                                          | 19.7                                | 19.7                               | 18.9                                | 18.3                               | 10.0                           | 10.8                          |
| 100                                      | 20.0                                | 20.6                               | 18.2                                | 20.0                               | 8.3                            | 11.8                          |
|                                          | 20.0                                | 20.6                               | 18.2                                | 20.0                               | 8.3                            | 11.8                          |
|                                          | 20.0                                | 20.6                               | 18.2                                | 20.0                               | 8.3                            | 11.8                          |
|                                          | 20.0                                | 20.6                               | 18.2                                | 20.0                               | 8.3                            | 11.8                          |

Table 22: Actual values of autoclaved EDTA

15

| Concentration of<br>EDTA mg/mL | Di-ammonium<br>EDTA heated | Di-potassium EDTA<br>heated | Magnesium EDTA<br>heated |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 0                              | 0                          | 0                           | 0                        |
| 40                             | 39                         | 38                          | >140                     |
| 80                             | 80                         | 71                          | >140                     |
| 100                            | 150                        | >140                        | >140                     |

20

The results demonstrate that autoclaving did not diminish the efficacy of most EDTA salt compositions. Autoclaving of antiseptic compositions of the present invention may therefore be carried out following preparation to provide sterile antiseptic compositions.

5

**Example 10**

**pH Values of EDTA salts, calcium chloride and sodium citrate**

The pH values of various EDTA salt, calcium chloride and sodium citrate solutions, using distilled water as the solvent and at specified concentrations, were measured. The results are shown below.

10

15

20

|                                      |         |
|--------------------------------------|---------|
| Free acid EDTA 10%                   | pH 4.7  |
| Di-ammonium EDTA 10%                 | pH 4.38 |
| Calcium Sodium EDTA 10%              | pH 6.68 |
| Di-potassium EDTA 10%                | pH 4.5  |
| Copper EDTA 10%                      | pH 6.15 |
| Tetra-sodium EDTA 10%                | pH 11.6 |
| Tetra-sodium EDTA 2%                 | pH 11   |
| Calcium chloride neutralized TS EDTA | pH 7.3  |
| Calcium chloride, 1 molar            | pH 3.8  |
| Sodium citrate 50%, 25%              | pH 8.5  |

**Example 11**

**Confirmation of the anti-coagulant properties of EDTA solutions**

25

The anti-coagulant properties of EDTA solutions were verified using the following methodology.

**Method:**

30

- 100µl aliquots of a range of concentrations (0.5-100mg/ml) of tetra-sodium or di-sodium EDTA solutions, adjusted to a pH of 11.0-11.6, were placed in plastic capped tubes.
- 900µL of fresh blood from healthy volunteers was added to each aliquot of EDTA solution and mixed gently by inversion of the blood tubes at regular intervals.

35

The results revealed that control tubes containing blood without EDTA solution had clotting times of 10-23 minutes. Tubes containing di-sodium EDTA solutions all had clotting times in excess of 5 days. Tetra-sodium EDTA tubes having a concentration greater than 1 mg/mL had clotting times in excess of 5 days. Tetra-sodium EDTA tubes having a concentration of 0.5 mg/mL clotted in 28 minutes. Tetra-sodium EDTA is

40

therefore effective as an anticoagulant at concentrations in excess of 1 mg/ml (1% w/v).

W/O 2004/108093

PCT/US2004/018089

5

**Example 12****Osmolarity of Tetra-sodium Salt Suspensions**

The osmolarity and red cell lysis of tetra-sodium EDTA solutions in water and physiological saline having various concentrations was tested using standard laboratory techniques. Red cell lysis was tested by adding 50 ul EDTA blood in 2 ml each concentration of each solution for 2 hours. The Plasma Osmolarity range was 275-295 m/osmol.

10

**Table 23**

|                                         | Osmolarity<br>(m/osmol) | Red Cell Lysis |
|-----------------------------------------|-------------------------|----------------|
| 2% Tet Sod EDTA in Dist Water           | 142                     | ++             |
| 4% Tet Sod EDTA in Dist Water           | 277                     | +              |
| 2% Tet Sod EDTA in Physiological Saline | 219                     | +/-            |
| 4% Tet Sod EDTA in Physiological Saline | 588                     | -              |

15

**Example 13****Efficacy of three EDTA Salts on the dissolution of Artificial Urine Crystals (ADC)**

One problem with urinary catheters is that urine crystals tend to accumulate on the surface of the catheter. The deposit of urine crystals may promote microbial colonization and/or the formation of biofilms, as well as reducing flow through the catheter. It would therefore be desirable to use a sanitizing composition in connection with urinary catheters that reduces the formation of urine crystals. The efficacy of three EDTA salt solutions on the dissolution of artificial urine crystals was tested using the methodology described below.

20

**Materials:**

- Artificial urine in 25ml plastic universal container with access, incubated at 45°C for 7 days.
- di-ammonium, di-potassium and tetra-sodium EDTA solutions at 100mg/ml.

25

**Method:**

- Centrifuge artificial urine crystals at 4000 rpm for 2 mins.
- Decant supernatant and wash crystals in water followed by centrifugation.

WD 2004/000033

PCT/US2004/018009

- 5      • Resuspend crystals to 1 ml in water and aliquot 200ul into four universal containers.
- Add 4 ml 100 mg/ml solution of each EDTA salt and water as a control in each universal at room temp.
- 10      • After 1, 2 and 3 hours visually observe dissolution of crystals compared to the control.

The results are shown below. All of the EDTA salt solutions reduced the urine crystal deposit compared to an aqueous solution. EDTA salt solutions are therefore suitable for use with urinary catheters.

15

Table 24

| Solution                | Crystal Deposit |
|-------------------------|-----------------|
| Water + AUC             | ++++            |
| Tetra-sodium EDTA + AUC | ++              |
| Di-ammonium EDTA + AUC  | +               |
| Di-potassium EDTA + AUC | +/              |

20

All references cited herein, including patent references and non-patent publications, are hereby incorporated by reference in their entirety.

25      While in the foregoing specification this invention has been described in relation to certain preferred embodiments, and many details have been set forth for purposes of illustration, it will be apparent to those skilled in the art that the invention is susceptible to additional embodiments and that certain of the details described herein may be varied considerably without departing from the basic principles of the invention.

## We claim:

1. An antiseptic solution comprising at least one salt of ethylenic diamine tetracetic acid (EDTA) at a concentration of at least 0.01% w/v and at least one solvent, wherein the solution has a pH of at least 8.0 and possesses bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria.
2. The solution of claim 1, wherein the solution has a pH between 8.5 and 12.5.
3. The solution of claim 2, wherein the solution has a pH between 9.5 and 11.5.
4. The solution of claim 3, wherein the solution has a pH between 10.5 and 11.5.
5. The solution of claim 1, wherein the at least one salt of EDTA is selected from the group consisting of: di-sodium EDTA; tri-sodium EDTA; tetra-sodium EDTA; ammonium EDTA; di-ammonium EDTA; potassium EDTA; di-potassium EDTA; cupric di-sodium EDTA; magnesium di-sodium EDTA; ferric sodium EDTA; and combinations thereof.
6. The solution of claim 5, wherein the at least one salt of EDTA is selected from the group consisting of: tri-sodium EDTA; tetra-sodium EDTA; and combinations thereof.
7. The solution of claim 1, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.2 % w/v to 10.0% w/v.
8. The solution of claim 7, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.2 % to 6.0 % w/v.
9. The solution of claim 8, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.2 % to 4.0 % w/v.
10. The solution of claim 1, wherein the solvent is selected from the group consisting of: water; saline; alcohols; and combinations thereof.
11. The solution of claim 10, wherein the solvent is a combination of water and ethanol.
12. The solution of claim 11, wherein the solution comprises ethanol in an amount of 0.1% to 10% w/v.
13. The solution of claim 1, wherein the solution possesses bactericidal activity against bacteria in planktonic forms and in sessile forms.
14. The solution of claim 1, wherein the solution further possesses at least one property selected from the group consisting of:
  - (a) anticoagulant activity;
  - (b) fungicidal activity against fungal pathogens;

- (c) inhibitory activity against protozoan infections;
  - (d) inhibitory activity against amoebic infections;
  - (e) safe and biocompatible, at least in modest volumes, in contact with a patient;
  - (f) safe and biocompatible, at least in modest volumes, in a patient's bloodstream; and
  - (g) safe and compatible with industrial objects and surfaces.
14. The solution of claim 1, wherein the solution is sterile and pyrogen-free.
15. A dry form of the antiseptic solution of claim 1 that, upon reconstitution with a solvent, forms the solution of claim 1.
16. A formulation of the solution of claim 1 that is suitable for topical application to surfaces and objects.
17. A time release formulation of the solution of claim 1 that provides antiseptic activity over an extended period of time.
18. An antiseptic solution comprising a solvent and at least one sodium EDTA salt at a concentration of between 0.01% and 15% w/v, wherein the solution has a pH of at least 9.0 and possesses bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria.
19. The solution of claim 15, wherein the solvent is selected from the group consisting of: water; saline; alcohols; and combinations thereof.
20. An antiseptic solution consisting essentially of at least one salt of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) at a concentration of at least 0.01% w/v and at least one solvent, wherein the solution has a pH of at least 8.0 and possesses bactericidal activity against a broad spectrum of bacteria.
21. The solution of claim 20, wherein the solution has a pH between 8.5 and 12.5.
22. The solution of claim 20, wherein the solution has a pH between 9.5 and 11.5.
23. The solution of claim 20, wherein the solution has a pH between 10.5 and 11.5.
24. The solution of claim 20, wherein the at least one salt of EDTA is selected from the group consisting of: di-sodium EDTA; tri-sodium EDTA; tetra-sodium EDTA; ammonium EDTA; di-ammonium EDTA; potassium EDTA; di-potassium EDTA; cupric di-sodium EDTA; magnesium di-sodium EDTA; ferric sodium EDTA; and combinations thereof.
25. The solution of claim 24, wherein the at least one salt of EDTA is selected from the group consisting of: tri-sodium EDTA; tetra-sodium EDTA; and combinations thereof.

WO 2004/108493

PCT/US2004/018493

26. The solution of claim 20, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.02 % w/v to 10.0 % w/v.
27. The solution of claim 26, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.02 % to 6.0 % w/v.
28. The solution of claim 27, wherein the at least one salt of EDTA is present at a concentration of 0.02 % to 4.0 % w/v.
29. The solution of claim 20, wherein the solvent is selected from the group consisting of: water, saline, alcohols, and combinations thereof.
30. The solution of claim 29, wherein the solvent is a combination of water and ethanol.
31. The solution of claim 29, wherein the solution comprises ethanol in an amount of 0.1% to 10% w/v.
32. The solution of claim 20, wherein the solution possesses bactericidal activity against bacteria in planktonic forms and in sessile forms.
33. A method for inhibiting the growth and proliferation of a population of at least one undesirable microorganism on a surface or on or within an object, comprising contacting the surface or object with a solution of any one of claims 1-32.
34. The method of claim 33, wherein the undesirable microorganism is selected from the group consisting of: microbial populations; fungal pathogens; protozoan populations; and anaerobic populations.
35. The method of claim 34, wherein the undesirable microorganism is *Acetabularia*.
36. The method of claim 33, wherein the surface or object is selected from the group consisting of: catheters; medical tubes and conduits; intravascular devices; implanted medical devices; medical and veterinary instruments; contact lenses; optical implants; dental, orthodontic and periodontal devices; water storage, distribution and treatment facilities; industrial equipment; and food preparation and processing equipment.
37. A method for inhibiting the growth and proliferation of a biofilm, comprising contacting the biofilm with a solution of any one of claims 1-32.
38. A covering for use in wound healing, wherein the covering is impregnated with a solution of any one of claims 1-32.



PCT/US2004/018093

WO 2004/108093

1/16

FIGURE 1A

| Organism ID            | Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium EDTA |     | Di-sodium EDTA |      | Tri-sodium EDTA |      | Tetra-sodium EDTA |      |
|------------------------|-------------------|-----|------------------|-----|----------------|------|-----------------|------|-------------------|------|
|                        | MIC               | MBC | MIC              | MBC | MIC            | MBC  | MIC             | MBC  | MIC               | MBC  |
| S24 Staph. epidermidis | <0.5              | 8   | <0.5             | 4   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| 31 Staph. epidermidis  | <0.5              | 8   | <0.5             | 8   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| 301 Staph. xylosum     | <0.5              | 6   | <0.5             | 4   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | 20   |
| 300 Staph. capitis     | <0.5              | 10  | <0.5             | 8   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | 10   |
| J46 Staph. lentus      | <0.5              | 10  | <0.5             | 10  | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| S24 Staph. capitis     | <0.5              | 8   | <0.5             | 10  | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| R8 Staph. aureus       | <0.5              | 8   | <0.5             | 10  | <0.5           | 1    | <0.5            | 1.5  | <0.5              | 1    |
| 72 S. aureus           | 1                 | 6   | 1                | 6   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| R57 S. aureus          | 1                 | 8   | 1                | 10  | <0.5           | 10   | <0.5            | <0.5 | <0.5              | 8    |
| R13 S. aureus          | 1                 | 6   | 1                | 15  | <0.5           | 10   | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| R30 S. aureus          | 1                 | 8   | 1                | 15  | <0.5           | 10   | <0.5            | <0.5 | —                 | —    |
| 8 S. aureus            | 1                 | 8   | 1                | 10  | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | —                 | —    |
| R64 MRSA               | 1                 | 6   | 1                | 8   | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |

FIGURE 1B

| Organism ID                 | Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium EDTA |     | Di-sodium EDTA |      | Tri-sodium EDTA |      | Tetra-sodium EDTA |      |
|-----------------------------|-------------------|-----|------------------|-----|----------------|------|-----------------|------|-------------------|------|
|                             | MIC               | MBC | MIC              | MBC | MIC            | MBC  | MIC             | MBC  | MIC               | MBC  |
| R51 MRSA                    | 1                 | 10  | 1                | 6   | <0.5           | 1    | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| R92 MRSA                    | 1                 | 8   | 1                | >15 | <0.5           | 10   | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| S93 MRSA                    | 1                 | 8   | 1                | 10  | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| J67 MRSA                    | 1                 | 8   | 1                | 10  | <0.5           | 10   | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| R2 VRE                      | <0.5              | 8   | <0.5             | 15  | <0.5           | 100  | <0.5            | 20   | <0.5              | 30   |
| Woods VRE                   | 1                 | 8   | 1                | >15 | <0.5           | 100  | <0.5            | 2    | <0.5              | 1    |
| S77 Enterococcus Faecium    | <0.5              | 8   | <0.5             | 15  | <0.5           | 100  | <0.5            | 20   | <0.5              | 6    |
| S76 Enterococcus faecalis   | 1                 | 15  | 1                | 15  | <0.5           | 100  | <0.5            | 1.5  | <0.5              | 40   |
| 68 Klebsiella pneumoniae    | 1.5               | 15  | 4                | >10 | 8              | 60   | 20              | 40   | 6                 | 6    |
| R51 Klebsiella pneumoniae   | 1                 | 15  | 1.5              | >10 | —              | —    | —               | —    | —                 | —    |
| 128 Klebsiella oxytoco      | 1                 | 15  | 1                | >10 | 1              | 90   | 4               | 20   | 4                 | 6    |
| J7 Klebsiella ornitholytica | 1                 | >15 | 1                | >10 | 1              | 60   | 20              | 70   | 4                 | 8    |
| 250 E. coli                 | 1                 | >15 | 1                | >10 | 1.5            | 80   | 10              | 20   | 1.5               | 1.5  |
| B/C E. coli                 | 1                 | 15  | 1.5              | >10 | —              | —    | —               | —    | —                 | —    |

PCTUS2004/01809

WO 2004/06193

2/16

FIGURE 1C

| Organism ID                        | Di-potassium EDTA |       | Di-ammonium EDTA |      | Di-sodium EDTA |      | Tri-sodium EDTA |      | Tetra-sodium EDTA |      |
|------------------------------------|-------------------|-------|------------------|------|----------------|------|-----------------|------|-------------------|------|
|                                    | MIC               | MBC   | MIC              | MBC  | MIC            | MBC  | MIC             | MBC  | MIC               | MBC  |
| 137 <i>E. coli</i>                 | 1                 | 15    | 4                | >10  | 4              | 60   | 4               | 10   | 2                 | 2    |
| 292 <i>Ent. cloacae</i>            | 4                 | 15    | 4                | >10  | 4              | >100 | 20              | 20   | 6                 | 15   |
| 190 <i>Ent. cloacae</i>            | 4                 | >15   | 4                | >10  | 4              | 100  | 20              | 20   | 6                 | 15   |
| J21 <i>Ent. cloacae</i>            | 6                 | >15   | <0.5             | >10  | 6              | >100 | 20              | 20   | 6                 | 10   |
| K4 <i>Steno. maltophilia</i>       | <0.5              | 10    | 1                | >10  | —              | —    | —               | —    | —                 | —    |
| B/C <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 1                 | >15   | 1                | >10  | —              | —    | —               | —    | —                 | —    |
| J20 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | 1                 | >15   | 1                | >10  | <0.5           | 50   | 4               | 20   | 2                 | 4    |
| J26 <i>Pseudomonas sp.</i>         | 1                 | 15    | <0.5             | >10  | <0.5           | 25   | 4               | 60   | 8                 | 4    |
| K75 <i>Coryne. amycolactes</i>     | <0.5              | <0.5  | <0.5             | 1    | NG             | NG   | NG              | NG   | <0.5              | 20   |
| K23 <i>Coryne. streptomy</i>       | <0.5              | <0.5  | <0.5             | 1    | NG             | NG   | NG              | NG   | <0.5              | <0.5 |
| K77 <i>Acinetobacter baumannii</i> | <0.5              | <0.5  | <0.5             | <0.5 | <0.5           | <0.5 | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |
| J44 <i>Acinetobacter baumannii</i> | <0.5              | 60-70 | <0.5             | >10  | <0.5           | 1    | <0.5            | <0.5 | <0.5              | <0.5 |

316

FCT119200-041809

WFO 2014/111803

PCT/US2004/18009

FIGURE 1D

| Organism ID                  | Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium EDTA |     | Di-sodium EDTA |     | Tri-sodium EDTA |     | Tetra-sodium EDTA |     |
|------------------------------|-------------------|-----|------------------|-----|----------------|-----|-----------------|-----|-------------------|-----|
|                              | MIC               | MBC | MIC              | MBC | MIC            | MBC | MIC             | MBC | MIC               | MBC |
| R16 <i>Proteus mirabilis</i> | <0.5              | >15 | <0.5             | >10 | <0.5           | 50  | <0.5            | 40  | <0.5              | 15  |
| R81 <i>Proteus vulgaris</i>  | 1                 | >15 | <0.5             | >10 | <0.5           | 15  | <0.5            | 40  | <0.5              | 8   |
| R26 <i>Proteus mirabilis</i> | <0.5              | 15  | <0.5             | >10 | <0.5           | 50  | <0.5            | 60  | 1                 | 15  |

4/16

WO 2004/18009

000000

PCT/US2004/018099

WD 2004/788693

5/16

FIGURE 2

| Organism ID                        | Tetra-sodium<br>MBC | Tetra-sodium<br>MBC | Di-potassium<br>MBC | Di-potassium<br>MBC | Di-ammonium<br>MBC | Di-ammonium<br>MBC |
|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| J96 <i>Candida albicans</i>        | 0.5                 | 15                  | 0.5                 | >100                | 0.5                | >100               |
| J92 <i>Candida albicans</i>        | 0.5                 | 15                  | 0.5                 | >100                | 0.5                | >100               |
| Myc. <i>Candida albicans</i>       | 0.5                 | 0.5                 | 0.5                 | >100                | 0.5                | >100               |
| T98 <i>Candida lusitanae</i>       | 0.5                 | 6                   | 0.5                 | >100                | 0.5                | >100               |
| Myc. <i>Candida tropicalis</i>     | 0.5                 | 10                  | 1                   | >100                | .1                 | 100                |
| Myc. <i>Candida Guilliermondii</i> | 0.5                 | 0.5                 | 0.5                 | >100                | 0.5                | >100               |
| Myc. <i>Candida glabrata</i>       | 0.5                 | 2                   | 0.5                 | >100                | 0.5                | 90                 |
| Myc. <i>Candida parapsilosis</i>   | 0.5                 | 8                   | 0.5                 | >100                | 0.5                | 100                |
| J96 <i>Candida glabrata</i>        | 0.5                 | 8                   | 0                   | 100                 | 0.5                | >100               |

000067

PCT/US2014/018099

WO 2014/18099

6/16

FIGURE 3A

| Organism ID               | Cupric Di-sodium EDTA |      | Magnesium Di-sodium EDTA |     | Ferric sodium EDTA |     |
|---------------------------|-----------------------|------|--------------------------|-----|--------------------|-----|
|                           | MIC                   | MBC  | MIC                      | MBC | MIC                | MBC |
| S24 Staph. epidermidis    | <0.5                  | <0.5 | 6                        | 30  | >20                | >30 |
| 31 Staph. epidermidis     | <0.5                  | <0.5 | 6                        | 30  | >20                | >30 |
| 301 Staph. xylinus        | <0.5                  | <0.5 | 2                        | >30 | >20                | >30 |
| 300 Staph. capitis        | <0.5                  | <0.5 | 1.5                      | >30 | >20                | >30 |
| J46 Staph. leucis         | <0.5                  | <0.5 | 6                        | >30 | >20                | >30 |
| S24 Staph. capitis        | <0.5                  | <0.5 | 6                        | >30 | >20                | >30 |
| R8 Staph. aureus          | <0.5                  | <0.5 | 1.5                      | >30 | >20                | >30 |
| 72 S.aureus               | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R57 S.aureus              | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R13 S.aureus              | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R30 S.aureus              | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| 8 S.aureus                | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R64 MRSA                  | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R51 MRSA                  | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| R92 MRSA                  | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| S93 MRSA                  | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| J67 MRSA                  | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| M8 VRE                    | <0.5                  | <0.5 | 25                       | >30 | 2                  | >30 |
| Woods VRE                 | >30                   | >30  | >30                      | >30 | >20                | >30 |
| S77 Enterococcus faecium  | <0.5                  | <0.5 | 1.5                      | >30 | 4                  | >30 |
| S76 Enterococcus faecalis | <0.5                  | <0.5 | >30                      | >30 | 4                  | >30 |
| 68 Klebsiella pneumoniae  | >30                   | >30  | >30                      | >30 | >15                | >15 |
| R51 Klebsiella pneumoniae | >30                   | >30  | >30                      | >30 | 15                 | >15 |

PC700200000000

000000000000

7/16

FIGURE 3B

| Organism<br>ID              | Cupria<br>Di-sodium EDTA |      | Magnesium Di-sodium<br>EDTA |      | Ferric sodium EDTA |     |
|-----------------------------|--------------------------|------|-----------------------------|------|--------------------|-----|
|                             | MIC                      | MBC  | MIC                         | MBC  | MIC                | MBC |
| 128 Klebsiella oxytoca      | >30                      | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| J7 Klebsiella ornitholytica | >30                      | >30  | >30                         | >30  | 15                 | >15 |
| 250 E. coli                 | >30                      | >30  | >30                         | >30  | 15                 | >15 |
| B/C E. coli                 | 6                        | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| 137 E. coli                 | >30                      | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| 292 Bnt. cloacae            | >30                      | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| 190 Bnt. cloacae            | >30                      | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| J22 Bnt. cloacae            | 6                        | 8    | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| R4 Steno. maltophilia       | 6                        | >30  | >30                         | >30  | 10                 | >15 |
| B/C Pseudomonas aeruginosa  | >30                      | >30  | >30                         | >30  | 15                 | >15 |
| J20 Pseudomonas aeruginosa  | >30                      | >30  | >30                         | >30  | 15                 | >15 |
| J26 Pseudomonas sp.         | >30                      | >30  | >30                         | >30  | 15                 | >15 |
| R75 Coryne. amycolatum      | <0.5                     | <0.5 | <0.5                        | 4    | 10                 | 10  |
| R23 Coryne. sinensis        | <0.5                     | <0.5 | <0.5                        | 4    | 10                 | 10  |
| 177 Acinetobacter baumannii | <0.5                     | <0.5 | <0.5                        | <0.5 | 6                  | 10  |
| 344 Acinetobacter baumannii | 6                        | 15   | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| R16 Proteus mirabilis       | 6                        | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |
| R81 Proteus vulgaris        | >30                      | >30  | >30                         | 30   | >15                | >15 |
| R26 Proteus mirabilis       | 6                        | >30  | >30                         | >30  | >15                | >15 |

PCT/D03303/010093

WO 2004/000933

8/16

FIGURE 4A

| Organism<br>ID         | Cupric<br>Di-sodium + tetrasodium<br>EDTA |     | Cupric Di-sodium +<br>Di-potassium EDTA |     | Cupric Di-sodium +<br>Di-ammonium EDTA |     |
|------------------------|-------------------------------------------|-----|-----------------------------------------|-----|----------------------------------------|-----|
|                        | MIC                                       | MBC | MIC                                     | MBC | MIC                                    | MBC |
| S24 Staph. epidermidis | 0.25                                      | 2   | 0.25                                    | 15  | 0.5                                    | 20  |
| 31 Staph. epidermidis  | 0.25                                      | 8   | 0.25                                    | 20  | 0.5                                    | 20  |
| 301 Staph. xylosox     | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | >20 | <0.1                                   | 20  |
| 300 Staph. epidermis   | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | 20  | <0.1                                   | 20  |
| J46 Staph. lentus      | 0.25                                      | 6   | 0.25                                    | 15  | 0.5                                    | 20  |
| S24 Staph. epidermis   | 0.25                                      | 8   | 0.25                                    | 20  | 0.5                                    | 20  |
| R8 Staph. simulans     | 0.25                                      | >20 | 1                                       | >20 | 1                                      | 20  |
| 72 S. aureus           | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | >20 | <0.1                                   | 20  |
| R57 S. aureus          | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | 20  | <0.1                                   | 20  |
| R13 S. aureus          | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | 20  | <0.1                                   | >20 |
| R30 S. aureus          | <0.1                                      | 15  | <0.1                                    | 20  | <0.1                                   | >20 |
| 8 S. aureus            | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | >20 | <0.1                                   | 20  |
| R64 MRSA               | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | >20 | <0.1                                   | >20 |
| R51 MRSA               | <0.1                                      | >20 | <0.1                                    | 20  | <0.1                                   | >20 |



000064

PC17052004#18009

WFO 2004100903

9/16

FIGURE 4B

| Organism ID                 | Cepic Di-sodium + tetrasodium EDTA |     | Cepic Di-sodium + Di-potassium EDTA |     | Cepic Di-sodium + Di-ammonium EDTA |     |
|-----------------------------|------------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
|                             | MIC                                | MBC | MIC                                 | MBC | MIC                                | MBC |
| B92 MRSA                    | <0.1                               | >20 | <0.1                                | >20 | <0.1                               | >20 |
| S93 MRSA                    | <0.1                               | 15  | <0.1                                | 20  | <0.1                               | 20  |
| J67 MRSA                    | <0.1                               | >20 | <0.1                                | 20  | <0.1                               | 20  |
| R8 VRE                      | 0.25                               | 20  | 0.25                                | 20  | 0.5                                | >20 |
| Woods VRE                   | 0.25                               | >20 | <0.1                                | 20  | <0.1                               | >20 |
| S77 Enterococcus faecium    | 0.5                                | >20 | 0.5                                 | >20 | 1                                  | >20 |
| S76 Enterococcus faecalis   | 0.25                               | >20 | <0.1                                | >20 | <0.1                               | >20 |
| 68 Klebsiella pneumoniae    | 10                                 | >20 | 6                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| B51 Klebsiella pneumoniae   | 4                                  | >20 | 4                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| I28 Klebsiella oxytoca      | 4                                  | >20 | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| I7 Klebsiella ornitholytica | 6                                  | >20 | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 230 E. coli                 | 6                                  | 15  | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| B/C E. coli                 | 6                                  | 1   | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 137 E. coli                 | 6                                  | 4   | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 292 Ent. cloacae            | 20                                 | >20 | 8                                   | >20 | 8                                  | >20 |

PCT/TB5-044/01 MW9

WU 2004/108093

10/16

FIGURE 4C

| Organism ID                 | Cupric Di-sodium + tetrasodium EDTA |      | Cupric Di-sodium + Di-potassium EDTA |      | Cupric Di-sodium + Di-ammonium EDTA |      |
|-----------------------------|-------------------------------------|------|--------------------------------------|------|-------------------------------------|------|
|                             | MIC                                 | MBC  | MIC                                  | MBC  | MIC                                 | MBC  |
| 190 Bnt. cloacae            | 20                                  | >20  | 8                                    | >20  | 6                                   | >20  |
| 122 Bnt. cloacae            | 20                                  | >20  | 8                                    | >20  | 6                                   | >20  |
| R4 Steno. maltophilia       | 6                                   | 10   | 1                                    | >20  | 1                                   | >20  |
| B/C Pseudo-monas aeruginosa | 6                                   | 10   | 2                                    | >20  | 2                                   | >20  |
| 120 Pseudo-monas aeruginosa | 6                                   | 15   | 2                                    | >20  | 2                                   | >20  |
| 126 Pseudo-monas sp.        | 6                                   | >20  | 2                                    | >20  | 2                                   | >20  |
| R75 Coryne. amycolatum      | <0.1                                | <0.1 | 0.25                                 | 0.25 | 0.25                                | 0.25 |
| R23 Coryne. strain/amy      | 6                                   | 10   | 1                                    | >20  | 1                                   | >20  |
| 177 Acinetobacter baumannii | 6                                   | 0.5  | 0.5                                  | 0.25 | 0.25                                | <0.1 |
| 144 A. baumannii            | 6                                   | >20  | 2                                    | >20  | 1                                   | >20  |
| R16 Proteus mirabilis       | 6                                   | >20  | 2                                    | >20  | 1                                   | >20  |
| R81 Proteus vulgaris        | 6                                   | >20  | 2                                    | >20  | 2                                   | >20  |
| R20 Proteus mirabilis       | 6                                   | >20  | 2                                    | >20  | 1                                   | >20  |

10/000000

PCT/US2004/000005

WO 2004/000005

11/16

FIGURE 5A

| Organism ID            | Tetrasodium + Di-ammonium EDTA |     | Tetrasodium + Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium + Di-potassium EDTA |     |
|------------------------|--------------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                        | MIC                            | MBC | MIC                             | MBC | MIC                             | MBC |
| 824 Staph. epidermidis | 0.5                            | >20 | 1                               | 20  | 0.5                             | >8  |
| 31 Staph. epidermidis  | 0.5                            | >20 | 1                               | 6   | 0.5                             | >8  |
| 301 Staph. xylopus     | 0.5                            | >20 | 1                               | >20 | 0.5                             | >8  |
| 300 Staph. capitis     | 0.5                            | >20 | 1                               | >20 | 0.5                             | 8   |
| 146 Staph. lentus      | 0.5                            | >20 | 0.5                             | 8   | 0.5                             | >8  |
| 624 Staph. capitis     | 0.5                            | >20 | 0.5                             | 8   | 0.5                             | >8  |
| R8 Staph. simulans     | 0.5                            | >20 | 0.5                             | >20 | 0.5                             | >8  |
| 72 S. aureus           | 1                              | >20 | 0.5                             | 20  | 0.5                             | 8   |
| R57 S. aureus          | 1                              | >20 | 1                               | 20  | 1                               | >8  |
| R13 S. aureus          | 0                              | 0   | 0                               | 0   | 0                               | 0   |
| R30 S. aureus          | 1                              | 4   | 1                               | 4   | 1                               | 8   |
| 8 S. aureus            | 1                              | >20 | 1                               | 20  | 1                               | 8   |
| R64 MRSA               | 1                              | >20 | 1                               | 20  | 1                               | >8  |
| R51 MRSA               | 1                              | >20 | 1                               | 20  | 0.5                             | >8  |

FIGURE 5B

12/16

| Organism ID                 | Tetrasodium + Di-ammonium EDTA |     | Tetrasodium + Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium + Di-potassium EDTA |     |
|-----------------------------|--------------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                             | MIC                            | MBC | MIC                             | MBC | MIC                             | MBC |
| R92 MRSA                    | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >8  |
| S93 MRSA                    | 1                              | >20 | 1                               | 20  | 1                               | 8   |
| J67 MRSA                    | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | 8   |
| R8 VRE                      | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >8  |
| Woods VRE                   | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >8  |
| S77 Enterococcus faecium    | 0.5                            | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >8  |
| S76 Enterococcus faecalis   | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >8  |
| 68 Klebsiella pneumoniae    | >20                            | >20 | >20                             | >20 | 10                              | >10 |
| R51 Klebsiella pneumoniae   | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >10 |
| 128 Klebsiella oxytoca      | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 1                               | >10 |
| J7 Klebsiella ornitholytica | >20                            | >20 | 20                              | >20 | 10                              | >10 |
| 250 E. coli                 | >20                            | >20 | 20                              | >20 | 2                               | >10 |
| B/C E. coli                 | 1                              | 0.5 | 1                               | 1   | 0.5                             | >10 |
| 137 E. coli                 | 4                              | >20 | 20                              | >20 | 1                               | >10 |
| 292 Rat. cloacae            | 8                              | >20 | >20                             | >20 | 4                               | >10 |

000063

PC17102041020005

WFO 2004010003

13/16

FIGURE 5C

| Organism ID                        | Tetrasodium + Di-ammonium EDTA |     | Tetrasodium + Di-potassium EDTA |     | Di-ammonium + Di-potassium EDTA |     |
|------------------------------------|--------------------------------|-----|---------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                                    | MIC                            | MBC | MIC                             | MBC | MIC                             | MBC |
| 190 <i>Bot. cloacae</i>            | >20                            | >20 | >20                             | >20 | 6                               | >10 |
| R22 <i>Bot. cloacae</i>            | >20                            | >20 | >20                             | >20 | 4                               | >10 |
| R4 <i>Steno. maltophilus</i>       | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 0.5                             | >10 |
| B/C <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 8                              | >20 | 15                              | 15  | 2                               | >10 |
| J20 <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 6                              | >20 | 15                              | 20  | 2                               | >10 |
| J26 <i>Pseudo-monas</i> sp.        | 8                              | >20 | 20                              | >20 | 2                               | >10 |
| R75 <i>Coryna. argyrodentum</i>    | 0.5                            | 4   | 0.5                             | 1   | 0.5                             | 2   |
| R23 <i>Coryna. straitvany</i>      | 0.5                            | 0.5 | 0.5                             | 0.5 | 0.5                             | 0.5 |
| 177 <i>Acinetobacter baumannii</i> | 4                              | 8   | 1                               | >20 | 0.5                             | >10 |
| J44 <i>A. baumannii</i>            | >20                            | >20 | >20                             | >20 | 2                               | >10 |
| R16 <i>Proteus mirabilis</i>       | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 0.5                             | >10 |
| R81 <i>Proteus vulgaris</i>        | 1                              | >20 | 1                               | >20 | 0.5                             | >10 |
| R26 <i>Proteus mirabilis</i>       | >20                            | >20 | >20                             | >20 | 2                               | >10 |

FIGURE 6

| Organism                        | Tetra-sodium EDTA MBEC<br>(mg/ml, w/v) |
|---------------------------------|----------------------------------------|
| 31 Staph. epidermidis           | 20-40                                  |
| 301 Staph. xylosus              | 20-40                                  |
| 300 Staph. capitis              | <5                                     |
| 146 Staph. lentus               | <5                                     |
| R8 Staph. simulans              | 20-40                                  |
| 72 Staph. aureus                | <5                                     |
| R57 Staph. aureus               | <5                                     |
| 8 Staph. aureus                 | <5                                     |
| R92 MRSA                        | <5                                     |
| S93 MRSA                        | <5                                     |
| J67 MRSA                        | <5                                     |
| 68 Klebsiella pneumoniae        | <5                                     |
| J7 Klebsiella ornitholytica     | <5                                     |
| 292 Enterobacter cloacae        | <5                                     |
| 190 Enterobacter cloacae        | 20                                     |
| J22 Enterobacter cloacae        | 15                                     |
| R4 Streptrophomonas maltophilia | <20                                    |
| J20 Pseudomonas aeruginosa      | <10                                    |
| J26 Pseudomonas aeruginosa      | <5                                     |
| J44 Acinetobacter baumannii     | 10                                     |
| R16 Proteus mirabilis           | <5                                     |
| R81 Proteus vulgaris            | <5                                     |
| H Enterococcus                  | <5                                     |
| 7097651 E. coli                 | <5                                     |
| 250 E. coli                     | <10                                    |
| 7115649 Klebsiella oxytoca      | <5                                     |

000000

PCT/US2004/01809

WO 2004/06893

15/16

FIGURE 7

| Catheter ID | EDTA Conc. (mg/mL) | Colony count at 0 hours (cfu/mL) | Colony count at 3 hours (cfu/mL) | Colony count at 6 hours (cfu/mL) | Colony count at 24 hours (cfu/mL) | Organisms Present                           |
|-------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| G           | 40                 | >100000                          | 120000                           | 6000                             | 0                                 | Mixed Gram-ve and Gram+ve cultures          |
| H           | 40                 | >100000                          | 80000                            | 0                                | 0                                 | Mixed Gram-ve and Gram+ve cultures          |
| I           | 40                 | 200000                           | >500000                          | 25000                            | 0                                 | CNS + Corynebacteria                        |
| J           | 40                 | >500000                          | 180000                           | 0                                | 0                                 | CNS                                         |
| K           | 40                 | >1000000                         | 600000                           | 500000                           | 180000                            | Streptococcus sp., CNS and Gram-ve bacillus |
| P           | 40                 | >500000                          | 2500000                          | 150000                           | 54500                             | Pseudomonas sp. + Streptococcus sp.         |
| Q           | 40                 | 205000                           | 650000                           | 1000                             | 5500                              | Enterococcus sp.                            |
| R           | 40                 | 3000                             | 500                              | 0                                | 0                                 | MRSA                                        |
| S           | 40                 | >500000                          | 100000                           | 30000                            | 0                                 | CNS                                         |
| T           | 40                 | 137500                           | 1000                             | 0                                | 0                                 | MRSA                                        |
| U           | 40                 | >500000                          | 182500                           | 67500                            | 13500                             | CNS                                         |
| V           | 40                 | 700000                           | 38500                            | 37500                            | 13000                             | CNS + Group D Streptococcus                 |
| W           | 40                 | >500000                          | 0                                | 0                                | 0                                 | Enterobacter cloacae                        |
| X           | 40                 | >500000                          | 20000                            | 0                                | 0                                 | Mixed CNS                                   |
| Z           | 40                 | >500000                          | 0                                | 0                                | 0                                 | CNS                                         |
| AI          | 40                 | 700000                           | 37000                            | 60000                            | 0                                 | MRSA                                        |
| BI          | 40                 | 24000                            | 0                                | 0                                | 0                                 | MRSA                                        |

170000

ACTUS2004010000

ACTUS2004010000

16/16

FIGURE 8

| Catheter ID  | EDTA Conc. (mg/mL) | Colony count at 0 hours (cfu/mL) | Colony count at 3 hours (cfu/mL) | Colony count at 6 hours (cfu/mL) | Colony count at 24 hours (cfu/mL) | Organisms Present                  |
|--------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| A            | 100                | 1000000                          | 0                                | 0                                | 0                                 | CNS                                |
| B            | 100                | 1000000                          | 100                              | 200                              | 0                                 | CNS                                |
| C            | 50                 | 1000000                          | 0                                | 0                                | 0                                 | Mixed coliforms                    |
| D            | 20                 | >100000                          | 250000                           | 100000                           | 0                                 | Mixed Gram-ve and Gram+ve cultures |
| E            | 30                 | >100000                          | 400000                           | 360000                           | 0                                 | Mixed Gram-ve and Gram+ve cultures |
| F            | 30                 | 300000                           | 57000                            | 2000                             | 0                                 | Mixed Gram-ve and Gram+ve cultures |
| L            | 60                 | 600000                           | 5000                             | 4000                             | 0                                 | Enterococcus sp.                   |
| M            | 60                 | >500000                          | 300000                           | 17000                            | 17000                             | Proteus sp. and CNS                |
| O            | 50                 | 500000                           | 30000                            | 130000                           | 0                                 | Staphylococcus aureus              |
| N (arterial) | 50                 | 500000                           | 10000                            | 0                                | 0                                 | CNS                                |
| N (venous)   | 50                 | 300000                           | 10000 (CNS only)                 | 60000 (CNS only)                 | 0                                 | Klebsiella pneumoniae + CNS        |



**COMPOSICIONES ANTISÉPTICAS, MÉTODOS Y SISTEMAS****Campo Técnico de la Invención**

La presente invención se relaciona con composiciones antisépticas, métodos y sistemas para el uso en diversas apreciaciones médicas, lo mismo que aplicaciones sanitarias en general incluyendo aplicaciones sanitarias industriales y ambientales. Las composiciones de la presente invención poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiinflamatoria y pueden también servir como anticoagulantes. Las sales y composiciones especificadas de ácido tetracético de etileno de amina (EDTA) ( $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8$ ) son empleados a concentraciones específicas y niveles de pH. Los métodos ilustrativos incluyen suministrar un recubrimiento antiséptico sobre superficie de objetos para reducir la incidencia de infección, y poner en contacto objetos y/o superficies por medio de enjuagar, lavar y/o remojar con una solución antiséptica para inhibir la proliferación de, reducir o eliminar poblaciones microbianas.

**Antecedentes de la Invención y Descripción del Estado de la Técnica**

Las infecciones son un problema significativo en muchos campos en donde las condiciones sanitarias son importantes, tales como en el cuidado de la salud. Las infecciones problemáticas pueden surgir de organismos bacterianos, hongos, de amebas, de protozoarios y/o virales. Los retos son encontrados tanto en prevenir la infección y en reducir o eliminar la infección una vez sea establecida. Los ambientes infectados pueden incluirse en superficie de objetos, fluidos, y conductos de fluidos, y/o humanos o animales.

Las Soluciones de alcohol y trapos de alcohol isopropilo son usados comúnmente para limpiar superficies sanitarias y se han demostrado que tienen una actividad antibacterial. El efecto más efectivo inhibitorio antimicrobiano se usa con soluciones de isopropanol al 70%. Las soluciones de alcohol a estas concentraciones son muy costosas y se evaporan rápidamente, lo que disminuye sustancialmente su eficacia e incrementa su costo. Más aún, aunque las soluciones de isopropanol puedan ser usadas sobre superficies, incluyendo la piel humana, y en una variedad de aplicaciones médicas, las soluciones de alcohol a esta concentración no pueden ser suministradas a humanos para propósitos médicos, diferentes tópicamente.

En el campo de la salud, las infecciones de diversos tipos y las causas son comunes y frecuentemente resultan en

permanencia hospitalarias más largas, llevando a mayores costos de hospital. Aún peor, cerca de 90.000 pacientes que mueren anualmente se atribuyen a infecciones nosocomiales - esto es, infecciones adquiridas en un hospital o en otros ambientes de salud. La vigilancia de las infecciones nosocomiales se ha vuelto una parte integral de la práctica hospitalaria. Los estudios conducidos hace más de 20 años por los centros de prevención y control de enfermedades (CDC) documentaron la eficacia de estas actividades para reducir la ocurrencia de infección nosocomial. A pesar de la atención dada a los problemas de infección nosocomial, sin embargo, las tasas de infección no han sido reducidas dramáticamente, y las infecciones nosocomiales permanecen como un riesgo sustancial y una preocupación sustancial de la salud.

Una fuente problemática de infecciones en los campos médicos y veterinario se encuentra en los catéteres, y particularmente en catéteres permanentes. Los catéteres se han convertido en esenciales para el manejo de pacientes de cuidado crítico, aún el interior de un catéter es frecuentemente la mayor fuente de infección. Los catéteres son usados para el suministro de fluidos, productos de sangre, drogas y nutrientes, lo mismo que para hemodiálisis, hemofiltración, diálisis peritoneal, recuperación de muestra de sangre, monitoreo de condiciones de paciente, etc. Los catéteres transcutáneos frecuentemente se infectan a través

000075

de la penetración en la piel del catéter. Se ha encontrado que el sesenta por ciento (60%) de todas las infecciones en la corriente sanguínea nosocomiales ocurren en pacientes con catéteres venosos centrales. Dacuicher et al. New Engl. J. Med. 340:1-6 (1999).

En particular, durante algunos procedimientos, un catéter puede estar implantado, y permanecer implantado en, un paciente por un periodo de tiempo relativamente largo, por ejemplo durante treinta días. Los catéteres para terapia intravenosas (IV) y catéteres urinarios típicamente permanecen implantados durante un periodo de tiempo sustancial. Como un resultado del trauma en las áreas de inserción, y el dolor en los pacientes, tales catéteres no pueden ser removidos o implantados frecuentemente. Las bacterias que nacen en el catéter han sido implicadas como una fuente primaria o principal de infecciones en el tracto urinario. Los pacientes que reciben un catéter central insertado periféricamente durante el embarazo también se ha encontrado que lleva un riesgo significativo de complicaciones infecciosas. Ogura et al. Am. J. Obstet. Gynecol. 188(5): 1223-5 (2003). Adicionalmente, una infección por catéter central venoso resulta en una sepsis relacionado del catéter, y esto ha sido citado en las complicaciones mas frecuentes durante la nutrición. Reimund et al. Clinical Nutrition, 21(1): 33-38 (2002). Debido al riesgo de

76

infecciones, la caterización puede estar limitada a incidencias cuando el procedimiento es absolutamente necesario. Esto compromete seriamente la salud del paciente.

Después de la mayoría de procedimientos de acceso médico prescrito que involucran un catéter, el catéter es enjuagado o lavado con salina y luego llenado con un líquido, tal como salina o solución de heparina, para impedir que la sangre se coagule y tape el interior del catéter, inhibiendo el que la sangre del paciente se devuelva hacia el catéter, e impide que gases ingresen dentro del catéter. El líquido que es usado para lavar o enjuagar el catéter se ha llamado como el "lavado de bloqueo" y el líquido usado para llenar el catéter después del lavado o durante periodos de no uso se ha llamado como la solución "de bloqueo".

Tradicionalmente, los catéteres han sido bloqueados con soluciones de salina normal o heparina, las cuales suministran actividad anticoagulante. La heparina y la salina son usadas algunas veces en combinación. La salina normal es generalmente usada para bloquear por corto tiempo los catéteres intravenosos periféricos, pero no tiene actividad anticoagulante o antimicrobiana. Las soluciones de heparina son usadas generalmente para bloquear catéteres vasculares. La heparina tiene actividad anticoagulante pero no funciona como un antimicrobiano y no impide ni mejora las infecciones.

También hay indicaciones fuertes de que la heparina en las soluciones de bloqueo pueden conducir a la trombocitopenia inducida por heparina, una complicación de sangrado serio que ocurre en un subconjunto de paciente que reciben inyecciones de heparina.

Las soluciones de bloqueo de catéter comprenden taurolidina, ácido cítrico y citrato de sodio según se ha propuesto. Una publicación reciente (Kidney Internacional, Sept. 2002) describe el uso de una solución de alcohol al 70% como una solución de bloqueo para una puerta de catéter subcutánea. El uso de alcohol como una solución de bloqueo es cuestionable, ya que este no es un anticoagulante, y en vista de que existen riesgos asociados con esta solución al ingresar en la corriente sanguínea. Los inventores tampoco se han dado cuenta de ninguna evidencia que indica que una solución de alcohol al 70% tiene cualquier actividad de erradicación de la película. Una tendencia que está surgiendo y recomendaciones nuevas del centro para enfermedades infecciosas (CID) es el de tratar infecciones de catéter existentes sistemáticamente sea con un antibiótico específico o un antibiótico de alto rango. El uso de un antibiótico en una solución de bloqueo para impedir infecciones no es recomendado. El uso de antibióticos para tratar infecciones de catéter existentes tienen ciertos riesgos que incluyen: (1) el riesgo de desarrollar unas cepas resistentes al

antibiótico; (2) la inhabilidad del antibiótico para matar biopelículas de capa profunda o sésiles, bacteria, que pueden requerir el uso de antibiótico en concentraciones tóxicas; y (3) el alto costo de la terapia por antibiótico prolongada. Los catéteres recubiertos con un material antiséptico o antibiótico son disponibles. Sin embargo, estos catéteres son recubiertos solo pueden suministrar una protección limitada durante un periodo de tiempo relativamente corto.

En general, los organismos de libre flotación pueden ser vulnerables a los antibióticos. Sin embargo, las bacterias y los hongos pueden volverse impermeable a los antibióticos agregándose a superficies y produciendo una sustancia protectora superficial, frecuentemente referida como una sustancia polimérica extracelular (EPS) para formar una biopelícula. A medida que los microbios proliferan, más de cincuenta regulaciones hacia arriba o hacia abajo pueden ocurrir, resultando en la formación de una biopelícula microbiana resistente al antibiótico. Las dos terceras partes de las infecciones bacterianas que los médicos encuentran han sido atribuidas a biopelículas. Netting, Science News, 160:28 (2001).

La formación de biopelícula es un proceso controlado genéticamente en el ciclo de vida de la bacteria que produce numerosos cambios en la fisiología celular del organismo,

frecuentemente incluye una resistencia a los antibióticos incrementada (hasta 100 o 1000 veces), en comparación con el crecimiento bajo condiciones planctónicas (flotación libre). A medida que los organismos crecen, los problemas con sobrepoblación y disminución de la nutrición disparan separación de los organismos para buscar nuevas localizaciones y fuentes. Los organismos nuevos dispersados rápidamente revierten de nuevo a su fase de explotación libre original y son nuevamente vulnerables a los antibióticos. Sin embargo, el organismo de flotación libre puede ingresar en la corriente sanguínea del paciente, creando infecciones en la corriente sanguínea que producen signos clínicos como fiebre, y más síntomas serios relacionados con la infección. Los flotadores sésiles de la biopelícula pueden desprenderse y sujetarse a superficies de tejido, tales como válvulas del corazón, causando la proliferación de la biopelícula y problemas serios, tales como endocarditis.

En establecimientos industriales, la formación de biopelículas es muy común y se refiere generalmente como incrustaciones biológicas. Por ejemplo, el crecimiento de biopelícula sobre estructuras mecánicas, tales como dispositivos de filtración, es una causa principal de la contaminación biológica de sistemas de distribución de agua potable. La formación de biopelícula en establecimientos industriales pueden llevar a la degradación material,



- 0000g/

contaminación de productos, bloqueo mecánico e impedancia de transferencia de calor en sistemas de procesamiento. La formación de biopelícula y la contaminación resultante es un problema común en la preparación de alimentos y en las instalaciones del procesamiento.

Para complicar los asuntos adicionalmente, los ensayos de sensibilidad convencional miden solamente la sensibilidad al antibiótico de los organismos de libre flotación en vez de los organismos en un estado de biopelícula. Como resultado una dosis de antibiótico es administrada al paciente, de modo que tal como por medio de un catéter, en cantidades que raramente tienen el efecto deseado sobre los organismos de fase de biopelícula que pueden recibir en el catéter. Los organismos de biopelícula pueden continuar desprendiendo más organismos planctónicos o pueden dormirse y proliferar después como una infección aparentemente recurrente.

Para poder erradicar organismos de biopelícula por medio del uso de antibióticos, un laboratorio debe determinar la concentración de antibiótico retenida para matar la fase de biopelícula genética específica del organismo. Equipos altamente especializados son requeridos para suministrar la concentración mínima para la erradicación de la biopelícula. Más aún, los protocolos de diagnóstico actuales consumen mucho tiempo, y los resultados no son frecuentemente

. 000081

disponibles en muchos días, por ejemplo cinco días. Este periodo de tiempo claramente no permite un tratamiento pronto y adecuado de las infecciones. Este rechazo, y el miedo bien injustificado de la infección, puede resultar en un sobre uso de antibióticos de amplio espectro y la remoción continuada innecesaria de catéteres y procedimientos de reemplazo. El sobre uso de antibióticos de amplio espectro pueden resultar en el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos las cuales no pueden ser tratadas de manera efectiva. La remoción y reemplazo innecesario de catéteres es doloroso, costoso y puede resultar en daño y trauma del tejido en el punto de reinserción del catéter.

La resistencia del antibiótico de las biopelículas, acopiado con complicaciones del uso de antibióticos tales como el riesgo de desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos, ha convertido el tratamiento con antibióticos una opción no muy atractiva. Como resultado, el uso de antibióticos limitado para infecciones sintomáticas y antibióticos profilácticos típicamente ya no son empleados para impedir la contaminación. Debido a que la biopelícula puede actuar como una barrera resistente fenotípica selectiva a la mayoría de los antibióticos, el catéter debe ser removido frecuentemente para poder erradicar una infección relacionada con el catéter. La remoción y reemplazo del catéter es consumidora de tiempo, estresante al paciente y complica el procedimiento médico.

000087

Por lo tanto, existen una necesidad de métodos convenientes y efectivos para matar organismos, y especialmente aquellos que residen al interior de los catéteres, sin la necesidad de remover el catéter del cuerpo.

Adicionalmente a las infecciones bacterianas y de hongos, las infecciones amébicas pueden ser muy serias y dolorosas, al igual que potencialmente amenazadoras de la vida. Varias especies de *Acanthameoba*, por ejemplo, se han encontrado que infectan a los humanos. La *Acanthameoba* se encuentra por todo el mundo, en el suelo y en el polvo, y en fuentes de agua fresca, lo mismo que en agua salubre y agua de mar. Estas son encontradas frecuentemente en unidades de calefacción, ventilación y aire acondicionado, en unificadores, en unidades de diálisis, y parafernalia de lentes de contacto. Las infecciones con *Acanthameoba*, adicional a las infecciones microbianas y de hongos, pueden ser también común en conexión con otros dispositivos médicos y dentales, incluyendo cepillos de dientes, dentaduras postizas y otros dispositivos dentales, y similares. Las infecciones con *Acanthameoba* resultan frecuentemente de un almacenamiento inadecuado, un manejo y una desinfección inadecuada de lentes de contacto y otros dispositivos médicos que entran en contacto con el cuerpo humano, en donde ellas pueden ingresar a la piel por medio de un corte, herida, una raspadura, el ojo, y similar.

Existen clases diferentes y numerosas de microbios que presentan infecciones problemáticas, incluyendo variedades de bacterias y hongos. Sin embargo, los métodos presentes para eliminar las infecciones generalmente emplean soluciones que son efectivas contra un número limitado de diferentes microbios. Root et al. (Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32:1627-1633) (1988) describe que el uso in Vitro de uso de disodio EDTA contra un *Staphylococcus epidermidis* patógeno aislado asociado con catéter.

El EDTA ha sido útil tradicionalmente como un quelante de metal y ha sido utilizado en combinación con otros componentes activos, para una variedad de propósitos. El EDTA es a menudo usado, en bajas concentraciones, como un anticoagulante in Vitro para muestra de especímenes de sangre y ensayo y un sinergista antioxidante, y es también agregado a soluciones, por ejemplo, quelante, un estabilizador, o un preservativo para preparaciones farmacéuticas. El EDTA puede existir en una variedad de formas, algunas de las cuales son formas de sales de sodio, tales como sales de sodio, disodio, tetrasodio, y otras de las cuales son quelatos no metal tales como hierro, cobre, magnesio, etc. Ciertas formas de EDTA han sido utilizadas, en conjunto con otras sustancias como un adyudante, en composiciones para tratar catéteres infectados. Cuando son usadas en establecimientos químicos, o en composiciones empleadas con humanos o animales, las

. 000084

soluciones son ajustadas generalmente a un pH de rango fisiológico, o neutro.

Una combinación de un alcohol con un aditivo, tal como una forma de sal sin sodio de EDTA, se ha descrito en la publicación PCT WO02/05196. La publicación PCT WO 00/72906 A1 describe una mezcla liofilizada de un agente antimicrobiano, por ejemplo, un antibiótico, y un segundo agente, que puede ser una forma de sal sin sodio de EDTA, como un agente quelante para el lavado de catéteres. En la patente estadounidense No. 5,688,516, composiciones que tienen un agente anticoagulante y uno quelante, tal como EDTA, y un agente antimicrobiano, tal como la aminociclina, se describe para recubrir dispositivos médicos e inhibir la infección en los catéteres. En particular, los ejemplos describen, una forma de disodio EDTA que es llevada a un pH fisiológico de 7,4 y es usada en la composición. La publicación PCT WO99/09997 describe el tratamiento de la infección fangal con una combinación de un agente antifungal y un quelante, tal como el EDTA.

Otras áreas en las cuales las infecciones presentan un problema incluyen los dispositivos médicos y los materiales usados en conexión con los ojos, tales como lentes de contacto, bujes esclerales, materiales de sutura, lentes intraoculares y similares. En particular, se ha dado énfasis

85

en el desarrollo de métodos para desinfectar prótesis oculares, tal como lentes de contacto. Las biopelículas bacterianas pueden participar en infecciones oculares y permitir que las bacterias persistan en superficies abióticas que entran en contacto con, o están implementadas en el ojo. Las biopelículas también pueden formarse sobre superficies bióticas del ojo. Zegans et al., DNA cell Bio., 21: 415-20 (2002). Una forma severa de queratitis puede ser iniciada por una ameba protozoaria que puede contaminar los fluidos desinfectantes de los lentes. Una formulación oftálmica de tetrasodio EDTA y sales alcali, amortiguadas a un pH de 6-8, para la desinfección de lentes de contacto se describe en la patente estadounidense No, 5,300,296. La patente U.S. No. 5,998,488 describe una composición oftálmica de EDTA y otras sustancias, como ciclodextrina y ácido bórico.

En el campo dental, los elementos que son colocados en una boca, tales como herramientas dentales, y dispositivos dentales y ortodóncicos tales como retenedores, puentes, cajas, y similares, requieren ser mantenidos en condiciones estériles, particularmente durante el almacenamiento y anterior a la colocación en la boca. De otra forma, la infección puede ser transmitida a la corriente sanguínea y convertirse en seria. La patente U.S. No. 6,077,501 describe el uso del EDTA en una composición limpiadora de cajas dentales con otros componentes activos.

36

000088

El suministro de agua es también fuente de infecciones microbianas y de otros tipos. Los dispositivos de almacenamiento de agua, tales como los suministros de agua y tubos de suministro, frecuentemente se infectan. Las superficies internas o la tubería que llevan fluidos a oficinas médicas y dentales presentan un ambiente que es adecuado para la infección y el crecimiento microbiano, y la adherencia de los microbios y formación de capas de biopelícula altamente protectoras son frecuentemente problemáticas en los almacenamientos de fluidos y dispositivos de suministro.

Existe una necesidad para mejorar los métodos y composiciones para impedir y destruir las infecciones en una variedad de ambientes. Tales soluciones antisépticas deberían tener un rango amplio de propiedades antimicrobianas. En particular, las soluciones deberían ser capaces de penetrar las biopelículas para erradicar los organismos en las biopelículas. Los métodos y soluciones deberían ser lo suficientemente seguros para ser usados como una medida preventiva lo mismo que en el tratamiento de infecciones existentes.

000087

**Resumen de la Invención**

La siguiente invención suministra soluciones antisépticas que comprenden, consistentes esencialmente de, o consistentes de, uno o mas sales de EDTA a un pH que es mayor que el pH fisiológicos y a una concentración prescrita. Los inventores han descubierto que ciertas composiciones EDTA poseen actividades antisépticas poderosas y funciones poderosas como agentes antimicrobianos de de amplio espectro, lo mismo que funcionamiento como agentes fungicidas contra muchas cepas de levadura patogénica. Las composiciones de EDTA de la presente invención también son altamente efectivas en matar organismos de biopelícula patogénica y en reducir y eliminar biopelículas existentes, lo mismo que prevenir la formación de biopelículas. Las composiciones de EDTA de la invención y combinaciones de ellas exhiben tanto actividad antiprotozoaria como antiamédica. Con base en reportes publicados, las composiciones de EDTA de la presente invención se espera adicionalmente que exhiban una actividad antiviral.

Las formulaciones de EDTA de la presente invención son seguras para la administración humana, y son biocompatibles y no corrosivas. Ellas también pueden tener propiedades anticoagulantes y por lo tanto son útiles para prevenir y/o



tratar una variedad de infecciones relacionadas con catéter. Las soluciones antisépticas de la presente invención tienen numerosas aplicaciones, incluyendo soluciones de bloqueo y de lavados de bloqueo para diversos o varios tipos de catéteres, usados como agentes antisépticos o soluciones antisépticas para sanidad de un rango de dispositivos médicos, dentales, veterinarios, instrumentos y otros objetos, superficies y similares. Más aún, ellos tienen aplicaciones sanitarias en establecimientos de manejo y preparación de alimentos industriales.

Las composiciones antisépticas inventivas pueden ser empleadas profilácticamente para prevenir infecciones, o para reducir y/o eliminar infecciones existentes o establecidas. Métodos para prevenir o tratar infección de un objeto o superficie con un microorganismo indeseado también se suministra, tales métodos comprenden poner en contacto la superficie u objeto con una composición de la presente invención. Las composiciones inventivas deben pueden por lo tanto ser empleadas para inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones microbianas y/o patógenos, incluyendo la formación y proliferación de biopelículas; inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones protozoarias, inhibir el crecimiento y proliferación de poblaciones amebicas; e impedir las infecciones amebicas, particularmente las infecciones por Acanthameba.

La presente invención suministra también métodos para erradicar sustancialmente poblaciones microbianas, incluyendo tanto poblaciones microbianas planctónicas y poblaciones microbianas en la forma de biopelículas, junto con métodos para erradicar sustancialmente una población de *Acanthamoeba*. Tales métodos comprenden poner en contacto un objeto infectado o una superficie infectada, o un objeto o superficie que se sospecha que está infectado, con una composición de la presente invención. Dependiendo de la composición antiséptica usada en varios métodos, los diversos periodos de tiempo de contacto pueden ser requeridos para inhibir o proliferación de diversas poblaciones, y/o sustancialmente erradicar varias poblaciones. Periodos de tiempo de contacto adecuado para varias composiciones son provistas en los ejemplos y pueden también ser determinadas mediante experimentación de rutina.

En una modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención tienen por lo menos cuatro, y preferiblemente al menos cinco, de las siguientes propiedades: propiedades anticoagulantes; actividad inhibitoria y/o bactericida contra un amplio espectro de bacterias en una forma planctónica; actividad inhibitoria y/o fungicida contra un espectro de hongos patógenos; actividad inhibitoria y/o bactericida contra un amplio espectro de bacterias en un

sésil, o forma de biopelícula; actividad inhibitoria contra infecciones protozoarias; actividad inhibitoria contra infecciones de Acanthameba; seguridad y biocompatibilidad, por lo menos en volúmenes modestos, en contacto con un paciente, seguridad y biocompatibilidad por lo menos en volúmenes modestos en la corriente sanguínea de un paciente; y seguridad y compatibilidad con objetos y superficies industriales.

Las sales solubles de EDTA son usadas en las composiciones de la presente invención. Sales de sodio de EDTA están disponibles comúnmente y son generalmente usadas, incluyendo disodio, trisodio y sales de tetrasodio, aunque otras sales de EDTA, incluyendo sales de amonio, diamonio, potasio, dipotasio, disodio cúprico, disodio de magnesio, sodio férrico, o combinaciones de ellos, pueden ser usadas, siempre que ellas tengan las propiedades deseadas antibacterianas, fungicidas, antiprotozoarias y/o antielmébicas, y de que ellas sean lo suficientemente solubles en el disolvente deseado. Varias combinaciones de sales de EDTA pueden ser usadas y pueden ser preferidas para aplicaciones particulares. De manera importante, en la mayoría de las modalidades, composiciones y métodos de la presente invención no se emplean agentes antibióticos tradicionales y por lo tanto no se contribuye al desarrollo de organismos resistentes a antibióticos.

000091

Las composiciones antisépticas de la invención comprenden, consisten de, o consisten esencialmente de uno o mas sales de EDTA en solución a un pH más alto que el pH fisiológico. Preferiblemente, tales composiciones tienen un pH de 8,0. Preferiblemente, las composiciones de la invención, tienen un pH en el rango entre 8,5 y 12,5, entre 9,5 y 11,5 o entre 10,5 y 11,5. La sal de EDTA está generalmente presente en una cantidad de por lo menos 0,01% p/v. En modalidades preferidas, las composiciones de la invención comprenden por lo menos una sal de EDTA en una cantidad de 0,2% a 10% p/v, más preferiblemente 0,2% a 6,0% p/v y más preferiblemente 0,2% a 4,0% p/v.

En modalidades específicas, las composiciones de la invención comprenden, o consisten esencialmente de, un solvente y por lo menos una sal de EDTA en una concentración entre 0,01% y 10% p/v, en donde la solución tiene un pH de por lo menos 9,0 y posee una actividad bactericida contra un alto espectro de bacterias. Preferiblemente, por lo menos una sal de EDTA es trisodio o tetrasodio de EDTA. El disolvente es generalmente seleccionado del grupo que consiste de: agua, salinas, alcoholes, y combinaciones de ellos. En una modalidad, el solvente es una combinación de agua y etanol,

Las composiciones antisépticas de la invención pueden ser empleadas como soluciones de bloqueo y el lavado de bloques para diversos tipos de catéteres de acceso permanente, incluyendo catéteres vasculares usados para el suministro de fluidos, productos sanguíneos, drogas y nutrición, retiro de fluidos o de sangre, diálisis, monitoreo de condiciones del paciente, y similares. Las soluciones antisépticas de la presente invención pueden también ser usadas como soluciones de bloqueo o de lavados de bloques para catéteres urinarios, tubos nasales, tubos de garganta y similares. Los parámetros de la solución general descritos mas adelante son adecuados para estos propósitos. En una modalidad, una solución antiséptica comprende, consiste de o consiste esencialmente de uno o mas sales de sodio EDTA a un pH mayor que el pH fisiológico es empleado para mantener la permanencia de dispositivos de acceso permanente intravascular. Los métodos para catéteres sanitarios y otros tubos médicos, tales como tubos nasales, tubos de garganta y similares, también se suministran e involucran el contacto del catéter u otro tubo médico con una composición sanitaria de la presente invención.

En otra modalidad, la composiciones antisépticas de la presente invención comprende, consiste de o consisten esencialmente de uno o mas sales de sodio de EDTA a un pH mayor que el pH fisiológico y son suministradas como soluciones sanitarias para dispositivos médicos tales como

cajas dentales u otros dispositivos dentales, ortodónticos y/o periodónticos, para lentes de contacto u otros dispositivos ópticos, para instrumentos médicos o veterinarios, dispositivos y similares, y como soluciones sanitarias para superficie y objetos sanitarios. Los métodos de higiene de tales dispositivos son también provistos, los métodos comprenden poner en contacto un dispositivo con una composición antiséptica de la presente invención. En general, las composiciones antisépticas de la presente invención pueden ser usadas como soluciones de enjuague, para dispositivos dentales, ortodónticos o periodónticos, incluyendo cepillos de dientes, y también pueden ser usados como soluciones de enjuague para lentes de contacto u otros dispositivos ópticos, lo mismo que instrumentos médicos y veterinarios, dispositivos médicos y veterinarios y similares. Para estas aplicaciones las composiciones antisépticas de la presente invención son formuladas generalmente como soluciones, o son provistas en una forma seca que luego de la disolución de un solvente adecuado forman una solución.

En todavía otra modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención son formuladas para uso en soluciones, geles, cremas u otras preparaciones diseñadas para uso tópico como agentes antisépticos, limpiadores, tratamientos antibacteriales y similares. Las composiciones antisépticas de la presente invención también pueden ser usadas como

a4

agentes antibacteriales en conexión con vendajes, bandas, curas, agentes de curación de heridas y dispositivos de curación de heridas y similares. En modalidades relacionadas, cubrimientos en uso para curación de heridas, tales como vendajes, vendas se suministran en donde el cubrimiento es impregnado con uno o más composiciones de la presente invención-

Composiciones antisépticas de la presente invención también pueden ser empleadas en establecimientos industriales tales como sistemas de almacenamiento y distribución de agua, purificación de agua, humidificación y dispositivos de deshumidificación de agua, y en preparaciones de alimentos, establecimiento de manejo y empaque, para inhibir, reducir o sustancialmente eliminar poblaciones microbianas tanto de formas de libre explotación como acsiles, lo mismo que muchos hongos, amebas y poblaciones de protozoarios. El equipo y las superficies industriales pueden estar en contacto con, ser lavadas con, o limpiadas con composiciones antisépticas de la presente invención. Las formulaciones de las composiciones antisépticas con liberación en el tiempo pueden también ser suministradas para proveer tratamiento durante el tiempo, particularmente en localizaciones que son frecuentemente de difícil acceso.

.. 000095

**Breve Descripción de los Dibujos**

Las figuras 1A-1D muestran la concentración mínima inhibitoria (MIC) y las concentraciones mínimas bactericidas (MBC) para diversos organismos bacteriales gram-positivo y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: dipotasio EDTA; diamonio EDTA; trisodio EDTA, usando el método de dilución de agar. Los organismos bacteriales fueron aislados de las infecciones relacionadas con catéter en pacientes humanos. Técnicas experimentales son descritos en el Ejemplo 1.

La figura 2 muestra las concentraciones MIC y MBC para varios organismos fúngicos contra diferentes formulaciones de EDTA, usando el método de dilución agar. Las técnicas experimentales son descritas en el ejemplo 1. Los organismos de hongos fueron recolectados de muestras de pacientes humanos

La figura 3 muestra los datos MIC y MBC para diversos organismos bacteriales gram-positivo y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: disodio cúprico de EDTA; disodio de magnesio de EDTA, y disodio férrico de EDTA. Los organismos bacteriales fueron aislados de infecciones. Las técnicas experimentales son descritas en el ejemplo 1.



000096

Las figuras 4A y 4C muestran los datos MIC y MBC de organismo bacteriales gram-positivo y gram-negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: disodio cúprico de EDTA y tetrasodio de EDTA; disodio cúprico y dipotasio de EDTA; y disodio cúprico y diamonio de EDTA. Los organismos bacteriales fueron aislados de las infecciones relacionadas con catéteres en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

Las figuras 4A y 4C muestran los datos MIC y MBC de organismo bacteriales gram-positivo y gram-negativos contra combinaciones de soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: tetrasodio y diamonio de EDTA; tetrasodio y dipotasio de EDTA; y diamonio y dipotasio de EDTA. Los organismos bacteriales fueron aislados de las infecciones relacionadas con catéteres en pacientes humanos. Las técnicas experimentales se describen en el Ejemplo 1.

La figura 6 muestra la concentración mínima de los valores de erradicación de biopelícula (MBEC) para varios organismos, expresado en mg/ml de tetrasodio de EDTA (p/v) usando la metodología descrita en el ejemplo 2.

La figura 7 muestra los resultados experimentales del tratamiento de catéteres de hemodiálisis renal infectados con

000097

una composición antiséptica que consiste esencialmente de tetrasodio de EDTA a una concentración de 40 mg/ml (p/v).

La figura 8 muestran los resultados experimentales a partir del tratamiento de catéteres de hemodiálisis renal infectado, como también un catéter arterial y uno venoso, con una composición antiséptica que consiste esencialmente de tetrasodio de EDTA a concentraciones de 20-100 mg/ml (p/v).

#### **Descripción Detallada de la Invención**

El EDTA se usa a concentraciones bajas en muchas composiciones, en combinación con componentes activos, como un estabilizador o un agente preservativo. Las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden generalmente concentraciones mayores de EDTA y preferiblemente comprenden por lo menos sales de EDTA en 0,01% en peso por volumen (p/v), y puede comprender hasta 15 % (p/v) de sal de EDTA. Para muchas aplicaciones, las composiciones antisépticas de la invención preferiblemente comprende por lo menos 0,1% (p/v) y menos de 10% (p/v) de sales de EDTA, más preferiblemente entre 0,1% (p/v) de sales de EDTA y 8,0% (p/v) de sales de EDTA y más preferible 0,1% y 6,0% de sales de EDTA. Las composiciones ilustrativas explican mas adelante, comprenden 3,6-4,4% (p/v) de sales de EDTA en solución acuosa, o 0,1%-0,02% (p/v) de sales de EDTA en una mezcla de agua y etanol.

000058

La concentración de sales de EDTA para varias aplicaciones pueden depender de la sal de EDTA, o combinación de sales, empleadas, el tipo de infección a ser tratada y, hasta algún grado, el disolvente usado para las composiciones antisépticas. Por ejemplo, cuando los disolventes acuosos que comprenden etanol son usados, la concentración de sales de EDTA requerida para suministrar el nivel deseado de actividad pueden reducirse en comparación con las concentraciones de sales de EDTA usadas en composiciones que contienen agua como disolvente.

Las composiciones antisépticas comprenden uno o mas sales de EDTA se han demostrado ser inhibitorias y/o eficaces bactericidamente en rangos de concentración de 0,01% a 30% o mas, como se muestra en los datos ilustrativos suministrados mas adelante. Concentraciones "efectivas" de sales de EDTA deseados en composiciones antisépticas de la presente invención para inhibir, erradicación bactericida, fungicida y de biopelículas y de otros propósitos, pueden ser determinados por rutinas de experimentación, como se describió en los ejemplos que se suministran más adelante

La pharmacopoeia Británica (BP) especifica que una solución al 5% de disodio de EDTA tiene un pH entre 4.0 a 5.5. La BP también especifica un rango de pH de 7.08 a 8.0 para

79

soluciones de trisodio de EDTA. Los valores de pH para otras sales de EDTA en soluciones acuosas se han suministrado en el ejemplo 10, más adelante. En el pH fisiológico, las sales de sodio de EDTA existen como combinación de disodio y trisodio de EDTA, con la sal de trisodio de EDTA siendo la predominante. En los Estados Unidos, la EDTA de "disodio" farmacéutica preparada para inyecciones han sido tituladas generalmente con hidróxido de sodio a un pH de 6.5 a 7.5. A este pH, la solución de EDTA realmente comprende trisodio de EDTA principalmente, con una proporción menor de la sal de disodio. Otras composiciones que comprenden sales de sodio de EDTA que son usadas en aplicaciones médicas y de salud son ajustadas generalmente a un pH que es sustancialmente fisiológico.

En ciertas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de, una sal de sodio de EDTA (o combinación de sales de sodio de EDTA) en solución a un pH mayor al fisiológico, preferiblemente a un pH que es mayor a 8.0, a un pH mayor a 8.5, a un pH mayor a 9, a un pH mayor a 9.5, o aun pH mayor a 10. En otras modalidades, las modalidades antisépticas de la presente invención comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de, una sal de sodio de EDTA (o una combinación de sales de sodio de EDTA) en solución con un pH en el rango entre 8.5 y 12.5, a un pH entre 9.5 y 11.5, o

a un pH entre 10.5 y 110.5. Cuando se usadan aquí, el término "sal de EDTA" puede referirse a una sal única, tal como a un disodio, trisodio o tetrasodio o a otra forma de sal de EDTA, o puede referirse a una combinación de tales sales. La composición de sales de EDTA depende tanto de las sales de EDTA usadas para formular la composición, y el pH de la composición. Para las composiciones antisépticas de la presente invención que comprenden sales de sodio de EDTA en rangos de pH deseados (especificados anteriormente) las sales de sodio de EDTA están presentes predominantemente tanto en las formas de trisodio y de tetrasodio.

En una modalidad, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente de, una combinación de por lo menos las sales de trisodio y tetrasodio de EDTA. En otra modalidad las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente de, una combinación de por lo menos las sales de trisodio y tetrasodio de EDTA, en las cuales por lo menos 10% del EDTA en la composición está presente en la forma de sal de tetrasodio. En todavía otras modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprende, o consisten esencialmente, una combinación de por lo menos sales de trisodio y tetrasodio de EDTA, en las cuales por lo menos 50% o por lo menos 60% del EDTA en la composición está presente en la forma sal de trisodio. En otra modalidad, las

composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, o consisten esencialmente de, una combinación de disodio, trisodio y tetrasodio de EDTA, en la cual por menos del 10% del EDTA en la composición está presente en la forma de sal de disodio.

Las composiciones antisépticas comprenden, consisten esencialmente de, o consisten de sales de EDTA diferente de, o en adición a, las sales de sodio de EDTA que tiene unos rangos de pH "efectivos" diferentes. Rangos de pH "efectivos" para las sales de EDTA deseados en composiciones antiséptica de la presente invención para uso en erradicación inhibitoria, bactericida, fungicida y de biopelícula y otros propósitos pueden determinarse por experimentación rutinaria.

En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención consisten de sales de EDTA, según se describió anteriormente, y soluciones antisépticas que consisten de sales de EDTA disueltas en un disolvente, generalmente, en un disolvente acuoso tal como agua o salina. En otras modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención consisten esencialmente de sales de EDTA, según se describió anteriormente, generalmente en un disolvente acuoso tal como agua o salina. Las composiciones antisépticas de la presente invención consisten esencialmente de una sal de EDTA, o una combinación de sales de EDTA, que

102

.. 000102

están sustancialmente libres de otras sustancias activas que tiene una actividad sustancial anti-microbiana y/o antihongos. La actividad sustancial anti-microbiana y/o antihongo, en este contexto, significa actividad antimicrobiana y/o antihongos que es por lo menos 50% de la actividad antimicrobiana y/o antihongos de una composición de sales de sodio de EDTA en una solución acuosa a una concentración de 4.0% (p/v) a un pH de 10.5.

En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden sales de EDTA que tiene concentraciones especificadas, en rangos de pH especificados, y pueden contener materiales, que incluyen complementos activos, en adición a las sales de EDTA descritas anteriormente. Otros componentes antimicrobiales y biocidas pueden ser incorporados en las composiciones antisépticas de la presente invención, aunque el uso de antibióticos tradicionales y agentes biocidas desestimula generalmente como una consecuencia del desarrollo de organismos resistentes a los antibióticos y a los biocidas. En algunas modalidades, las composiciones antisépticas de la presente invención comprende sales de EDTA en concentraciones especificadas y rangos de pH, que son sustancialmente libres de otras sustancias activas que tienen actividad sustancial antimicrobiana y/ o antihongos.

Otros componentes activos e inactivos también pueden ser incorporados en las composiciones antisépticas de la presente invención, siempre que ellos no dañen o afecten de manera adversa la actividad y/o estabilidad de las sales de EDTA. Los agentes proteolíticos pueden ser incorporados en las composiciones antisépticas para algunas aplicaciones. Las composiciones antisépticas formuladas para aplicación tópica pueden incluir diversas cremas, emolientes, y composiciones para el cuidado de la piel tales como aloe vera y similares, por ejemplo. Las composiciones antisépticas de la presente invención suministradas en una formulación de solución también pueden comprender otros componentes activos e inactivos, siempre y cuando ellos no interfieran negativamente con la actividad y/o la estabilidad de la sal o las sales de EDTA.

Las composiciones de la presente invención pueden ser utilizadas en una solución o una forma seca. En solución, la sal o sales de EDTA son preferiblemente disueltas en un solvente, que pueden comprender una solución acuosa, tal como agua o solución salina, u otra solución biocompatible en la cual la sal o las sales de EDTA son solubles. También se pueden utilizar otros solventes, incluyendo soluciones de alcohol. En una modalidad, las composiciones de la sal de EDTA de la presente invención son formuladas en una mezcla de agua y etanol. Tales soluciones son altamente eficaces y se



.. 000104

pueden ser preparadas al elaborar una solución de depósito de sal o sales de EDTA en agua y luego introducir la concentración deseada de etanol. Las concentraciones de sal de EDTA de desde aproximadamente 0.01% a 10%, p/v, son adecuadas, y las concentraciones de etanol de entre aproximadamente 0.01% y aproximadamente 10%, v/v, suministran composiciones antisépticas efectivas. En algunas modalidades, las concentraciones de sal de EDTA de aproximadamente 2 mg/ml (0.2% p/v) en agua con una concentración de etanol de aproximadamente 1% (v/v) son altamente efectivas contra un amplio espectro de cepas bacterianas. Cuando son utilizadas las sales de EDTA de sodio, el pH varía de estas composiciones antisépticas como se describió anteriormente. Los solventes no acuosos biocompatibles también se pueden emplear, siempre y cuando la sal o las sales de EDTA se puedan solubilizar y pueden permanecer en solución durante almacenamiento y uso.

Las soluciones de EDTA de la presente invención son preferiblemente suministradas en una forma estéril y no pirogénica, y se pueden empacar en cualquier forma conveniente. En algunas modalidades, las composiciones de EDTA antisépticas de la presente invención se pueden suministrar en relación con o como una parte de un dispositivo médico, tal como una jeringa pre-llenada u otro dispositivo médico. Las composiciones se pueden preparar bajo

105

condiciones estériles, asépticas, o pueden ser esterilizadas luego de la preparación y/o empaque utilizado cualquier variedad de técnicas de esterilización adecuadas. Se pueden utilizar frascos, jeringas o recipientes simples o múltiples de soluciones de EDTA. Los sistemas de la presente invención incluyen tales frascos, jeringas y recipientes que contienen la solución de EDTA de la presente invención.

La composición de la presente invención también se puede suministrar en una forma sustancialmente "seca", tal como un recubrimiento sustancialmente seco sobre una superficie o tubería o conducto, o un dispositivo médico o industrial tal como un catéter o conducto, o un recipiente, o similar. Tales formas sustancialmente secas de las composiciones EDTA de la invención se pueden suministrar en una forma de polvo o liofilizadas que puedan ser reconstituidas para formar una solución con la adición de un solvente. Sustancialmente las formas secas de las composiciones de EDTA pueden ser alternativamente suministradas como un recubrimiento, o se pueden incorporar en un gel u otro tipo de portador, o encapsuladas, o empacadas de otra forma, y suministradas sobre una superficie como un recubrimiento o en un recipiente. Tales formas sustancialmente secas de las composiciones EDTA de la invención son formuladas de tal forma que, en la presencia de una solución, la composición sustancialmente seca forma una solución de EDTA que tenga la composición y

- 000106

106

las propiedades descritas anteriormente. En ciertas modalidades, diferentes técnicas de encapsulación o almacenamiento se pueden emplear de tal forma que el tiempo de liberación efectivo del EDTA se logra luego de una exposición prolongada a las soluciones. En esta modalidad, las soluciones de EDTA sustancialmente secas pueden suministrar actividad antiséptica durante un periodo extendido de tiempo y/o luego de exposiciones múltiples a las soluciones.

Las composiciones que comprenden EDTA tienen un perfil de seguridad bien establecido en relación con el uso médico y la administración a humanos. Las dosis de hasta 3000 mg de EDTA de disodio son infundidas durante 3 horas, diariamente, para el tratamiento de hipercalcemia en humanos y es bien tolerado. Las sales de EDTA también están presentes en combinación con otros componentes, en muchas soluciones utilizadas en aplicaciones médicas y para la salud humana, y se han establecido, seguras para uso humano tanto *in vitro* como *in vivo*. Las sales EDTA están disponibles fácilmente a un costo razonable, y son estables en solución durante el tiempo.

La formulación y producción de composiciones antisépticas de la presente invención es generalmente directa. En una modalidad, las composiciones antisépticas deseadas de la presente invención son formuladas al disolver al menos una

102

000107

sal de EDTA en un solvente acuoso, tal como agua purificada, a la concentración deseada y ajustar el pH de la solución de sal de EDTA al pH deseado. En modalidades alternativas, las composiciones antisépticas deseadas de la presente invención son formuladas al disolver al menos una sal de EDTA en un solvente en el cual la sal de EDTA, o combinaciones de las sales, son solubles para suministrar una solución de sal de EDTA concentrada, solubilizada. Pueden ser entonces agregados solventes o componentes adicionales. Alternativamente, la composición de sal de EDTA solubilizada se puede formular en una forma diferente de una solución, tal como una preparación tópica. La solución antiséptica puede entonces ser esterilizada utilizando medios convencionales, tal como sometida a autoclave, y radiación con UV, filtración, ultrafiltración, y/o otros medios. En el rango de osmolaridad requerida para las soluciones de EDTA va de 240 a 300 mOsm/Kg, más preferiblemente de 300-420 mOsm/Kg. Las soluciones son preferiblemente formuladas utilizando materiales USP.

Las composiciones antisépticas comprenden, consisten esencialmente de, sales de tri o tetra sodio, o una mezcla de estas, son preferidas para muchas aplicaciones y pueden ser preparadas utilizando sales de sodio de EDTA diferentes de sales de tri y tetra sodio, tal como EDTA de disodio la cual está fácilmente disponible. Las soluciones EDTA de disodio tienen un pH inferior en solución que el rango de pH deseado

000103

de las composiciones de la presente invención. Sin embargo, luego del ajuste del pH a rango deseado utilizando un material de ajuste de pH, tal como hidróxido de sodio, acetato de sodio u otros agentes de ajuste de pH bien conocidos, las soluciones de composiciones EDTA de sales de di-tri y/o tetrasodio de la presente invención. Así, diferentes formas y combinaciones de sales de EDTA se pueden utilizar en la preparación de las composiciones de EDTA de la presente invención, siempre y cuando el pH de la composición se ajuste al rango de pH deseado antes de uso. En una modalidad, las composiciones antisépticas que consisten de una mezcla de primariamente EDTA de tri y tetra sodio son suministradas al disolver EDTA de disodio en una solución acuosa en una cantidad de 3%-5% en base de peso/volumen, y agregando hidróxido de sodio en una cantidad suficiente para suministrar el pH deseado de entre 9.5 y 12.0.

Las composiciones antisépticas de la presente invención comprenden, consisten esencialmente de al menos una sal EDTA como se describió anteriormente son también útiles para muchas otras aplicaciones. Las soluciones de EDTA se pueden utilizar como una solución antiséptica para remojar, enjuagar, o contactar superficies y objetos médicos, dentales y veterinarios. Las soluciones de EDTA de la presente invención se pueden utilizar, por ejemplo, para almacenar y/c desinfectar lentes de contacto y otros dispositivos ópticos,

000109

para almacenar y/o desinfectar dispositivos dentales tales como dentadura, puentes, retenedores, capillos de dientes, y similares; y para almacenar y/o desinfectar dispositivos e instrumentos médicos, dentales y veterinarios. En estas aplicaciones, los dispositivos o superficies se pueden poner en contacto con, o remojar en, soluciones de EDTA de la presente invención durante un tiempo suficiente para eliminar sustancialmente infecciones microbianas y/o fungicidas. Las composiciones de EDTA de la presente invención pueden ser adicionalmente utilizadas para desinfectar agua y otras líneas de suministro de fluido. En la desinfección de líneas de suministro de fluido se pueden lograr al hacer fluido intermitentemente las líneas con composiciones de EDTA de la presente invención. De manera similar, las composiciones de EDTA de la presente invención se pueden utilizar para erradicar biopelículas, y poblaciones microbianas (incluyendo algunos virus y protozoos) y fungosas en dispositivos de suministro y almacenamiento de agua.

Numerosos ensayos y procedimientos experimentales se han llevado a cabo utilizando composiciones que contienen EDTA de la presente invención para establecer sus propiedades y su eficacia como composiciones antisépticas. Varios procedimientos experimentales se describen con detalle adelante. Estos procedimientos y los resultados experimentales se suministran con propósitos solamente

ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

### **Ejemplo 1**

**Datos de concentración inhibitoria mínima (MIC) y de concentración bactericida mínima (MBC) para organismos contra diferentes formulaciones de EDTA, utilizando el método de dilución en agar.**

Las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) y las concentraciones bactericidas mínimas (MBC) para varias bacterias y organismos bacteriales gram positivos y gram negativos y levaduras se establecieron para varias diferentes formulaciones de EDTA utilizando el método de dilución de agar descrito adelante. Los MIC y los MBC para varios organismos fueron ensayados en combinaciones del o las sales de EDTA.

Los organismos bacteriales gram positivos y gram negativos fueron aislados de pacientes humanos que tiene infecciones relacionadas con catéter para asegurar que las cepas bacterianas fueran activamente patogénicas y fueran del tipo común en infecciones bacterianas relacionadas con catéter en humanos. Los organismos de levaduras fueron recolectados de pacientes que tienen serias infecciones septicémicas. Los

organismos se catalogaron y mantuvieron en el laboratorio de Peter Kite de la Universidad de Leeds.

Varlas soluciones de sal de EDTA y combinaciones de soluciones de sal de EDTA se prepararon al disolver sales de EDTA con grado de reactivo relevante en agua destilada a la concentración de sal EDTA deseada (p/v). Las soluciones de sal de EDTA depositadas concentradas se prepararon para cada sal de EDTA o combinación de sal de EDTA y fueron empleadas para determinar el MIC y el MBC para varios organismos. Las soluciones EDTA de tetra y tri sodio se prepararon utilizando las sales de tetra y tri sodio de EDTA en lugar de utilizar el EDTA di sodio y ajustar el pH de la solución para lograr los rangos deseados. Las soluciones de sal de EDTA se esterilizaron antes de uso y almacenaron a 4°C.

#### Protocolo de Método de Dilución de Agar

##### **Elaboración del agar**

- Colocar 2 litros de agar nutriente en una baño de vapor y dejar durante aproximadamente 1 hora (hasta fundido)
- Permitirle al agar enfriar a 50°C.



.. 000112

- Recolectar 20 botellas de vidrio estéril (125 mL) y localizar 100 mL de agar nutriente en cada uno. A este se puede agregar 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/mL de EDTA tetrasodio (u otra sal de EDTA o combinación de sal de EDTA que se ensaya) utilizando una solución depositada a 200 mg/mL.
- Verter 200 mL de agar en una caja petri estéril y permitirle asentarse. Verter 3 platos adicionales. Marcar los platos con la concentración de EDTA que ellos contienen. Hacer esto para cada concentración.
- Estos platos pueden ser entonces almacenados, hasta que ellos se necesiten, en un refrigerador a 4°C.

#### Inoculación de los platos

- Hacer crecer cultivos durante toda la noche de 23 organismos Gram positivos y 19 organismos Gram negativos en un cultivo de nutriente.
- Diluir cada cultivo a  $10^6$ cfu/mL, utilizando solución salina amortiguada de fosfato (PBS).

113

. 000113

- Utilizar un Inoculador de plato automático para inocular cada plato con 21 organismos.
- Incubar el plato durante toda la noche a 37°C.
- Al siguiente día calificar más o menos el crecimiento.
- Utilizar papel de filtro estéril para transferir el crecimiento de los platos iniciales a platos de agar Cled frescos para determinar el MBC o los MEC.
- Incubar los platos replica durante la noche a 37°C.
- Al siguiente día calificar más o menos el crecimiento. Los MIC y los MBC fueron descritos como las concentraciones más bajas en las cuales no hubo crecimiento.

Los resultados son mostrados en la figura 1A-5C. Las figuras 1A-1D muestran los datos del MIC y el MBC (presentados en solución de EDTA mg/ml, p/v) para muchos organismos gram positivos y gram negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de EDTA de disodio; EDTA de diamonio, EDTA de disodio, EDTA de trisodi, y EDTA tetrasodio.

114

La figura 2 muestra los datos MIC y MBC (presentados como una solución EDTA mg/ml, p/v) para levaduras contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: EDTA tetrasodio; EDTA de dipotasio; y EDTA de diamonio.

La figura 3 y la figura 3B muestran los datos MIC y el MBC (presentados como una solución de EDTA mg/ml, p/v) para organismos gram positivos y gram negativos contra soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de EDTA de disodio cúprico; EDTA de disodio de magnesio y EDTA de sodio férrico.

La figura 4A -4C muestran los datos MIC y MBC (presentados como solución de EDTA mg/ml, p/v) para organismos gram positivos y gram negativos contra combinación de soluciones de sal EDTA que consisten esencialmente de: disodio cúprico y EDTA tetrasodio; disodio cúprico y EDTA de dipotasio; y EDTA de disodio cúprico y de diamonio.

Las figuras 4A-5C muestran los datos MIC Y MBC (presentados como una solución de EDTA mg/ml, p/v) para organismos gram positivos y gram negativos o contra combinación de soluciones de sal de EDTA que consisten esencialmente de: EDTA tetrasodio y diamonio; EDTA tetrasodio y dipotasio; y EDTA de diamonio y dipotasio.

15  
000115

Varías de las combinaciones de sal de EDTA y sales de EDTA fueron efectivas para inhibirlas o eliminar un amplio espectro de cepas bacterianas a concentraciones razonables. Antes del ensayo médico y el uso se ha establecido buenos perfiles de biocompatibilidad para el uso de las sales de EDTA de sodio en humanos y animales, aunque la biocompatibilidad de otras sales de EDTA no se ha establecido. Las sales de EDTA de tetra y disodio parecen ser las más eficaces contra un amplio espectro de bacterias patógenas. Además ellas han sido o podían ser fácilmente establecidas como biocompatibles para uso de humano y veterinario, y ellas son efectivas en costo y estables. La sal de EDTA tetrasodio es adicionalmente activa como un anticoagulante y es altamente soluble en solventes acuosos. Con base en estos factores y en los experimentos subrayados anteriormente, las sales de EDTA de tetra y trisodio fueron escogidas como los candidatos más prometedores para composiciones antisépticas de la presente invención.

### **Ejemplo 2**

**Datos de concentración de erradicación de biopelícula mínima (MBEC) para organismos contra EDTA tetrasodio, utilizando el método dispositivo Calgary modificado.**

La formación de biopelícula es un factor importante en la contaminación bacteriana. Una composición antiséptica

efectiva tiene preferiblemente la capacidad de reducir la ploriferación de biopelícula, o evitar o inhibir la formación de biopelículas. Nuestra solución antiséptica EDTA tetrasodio para determinar si esta podría evitar o inhibir la formación de biopelículas. La concentración de erradicación de biopelícula mínima (MBEC) para varios organismos contra EDTA tetrasodio se estableció utilizando un método dispositivo Calgary modificado. El método Calgary se describe en Olsen et al., Canadian Journal of Veterinary Reseach, 66:86-92 (2002) el método y los resultados se describen adelante.

Las soluciones de sal de EDTA tetrasodio fueron preparadas al disolver reactivo grado sal de EDTA tetrasodio en agua destilada a una concentración de sal de EDTA deseada (p/v). Las soluciones de sal de EDTA de tetrasodio depositada concentradas se prepararon o fueron preparadas para determinar el MBEC para varios organismos en una forma sésil o biopelícula. Las soluciones EDTA tetrasodio se esterilizaron antes de uso y se almacenaron a 4°C.

#### Método

##### **Formación de biopelícula:**

- Utilizar 100ml de un cultivo Muller Hinton durante toda la noche del organismo requerido.

- Pipetear 200uL en todos los pozos en una bandeja de microtitulación de 96 pozos. Ubicar sobre la tapa 96 pasadores. Incubar sobre un agitador orbital durante 24 horas a 37°C y a una velocidad de 200rpm.

**Ensayo de susceptibilidad:**

- Utilizar biopelículas formadas anteriormente.
- Ubicar la tapa (con pasadores) en una nueva bandeja microtituladora de 96 pozos que contiene 250uL de las concentraciones requeridas del agente de ensayo. Incubar durante 1 o 24 horas a 37°C. (no sobre agitador)
- A intervalos de tiempo de 1, 3, 6, y 24 horas remover 4 pasadores para cada concentración de la tapa insertar un destornillador y desviar el pasador dentro del pozo.
- Ubicar 3 pasadores para cada concentración en un lavado de 5ml de PBS e invertirlo una vez.
- Ubicar los 3 pasadores en 3 ml de PBS y sonicar durante 15 minutos.
- Placas de 2 uL sobre placas 3X CLED y esparcir utilizando esparsor de plástico estéril. Incubar a 37°C

durante toda la noche. Leer los conteos de colonias el siguiente día.

- Ubicar el resto del pasador suelo (para cada concentración) en 600 uL de solución salina formal 4% para SEM.

Los valores del MBEC para varios organismos, se expresaron en EDTA de tetrasodio mg/ml (p/v) determinado utilizando este método, son mostrados en la figura 6. Los resultados demuestran que 40 mg/ml de EDTA de tetrasodio (4% p/v) fueron una concentración de radicación de biopelícula efectiva para todas las poblaciones microbianas ensayadas.

Datos de ejemplo generados mediante experimentos MBEC para varios microorganismos se suministran adelante. El EDTA de tetrasodio se utilizó para todos los experimentos, los cuales fueron desarrollados en triplicado.

000119

Tabla 1: organismo *E. coli* 250

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 40152                                           | 53285                                            | 64234                                            | 6133                                              |
|                     | 48175                                           | 62044                                            | 56934                                            | 4960                                              |
|                     | 43796                                           | 61341                                            | 76642                                            | 5120                                              |
| 5                   | 0                                               | 520                                              | 80                                               | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 540                                              | 80                                               | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 620                                              | 133                                              | 730                                               |
| 10                  | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
| 15                  | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
| 20                  | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |

Para *E. coli*, 250, el MBEC = 10mg/mL de EDTA de tetrasodio

Tabla 2: organismo: *Pseudomonas aeruginosa* J26

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 86681                                           | 4400                                             | 92701                                            | 66667                                             |



|    |       |      |       |       |
|----|-------|------|-------|-------|
|    | 89781 | 3060 | 79562 | 35036 |
|    | 94891 | 3080 | 83212 | 41606 |
| 5  | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
| 10 | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
| 15 | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
| 20 | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |
|    | 0     | 0    | 0     | 0     |

Para *Pseudomonas aeruginosa* J26, el MBEC = < 5 mg/mL de EDTA de tetrasodio

**Tabla 3: Organismo: *Enterobacter cloacae* 292**

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 1.00E+06                                        | 103704                                           | 94444                                            | 91241                                             |
|                     | 1.00E+06                                        | 118519                                           | 131481                                           | 116667                                            |
|                     | 1.00E+06                                        | 107407                                           | 100000                                           | 131481                                            |
| 5                   | 69343                                           | 35036                                            | 36496                                            | 0                                                 |
|                     | 67153                                           | 15974                                            | 32197                                            | 0                                                 |
|                     | 67153                                           | 19697                                            | 39416                                            | 0                                                 |
| 10                  | 38686                                           | 12035                                            | 80                                               | 0                                                 |

.. 000121

|    |       |       |     |   |
|----|-------|-------|-----|---|
|    | 42336 | 17803 | 219 | 0 |
|    | 40909 | 18561 | 0   | 0 |
| 15 | 8000  | 8133  | 379 | 0 |
|    | 8533  | 8133  | 219 | 0 |
|    | 7467  | 8267  | 133 | 0 |
| 20 | 13786 | 2840  | 0   | 0 |
|    | 12473 | 2820  | 0   | 0 |
|    | 14661 | 2600  | 0   | 0 |

Para *Enterobacter cloacae* 292, el MBEC = < 5 mg/mL de EDTA tetrasodio

Tabla 4: organismo: *H. Enterococcus* sp.

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 5600                                            | 3520                                             | 4000                                             | 6133                                              |
|                     | 8133                                            | 3980                                             | 3440                                             | 4720                                              |
|                     | 6800                                            | 3920                                             | 3760                                             | 4640                                              |
| 5                   | 1380                                            | 780                                              | 80                                               | 0                                                 |
|                     | 1160                                            | 580                                              | 100                                              | 0                                                 |
|                     | 1140                                            | 500                                              | 120                                              | 0                                                 |
| 10                  | 40                                              | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 100                                             | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 20                                              | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
| 15                  | 40                                              | 0                                                | 20                                               | 0                                                 |
|                     | 0                                               | 0                                                | 0                                                | 0                                                 |
|                     | 80                                              | 0                                                | 20                                               | 0                                                 |
| 20                  | 1490                                            | 730                                              | 160                                              | 0                                                 |

122

|  |      |     |     |   |
|--|------|-----|-----|---|
|  | 1560 | 379 | 160 | 0 |
|  | 2000 | 320 | 140 | 0 |

Para *H. Enterococcus* sp., la MBEC  $\leq$  5 mg/mL de EDTA de tetrasodio

Tabla 5: organismo: *Enterobacter cloacae* J22

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 124074                                          | 107407                                           | 105556                                           | 101952                                            |
|                     | 116667                                          | 91241                                            | 105556                                           |                                                   |
|                     | 112963                                          | 98540                                            | 92701                                            | 120370                                            |
| 5                   | 6400                                            | 267                                              | 2040                                             | 100000                                            |
|                     | 5200                                            | 133                                              | 2160                                             | 0                                                 |
|                     | 8933                                            | 379                                              | 1820                                             | 0                                                 |
| 10                  | 3540                                            | 1920                                             | 267                                              | 0                                                 |
|                     | 3040                                            | 2900                                             | 160                                              | 80                                                |
|                     | 3760                                            | 2340                                             | 219                                              | 1532                                              |
| 15                  | 2620                                            | 1560                                             | 740                                              | 800                                               |
|                     | 2100                                            | 1740                                             | 720                                              | 0                                                 |
|                     | 2720                                            | 1560                                             | 920                                              | 0                                                 |
| 20                  | 2040                                            | 80                                               | 960                                              | 0                                                 |
|                     | 2360                                            | 1460                                             | 840                                              | 0                                                 |
|                     | 1620                                            | 133                                              | 560                                              | 0                                                 |

Para *Enterobacter cloacae* J22, el MBEC = 15mg/mL de EDTA de tetrasodio

Tabla 6: organismo: *Proteus vulgaris* R81

| Conc. EDTA<br>mg/mL | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>1 hora | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>3 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>6 horas | Conteo de<br>colonia/mL<br>después de<br>24 horas |
|---------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0                   | 62044                                           | 81752                                            | 112963                                           | 59259                                             |
|                     | 55474                                           | 73723                                            | 103704                                           | 68519                                             |
|                     | 54015                                           | 78932                                            | 107407                                           | 59124                                             |
| 5                   | 3160                                            | 160                                              | 3460                                             | 0                                                 |
|                     | 4000                                            | 400                                              | 3120                                             | 0                                                 |
|                     | 4000                                            | 160                                              | 3140                                             | 0                                                 |
| 10                  | 1520                                            | 730                                              | 400                                              | 0                                                 |
|                     | 1920                                            | 533                                              | 1460                                             | 0                                                 |
|                     | 1900                                            | 438                                              | 160                                              | 0                                                 |
| 15                  | 2960                                            | 379                                              | 1100                                             | 0                                                 |
|                     | 2580                                            | 80                                               | 780                                              | 0                                                 |
|                     | 2560                                            | 400                                              | 1220                                             | 0                                                 |
| 20                  | 4560                                            | 400                                              | 1520                                             | 0                                                 |
|                     | 4480                                            | 320                                              | 1280                                             | 0                                                 |
|                     | 2820                                            | 240                                              | 720                                              | 0                                                 |

Para *Proteus vulgaris* R81: la MBEC  $\leq$  5 mg/mL de EDTA de tetrasodio

### Ejemplo 3

Procedimiento de tratamiento para asegurar catéter In vitro  
en catéteres positivos de paciente

124

000124

Un procedimiento para asegurar catéter que utilice la solución candidata EDTA tetrasodio (4% p/v) 40 mg/ml se desarrollo y utilizo para catéteres de hemodiálisis de paciente que son ensayados positivos para varias infecciones microbianas. Los catéteres se determinaron por tener infecciones microbianas que se sometieron al tratamiento de aseguramiento de catéter que utiliza EDTA tetrasodio y conteos de colonias se tomaron en varios puntos de tiempo. En un primer experimento, todos los catéteres se trataron con solución EDTA de tetrasodio 4% p/v mientras en un segundo experimento, los catéteres se trataron con soluciones EDTA de tetrasodio en varias concentraciones. Las soluciones de EDTA tetrasodio se prepararon y almacenaron como se describió anteriormente en los ejemplos 1 y 2. Los procedimientos y resultados se describen adelante.

#### Método:

- Catéteres de hemodiálisis renal removidos por sospecha de infección se seleccionaron, mediante lavado con 1mL de salina amortiguada con fosfato estéril debajo de cada lumen. Se desarrollo el cultivo cuantitativo utilizando alícuotas de 1 y 10 uL que se extienden sobre placas de agar con sangre y se incuban.

- Los catéteres se almacenan inicialmente a 4°C hasta después de selección y se esteriliza el lumen con un trapo con alcohol.
- Antes de ensayar el tratamiento de aseguramiento, los catéteres positivos seleccionados se aseguran con nutrientes fundido utilizando una jeringa de 5 mL e incubados durante la noche a 37°C para asegurar la viabilidad de la biopelícula y asegurar la colonización total de todas las superficies endoluminales con el organismo infectado.
- Después de incubación durante la noche, cada lumen de catéter se lavó con 5 mL de solución salina estéril y se cortaron dos piezas de 1 cm desde el extremo distal, cada pieza se colocó en cloruro de calcio estéril en 1 mL de cloruro de calcio estéril 1 M, (para neutralización de agentes) uno para microscopia de exploración de electrones (SEM) y la otra para cultivo, en contenedores universales estériles.
- Para cada procedimiento de cultivo, el universal se colocó en un baño de sonicación durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 20 segundos.
- El cultivo cuantitativo se desarrolló utilizando alícuotas de 1 µl y 10 µl colocadas sobre placas de agar con sangre y se extendieron por medio de

varillas en forma de L plásticas estéril, incubadas durante 37°C o durante la noche y las colonias se contaron al siguiente día.

- El catéter se lavo y se aseguro con la concentración apropiada del fluido asegurado de EDTA tetrasodio e incubado a 37°C durante 18 horas.
- A 3, 6 y 18 horas de incubación des piezas de 1 cm del extremo distal del catéter se cortaron y neutralizaron en 1 ml de solución de cloruro de calcio estéril 1 M.
- Se siguió el procedimiento de conteo cuantitativo, en cada intervalo de tiempo como se describió anteriormente y se retuvo una pieza para SEM.

Diecisiete (17) catéteres de hemodiálisis renal infectados se trataron con una composición antiséptica que consiste en EDTA tetrasodio en una concentración de 40 mg/ml (4% p/v). Los resultados se muestran en la figura 7. Diez catéteres de hemodiálisis renal infectados adicionales, así como también un catéter venoso y uno arterial, se trataron con composición antiséptica que consiste de EDTA tetrasodio en concentraciones de 20-100 mg/ml (2-10% p/b). Los resultados se muestran en la Figura 8.

Los resultados demuestran que 40 mg/ml de EDTA tetrasodio (4% p/v) es eficaz al matar, o reducir dramáticamente, la

población de la mayoría de organismos después de 24 horas de tratamiento. Esta concentración de EDTA tetrasodio es segura para uso en relación con humanos y otros animales y se considera eficaz, y es así una concentración deseada para composiciones antisépticas y métodos de la presente invención.

#### **Ejemplo 4**

**El efecto del EDTA tetrasodio en *Acanthamoeba* y el efecto del *Klebsiella* tratada con EDTA tetrasodio en *Acanthamoeba***

Varlas especies de *Acanthamoeba* son capaces de infectar humanos. Las infecciones acanthamoebicas a menudo resultan como una consecuencia de almacenamiento inadecuado de lentes de contacto y otros dispositivos médicos que entran en contacto con el cuerpo humano. La alimentación del *Acanthamoeba* en poblaciones bacteriales es resistente a muchos tratamientos. El efecto del EDTA tetrasodio, preparado como se describió anteriormente, sobre poblaciones de *Acanthamoeba* se ensayo como sigue. Las composiciones de EDTA tetrasodio también se prepararon utilizando solución salina Page y solución salina fisiológica, como solventes. El efecto de la *Klebsiella* tratada con EDTA tetrasodio en *Acanthamoeba* también se ensayo experimentalmente utilizando la siguiente metodología.

**El efecto del EDTA tetrasodio sobre *Acanthamoeba***



128  
000128**Método:**

- Incubar en una placa de agar sangre fresca con *Klebsiella edwardsii* a 37°C 18 horas antes de ensayo.
- Utilizar una solución de depósito de EDTA de tetrasodio (100 mg/mL), hacer una concentración de 22 y 44 mg/mL en solución salina Page.
- Colocar 9 mL de cada concentración dentro de un tubo de ensayo de vidrio estéril. Colocar 9 mL de solución salina page estéril dentro de otro tubo de ensayo de vidrio estéril para actuar como un control.
- Hacer una suspensión de *Klebsiella edwardsii* en 6 mL de solución salina page estéril. Ajustar al estándar McFarland 5.
- Agregar 1 mL de la suspensión a cada dilución serial y al control. Debido al factor de dilución de la suspensión de *klebsiella* cada concentración será ahora de 20 y 40 mg/mL. El control todavía no contiene EDTA tetrasodio. Respetir todas las concentraciones en solución salina fisiológica.
- Centrifugar para mezclar. Cada tubo debe ahora contener una suspensión de *klebsiella* en McFarland 0.5.

.. 000123

- Raspar la superficie de la placa de Acanthamoeba y suspenderla en 1.5 mL de solución salina page. Centrifugar.
- Agregar 200 uL de la suspensión de acanthamoeba a cada dilución serial y al control.
- Colocar los tubos de ensayo dentro de un incubador a 30°C durante 24 horas.
- Después centrifugar la incubación en cada universal durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Verter el supernadante y resuspender el granulo.
- Colocar 10 uL de duplicado a cada solución y al control sobre una placa agar sin nutrientes con un pasto de klebsiella. Cortar una ranura hacia abajo del centro de cada plato para evitar la migración y colocar 10 uL de la dilución que se ensaya en cada lado.
- Marcar cada sitio de inoculación con un esfero o marcador negro.
- Incubar las placas durante 72 horas a 30°C.
- Controlar el crecimiento del Acanthamoeba mediante dirigir la visualización de las placas que utilizan un microscopio de luz de pieza de ojo de magnificación X10, partiendo de cada sitio de inoculación.

130  
.. 000124

**Tabla 7: crecimiento después de 24 horas de incubación con  
EDTA tetrasodio**

| Concentración de EDTA mg/mL en<br>(solución) | Crecimiento de Acanthamoeba |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 20 (salina page)                             | ++                          |
| 20 (salina page)                             | ++                          |
| 40 (salina page)                             | -                           |
| 40 (salina page)                             | -                           |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                         |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                         |
| 20 (salina fisiológica)                      | ++                          |
| 20 (salina fisiológica)                      | ++                          |
| 40 (salina fisiológica)                      | -                           |
| 40 (salina fisiológica)                      | ++                          |

**Tabla 8: crecimiento después de 24 horas de incubación con  
EDTA tetrasodio (repetición)**

| Concentración de EDTA mg/mL en<br>(solución) | Crecimiento de Acanthamoeba |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 20 (salina page)                             | ++                          |
| 20 (salina page)                             | ++ (trophozoites presentes) |

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| 10 (salina page)        | -                           |
| 40 (salina page)        | -                           |
| 0 (salina fisiológica)  | +++                         |
| 0 (salina fisiológica)  | +++                         |
| 20 (salina fisiológica) | -                           |
| 20 (salina fisiológica) | -                           |
| 40 (salina fisiológica) | +++                         |
| 40 (salina fisiológica) | ++ (trophozoites presentes) |

**Tabla 9: crecimiento después de 48 horas de incubación con  
EDTA tetrasodio**

| Concentración de EDTA mg/mL en<br>(solución) | Crecimiento de Acanthamoeba  |
|----------------------------------------------|------------------------------|
| 0 (salina page)                              | +++ (trophozoites presentes) |
| 0 (salina page)                              | +++ (trophozoites presentes) |
| 20 (salina page)                             | -                            |
| 20 (salina page)                             | -                            |
| 40 (salina page)                             | -                            |
| 40 (salina page)                             | -                            |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                          |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                          |
| 20 (salina fisiológica)                      | -                            |
| 20 (salina fisiológica)                      | -                            |
| 40 (salina fisiológica)                      | -                            |
| 40 (salina fisiológica)                      | -                            |

Los resultados demuestran que 20-40 mg/ml (2-4% p/v) de EDTA tetrasódico en salina fisiológica y page es efectiva para reducir, o eliminar sustancialmente poblaciones de *Acanthamoeba* después de 48 horas de exposición. Las composiciones del EDTA tetrasódico preparadas que utilizan agua como disolvente también fueron efectivas (datos no mostrados). Estos resultados indican que las composiciones antisépticas de la presente invención son adecuadas para la aplicación como soluciones de remojo para varios instrumentos médicos y dispositivos, que incluyen lentes de contacto y dispositivos dentales, ortodónticos y/o periodónticos. Las composiciones antisépticas de la presente invención también son efectivas para eliminar sustancialmente poblaciones de *Acanthamoeba* en otras aplicaciones, que incluyen sistemas de distribución y almacenamiento de agua de mar y fresca, en unidades de acondicionamiento de aire, ventilación y calefacción, humidificadores, unidades de diálisis, y similares.

La alimentación de la *Acanthamoeba* en poblaciones bacteriales. Nosotros por lo tanto hemos ensayado según la población bacteriana que se trato con composiciones EDTA antisépticas de la presente invención pueden tener cualquier efecto sobre la alimentación del *Acanthamoeba* en la población bacteriana tratada.

133

**El efecto de Klebsiella tratada EDTA tetrasodio en Acanthamoeba**

**Método:**

- Incubar en una placa de agar sangre fresca con *Klebsiella edwardsii* a 37°C 18 horas antes de ensayo.
- Utilizar una solución de depósito de EDTA tetrasodio (100 mg/mL), hacer una concentración de 22 y 44 mg/mL en solución salina Page.
- Colocar 9 mL de cada concentración dentro de un tubo de ensayo de vidrio estéril. Colocar 9 mL de solución salina page estéril dentro de otro tubo de ensayo de vidrio estéril para actuar como un control.
- Hacer una suspensión de *Klebsiella edwardsii* en 6 mL de solución salina page estéril. Ajustar a estándar McFarland 5.
- Agregar 1 mL de la suspensión a cada dilución serial y al control. Debido al factor de dilución de la suspensión de *klebsiella* cada concentración será ahora de 20 y 40 mg/mL. El control todavía no contiene EDTA tetrasodio. Repetir todas las concentraciones en solución salina fisiológica.

- Centrifugar para mezclar. Cada tubo debe ahora contener una suspensión de klebsiella en McFarland 0.5.
- Incubar los tubos a 37°C durante la noche.
- Al siguiente día centrifugar los tubos a 300 rpm durante 10 minutos. Desviar el supernadante; agregar 10 ml de solución salina fresca o solución salina page, resuspender y recentrifugar. Desviar el supernadante en 1 ml de solución salina o solución de page.
- Raspar la superficie de la placa de Acanthamoeba y suspenderla en 1.5 ml de solución salina page. Centrifugar.
- Agregar 200 uL de la suspensión de acanthamoeba a 3 tubos que contiene 9 ml de solución salina y 3 tubos que contiene 3 ml de solución salina page. Etiquetar cada tubo como si ellos tuvieran las concentraciones EDTA utilizadas en la incubación con Klebsiella.
- Agregar 1 ml de Klebsiella resuspendido a el tubo apropiado que contiene Acanthamoeba.
- Colocar los tubos de ensayo dentro de un incubador a 30°C durante 24 horas.
- Fijar otro conjunto de tubos para incubar Klebsiella con EDTA a 37°C, durante la noche como se hizo anteriormente.

135

- 000135

- Centrifugar después de incubación cada tubo que contiene la Acanthamoeba durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Verter el supernadante y resuspender el granulo.
- Colocar 10 uL de duplicado a cada dilución y al control sobre una placa agar sin nutrientes con un pasto de klebsiella. (no incubado con EDTA). Cortar una ranura hacia abajo del centro de cada plato para evitar la migración y colocar 10 uL de la dilución que se ensaya en cada lado.
- Marcar cada sitio de inoculación con un esfero o marcador negro.
- Incubar placas 30°C.
- Controlar el crecimiento del Acanthamoeba mediante la visualización de las placas que utilizan un microscopio de luz de pieza de ojo de magnificación X10, partiendo en cada sitio de inoculación.
- Colocar el restante de la suspensión de Acanthamoeba dentro de un conjunto de tubos que contienen solución salina fresca o solución salina page fresca.
- Lavar y resuspender la Klebsiella, que ha sido incubada durante la noche con el EDTA, como se hizo anteriormente y agregar a cada tubo apropiado que contiene la Acanthamoeba.
- Incubar los tubos a 30°C durante la noche.



- Después de incubación centrifugar cada universal durante 10 minutos a 3000 rpm.
- Verter el supernadante y resuspender el granulo.
- Colocar 10 uL de duplicado de cada dilución y el control sobre una placa de agar sin nutrientes con un pasto de klebsiella (no incubado con EDTA). Cortar una ranura hacia abajo del centro de cada placa para evitar la migración y colocar 10 uL de la dilución que se ensaya en cada lado.
- Marcar cada sitio de inoculación con un esfero o un marcador negro.
- Incubar placas a 30°C.
- Marcar el crecimiento de la Acanthamoeba mediante visualización directa de las placas utilizando microscopio de luz de pieza de ojo de magnificación X10, partiendo en cada sitio de inoculación.

Tabla 10: crecimiento de Acanthamoeba después de 24 horas de incubación con Klebsiella (previamente incubada con EDTA)

| Concentración de EDTA mg/mL en<br>(solución) | Crecimiento de Acanthamoeba |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 0 (salina page)                              | --                          |
| 20 (salina page)                             | ++                          |

- 000137

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 20 (salina page)        | ++  |
| 40 (salina page)        | ++  |
| 40 (salina page)        | -   |
| 0 (salina fisiológica)  | +++ |
| 0 (salina fisiológica)  | +++ |
| 20 (salina fisiológica) | ++  |
| 20 (salina fisiológica) | ++  |
| 40 (salina fisiológica) | -   |
| 40 (salina fisiológica) | -   |

**Tabla 11: crecimiento de Acanthamoeba después de 48 horas de incubación con Klebsiella (previamente incubada con EDTA)**

| Concentración de EDTA mg/mL en<br>(solución) | Crecimiento de Acanthamoeba |
|----------------------------------------------|-----------------------------|
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 0 (salina page)                              | +++                         |
| 20 (salina page)                             | +                           |
| 20 (salina page)                             | -                           |
| 40 (salina page)                             | -                           |
| 40 (salina page)                             | -                           |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                         |
| 0 (salina fisiológica)                       | +++                         |
| 20 (salina fisiológica)                      | -                           |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| 20 (salina fisiológica) | - |
| 40 (salina fisiológica) | - |
| 40 (salina fisiológica) | - |

Estos resultados demuestran que el crecimiento que el crecimiento de la Acanthamoeba puede ser detenido y las poblaciones de Acanthamoeba pueden ser sustancialmente eliminados al tratar las poblaciones bacterianas en las cuales ellas se alimentan con composiciones EDTA antisépticas de la procedente invención. Las composiciones EDTA antisépticas que tiene una concentración EDTA tetrasodio de entre 20-40 mg/mL (2-4% p/v) son efectivas. La utilidad de las sustancias de composiciones antiséptica de la presente invención para aplicaciones tales como soluciones de enjuague para varios instrumentos médicos y dispositivos, incluyen lentes de contacto y dispositivos dentales/ ortodónticos/ periodónticos, así como también otras aplicaciones tales como sistemas de distribución y almacenamiento de agua de mar y fresca, en unidades de acondicionamiento de aire y ventilación, humidificadores, unidades de diálisis, y similares.

#### Ejemplo 5

Se condujeron experimentos para determinar si las composiciones de EDTA tetrasodio evitan la unión de, y

139

. 000139

adherencia a, los tubos de silicio de microorganismos. Si la unión y adherencia a los tubos de silicio de microorganismos se pueden evitar, la formación de biopelículas se puede reducir. El protocolo experimental utilizado y los resultados obtenidos se suministrarán adelante.

**Método:**

- Llenar secciones de 1 cm de tubos de silicio con cera fundida para sellar cada endolumen, endurecida a 4°C.
- Colocar 4 secciones dentro de 30 mL de solución salina amortiguada con fosfato estéril (PBS) como un control. Colocar 8 secciones dentro de 30 mL de EDTA tetrasodio 4%.
- Después de 30 minutos, colocar las 4 secciones de los PBS y 4 de las secciones del EDTA tetrasodio 4% dentro de contenedores limpios en un bloque caliente, y permitir secar.
- Transferir las 4 secciones restantes dentro de 30 mL de PBS estéril para enjuagado, luego se le permite secar al aire como se hizo anteriormente.
- Una vez secado colocar todas las 12 secciones dentro de cultivos de  $10^5$  cfu/mL cultivos de organismos mezclados (cultivados durante la noche de *Klebsiella pneumoniae* y crecimiento CNS en nutrientes fundidos a 37°C), incubado a 37°C.

- Después de 30 minutos se remueven 2 secciones de cada tipo y se enjuagan en 2 x 30 mL de PBS estéril. Se seca al aire como se hizo anteriormente. Se utilizan lavados separados y frascos de secado para evitar cada tipo de contaminación.
- Coloque cada sección dentro de 1 mL de PBS en un tubo se centrifugado, se sonica en un baño de agua de sonicación durante 15 minutos.
- Se coloca cada tubo en duplicado en el inoculador de placa automático, 50 uL en una distribución 1cg.
- Se colocan duplicados de placa en cada tubo diluido 1/10.
- Se incuban las placas a 37°C durante la noche. Se leen conteos de colonia en un lector de placa automático protoCOL. Se repite después de 6 horas.

Los resultados para el control y las secciones de carácter tratadas con EDTA se muestran adelante.

Tabla 12

| Tipo de sección de catéter | Tipo de incubación | Número de secciones de catéter | Conteo de colonia en NEAT (cfu/mL) | Conteo de colonia en 1/10 (cfu/mL) |
|----------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Control                    | 30 min             | 1                              | 240                                | 0                                  |

000141

|             |         |   |      |       |
|-------------|---------|---|------|-------|
|             |         |   | 220  | 0     |
| control     | 30 min  | 2 | 280  | 1     |
|             |         |   | 140  | 0     |
| Control     | 6 horas | 1 | 1480 | 0     |
|             |         |   | 1120 | 0     |
| control     | 6 horas | 2 | 5200 | 7800  |
|             |         |   | 5467 | 5800  |
| EDTA Secado | 30 min. | 1 | 240  | 1333  |
| con aire    |         |   | 400  | 800   |
| EDTA Secado | 30 min. | 2 | 267  | 0     |
| con aire    |         |   | 720  | 0     |
| EDTA Secado | 6 horas | 1 | 1280 | 16800 |
| con aire    |         |   | 1120 | 8800  |
| EDTA Secado | 6 horas | 2 | 2240 | 21333 |
| con aire    |         |   | 2340 | 16000 |
| EDTA        | 30 min. | 1 | 267  | 0     |
| Enjuagado   |         |   | 379  | 0     |
| EDTA        | 30 min. | 2 | 1040 | 0     |
| Enjuagado   |         |   | 0    | 0     |
| EDTA        | 6 horas | 1 | 1980 | 9600  |
| Enjuagado   |         |   | 1740 | 12800 |
| EDTA        | 6 horas | 2 | 3600 | 19000 |
| Enjuagado   |         |   | 3660 | 8600  |

Los resultados de la solución EDTA pura se encontraron ser más reproducibles, y estas fueron por lo tanto analizadas adicionalmente. Como las secciones se colocaron en 1 mL de solución, los conteos por mL son iguales a los conteos por sección.

142

Tabla 13

| Tipo de sección de catéter | Conteo medio de colonia después de 30 minutos (cfu/sección) | Conteo medio de colonia después de 6 horas (cfu/sección) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Control                    | 880                                                         | 3317                                                     |
| EDTA secado al aire        | 407                                                         | 1745                                                     |
| EDTA enjuagado             | 421                                                         | 2745                                                     |

Tabla 14

| Tipo de sección de catéter | % de reducción media en cfu/sección del control después de 30 minutos | % de reducción media en cfu/sección del control después de 6 horas |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| EDTA secado al aire        | 53.8%                                                                 | 47.4%                                                              |
| EDTA enjuagado             | 52.2%                                                                 | 17.3%                                                              |

Se repite durante 24 horas con Klebsiella+CNS:

Tabla 15

| Tipo de sección de catéter | Conteo medio de colonia después de 30 minutos (cfu/sección) | Conteo medio de colonia después de 6 horas (cfu/sección) | Conteo medio de colonia después de 24 horas (cfu/sección) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Control                    | 377                                                         | 9205                                                     | 105906                                                    |
| EDTA secado del aire       | 273                                                         | 3720                                                     | 70370                                                     |
| EDTA enjuagado             | 474                                                         | 9499                                                     | 77051                                                     |

Tabla 16

| Tipo de sección de catéter | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 30 minutos | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 6 horas | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 24 horas |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| EDTA secado del aire       | 27.4%                                                                           | 59.6%                                                                        | 33.5%                                                                         |
| EDTA enjuagado             | +25.7%                                                                          | +31.9%                                                                       | 27.2%                                                                         |

+denota incremento en el medio cfu/sección de control

Resultados para *Pseudomonas aeruginosa*:

Tabla 17



| Tipo de sección de catéter | Conteo medio de colonia después de 30 minutos (cfu/sección) | Conteo medio de colonia después de 6 horas (cfu/sección) | Conteo medio de colonia después de 24 horas (cfu/sección) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Control                    | 6400                                                        | 341994                                                   | 1290000                                                   |
| EDTA secado del aire       | 410E                                                        | 30000                                                    | 474494                                                    |
| EDTA enjuagado             | 5200                                                        | 15375E                                                   | 1150000                                                   |

Tabla 18

| Tipo de sección de catéter | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 30 minutos | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 6 horas | Porcentaje % de reducción medio en cfu/sección de control después de 24 horas |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| EDTA secado del aire       | 35.8                                                                            | 91.2                                                                         | 83.2                                                                          |
| EDTA enjuagado             | 18.8                                                                            | 55.0                                                                         | 10.8                                                                          |

Estos resultados demuestran que al menos una reducción de término corto en las poblaciones bacteriales en secciones de catéter enjuagadas y secadas al aire.

#### Ejemplo 6

Valores MBC alterados cuando se combina EDTA tetrasodio con etanol

Soluciones que tienen un rango de concentraciones de EDTA tetrasodio (0,0.1,0.5,1,2,3,4 y 8 mg/ml, p/v) se formularon con agua y etanol (para lograr concentraciones finales de etanol de 0,0.1,0.5,1,5,10,20 y 40% en agua) para ensayar la eficacia de soluciones EDTA solas, soluciones de alcohol solas, y soluciones de EDTA-alcohol. Las soluciones de depósito concentradas de EDTA tetrasodio se prepararon en agua destilada y se agregó etanol a las soluciones de depósito acuoso concentrado para suministrar la concentración de etanol apropiado.

#### Método:

- Cultivo de un organismo en nutriente fundido durante la noche a 37°C.
- Soluciones de depósito de alcohol y EDTA tetrasodio se utilizan para llenar un patrón de rejilla en placas de 96 pozos (una por cultivo), que utiliza soluciones EDTA que tienen 0,0.1,0.5,1,2,3,4, y 8 mg/ml de concentración de tetrasodio, p/v, en solventes de alcohol isopropilo que contienen 0,0.1,0.5,1,5,10,20 y 40% de alcohol, p/v en agua.
- Cada pozo contiene 150 uL de cada diluyente y 50 uL de organismos a  $1 \times 10^8$  cfu/mL.

146

- En periodos de tiempo de 5 minutos, 6 horas y 24 horas cada poso se cultiva al colocar una tapa de 96 pines sobre la placa (y dentro de cada poso) luego se transfiere la tapa a placas de 96 posos, que contienen 300  $\mu$ L de nutrientes fundidos frescos en cada poso. Se incuba durante la noche a 37°C. Se incuba cada placa inculada a 37°C durante el periodo de incubación.
- Se registra la turbidez de cada poso después de 24 horas.

Los resultados de varios organismos se muestran adelante.

Tablas 19

| Organismo                | EDTA<br>tetrasodio MBC<br>(mg/mL) | Alcohol MBC<br>(%) | EDTA tetra-<br>sodio MBC<br>(mg/mL) +<br>alcohol (%) |
|--------------------------|-----------------------------------|--------------------|------------------------------------------------------|
| E. coli                  | 3                                 | 10                 | 0.5 y 0.5                                            |
| Proteus sp.              | 3                                 | 10                 | 2 y 1                                                |
| CNS (I)                  | 8                                 | 10                 | 2 y 1                                                |
| Klebsiella sp.           | 6                                 | 10                 | 1 y 1                                                |
| Staphylococcus<br>aureus | 0.1                               | 0.1                | 0.1 y 0.1                                            |
| Pseudomonas<br>sp.       | 2                                 | 10                 | 2 y 1                                                |
| CNS (II)                 | 8                                 | 10                 | 0.5 y 0.5                                            |

000142

Las soluciones EDTA tetrasodio en agua fueron más efectivas al matar los microorganismos ensayados que estaban en las soluciones de etanol (solas). La combinación de soluciones de alcohol en EDTA tetrasodio mató microorganismos ensayados en las concentraciones más bajas. Más bajas. El EDTA tetrasodio 2 mg/mL (0.2 p/v) en 1% de solución de alcohol suministro excelentes resultados y tuvieron un efecto bactericida sobre todos los organismos ensayados. Esta solución antiséptica es efectiva a concentraciones más bajas de EDTA tetrasodio y etanol que las soluciones de EDTA tetrasodio en agua solas o etanol solo. Adicionalmente, es efectivo en costos, seguro y conveniente para fabricar y usar. Las composiciones antisépticas de la presente invención para aplicación tópica así comprenden sales de EDTA en un solvente acuoso mezclado y etanol.

#### Ejemplo 7

##### Solubilidad de EDTA tetrasodio en etanol y efecto sobre el pH

La solubilidad del EDTA tetrasodio en etanol se ensayo, y el pH de varias soluciones de Tetrasodio en solventes de alcohol se midió.

##### Método:

- Se peso EDTA tetrasodio en duplicados a través de rangos 10-100 mg en 1.5 ml de tamaños de tubos Eppendorf. 1 mL de 74% de etanol se agrego a cada tubo y se centrifugo durante 30s.
- Para el conjunto duplicado de EDTa tetrasodio pesado, 0.5 mL de agua destilada estéril se agrego y se centrifugo, seguido por 0.5 mL de 74% de etanol.
- Cada uno de los tubos de EDA tetrasodio se ensayo para pH en donde se observo solubilidad.

Los resultados experimentales de mostraron que el EDTA tetrasodio era completamente insoluble en 74% de solución de etanol. Los resultados demostraron adicionalmente que, cuando se disolvió el tetrasodio en agua destilada en concentraciones en el rango de 10-100 mg/mL, p/v, el EDTA de tetrasodio restante se mantuvo en la solución luego de la adición de etanol. Una técnica preferida involucra así solubilizar las sales de EDTA en una primera solución acuosa, y luego agregar etanol u otro solvente en el que las sales de EDTA son menos solubles o insolubles. Preparado de esta forma, las soluciones de sal de EDTA se esperan que sean estables durante el tiempo. Los valores de pH medidos para varias soluciones fueron son como sigue:

149

000149

|                             |          |
|-----------------------------|----------|
| 74% de etanol, solo         | pH 7.8   |
| Agua                        | pH 7.1   |
| + 10 mg de EDTA tetrasodio  | pH 9.0   |
| + 20 mg de EDTA tetrasodio  | pH 10.8  |
| + 40 mg de EDTA tetrasodio  | pH 11    |
| + 80 mg de EDTA tetrasodio  | pH 11.15 |
| + 100 mg de EDTA tetrasodio | pH 11.25 |

### Ejemplo 8

#### Efecto de auto a 121°C en soluciones EDTA tetrasodio

Se ensayo el efecto de la auto clave en soluciones de EDTA tetrasodio para determinar si el autoclave puede ser utilizado para esterilizar soluciones de EDTA tetrasodio antes de uso. La metodología utilizada y los resultados se describen adelante.

#### Método:

- Fabricar duplicados de 0, 20, 80 y 100 mg/mL de EDTA tetrasodio en agua estéril y nutriente de agar fundido estéril a 50°C.
- Dejar un conjunto a temperatura ambiente (sin calentar) y un conjunto en autoclave (caliente).
- Colocar al siguiente día todas botellas de agar en un vaporizador para fundir durante 40 minutos.

... 000150 152

**Medición de las zonas de difusión:**

- Utilizando un perforador de corcho se perforan dos huecos en 16 placas de agar con sangre fresca.
- Se hace una suspensión de 0.5 Mcfarland de CNS y se expande utilizando una compresa estéril sobre las placas para crear un linón.
- 150 µL de soluciones de tetrasodio en pipetas se colocan en los agujeros perforados en duplicado y se incuban a 37°C durante la noche.
- Al siguiente día se miden las zonas de difusión y se registran los resultados.

Los resultados, medidas en tamaños de zona (mm) se presentan adelante. Los tamaños de zona de los controles fueron sembrados contra concentración, para permitir la determinación de concentraciones EDTA actuales en las muestras de ensayo, que también se presentan adelante. Estos resultados demuestran que el autoclave de las composiciones EDTA tetrasodio, si están en agua estéril o en agar, no afectan materialmente la actividad antimicrobiana de las composiciones EDTA tetrasodio.

000151

Tabla 20: tamaños de zona en mm

| Concentración de EDTA mg/mL | EDTA en agua estéril (control) | EDTA en autoclave de agua estéril | EDTA en agar | EDTA en autoclave de agar |
|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|---------------------------|
| 0                           | 0                              | 0                                 | 0            | 0                         |
|                             | 0                              | 0                                 | 0            | 0                         |
| 20                          | 13.2                           | 11.6                              | 13.5         | 12.7                      |
|                             | 13.2                           | 11.6                              | 13.5         | 12.7                      |
| 80                          | 16.1                           | 15.2                              | 17.2         | 15.3                      |
|                             | 16.1                           | 15.2                              | 17.2         | 15.3                      |
| 100                         | 17.1                           | 17.0                              | 17.1         | 16.4                      |
|                             | 17.1                           | 17.0                              | 17.1         | 16.4                      |

Tabla 21: concentración actual de EDTA

| Concentración de EDTA inicial efecto mg/mL | EDTA en agua estéril (control) | EDTA en autoclave de agua estéril | EDTA en agar | EDTA en autoclave de agar |
|--------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|---------------------------|
| 0                                          | 0                              | 0                                 | 0            | 0                         |
| 20                                         | 20                             | 16                                | 26           | 19                        |
| 80                                         | 80                             | 60                                | 101          | 62                        |
| 100                                        | 100                            | 98                                | 100          | 83                        |

## Ejemplo 9

Efecto de autoclave en 121°C en diferentes formulaciones de  
EDTA



.. 000152

Ensayamos el efecto de la autoclave en diferentes formulaciones de soluciones EDTA para determinar si el autoclave puede ser utilizado para esterilizar varias soluciones de EDTA antes de uso. La metodología utilizada y los resultados se describen adelante.

**Método:****Construcción del agar:**

- Colocar 50 mL de solución de agar nutriente dentro de botellas de vidrio estéril 7x100 mL.
- No agregar EDTA en polvo a la primera solución (marcada 0).
- Agregar 2000 mg de EDTA en polvo a la segunda botella (marcada 40 mg/mL auto).
- Agregar 4000 mg de EDTA en polvo a la tercera botella (marcada 80 mg/mg auto).
- Agregar 500 mg de EDTA en polvo a la Cuarta botella (marcada 100 mg/mL auto).
- No agregar EDTA a las botellas 5,6 y 7 (pero etiquetar las 40,80 y 100 mg/mL 100 autoclaves), dejarlas a temperatura ambiente.

- Hacer esto para cada formulación EDTA para ensayo, y autoclave para todas las botellas, marcar auto, a 121°C durante 20 minutos.
- Al siguiente día, colocar todas las botellas en un baño de vapor para fundir el agar para vertido.
- Una vez fundido, permitir enfriarse a 50°C antes de agregar la cantidad apropiada de EDTA a las botellas etiquetadas SIN autoclave. Todas las botellas están listas ahora para ser ensayadas.

#### Medición de las zonas de difusión

- Utilizar un perforador de corcho, perforar dos agujeros en 7 placas agar con sangre fresca.
- Hacer una suspensión Mcfarland 0.5 de CNS y extenderla utilizando una compresa estéril sobre las placas para crear un linón.
- 150 uL de pipetas de cada botella dentro de dos agujeros separados e. incubado a 37°C durante la noche.
- Hacer esto para cada formulación EDTA.
- Al siguiente día se miden las zonas de difusión y se registran los resultados. Los agujeros duplicados se utilizan y se hacen dos mediciones por zona.

154

000154

Soluciones EDTA ferricas y cúpricas no producen ninguna zona. El efecto de calentar luego estas soluciones no puede ser por lo tanto medido al utilizar este método. La medición de los tamaños de zona para soluciones EDTA di-amonio, EDTA di-potasio y EDTA magnesio se suministran adelante. Los tamaños de zona de los controles (sin calor) se cultivan contra concentración para permitir determinación de las concentraciones de EDTA actuales en las muestras de ensayo (calientes), y se suministran los resultados.

Tabla 21: tamaños de zonas (mm)

| Concentraci<br>ón de EDTA<br>(mg/mL) | EDTA<br>Di-<br>amonio<br>no<br>calient<br>e | EDTA<br>Di-<br>amonio<br>calient<br>e | EDTA<br>Di-<br>potasio<br>no<br>calient<br>e | EDTA<br>Di-<br>potasio<br>calient<br>e | EDTA<br>magnesi<br>o no<br>calient<br>e | EDTA<br>magnesi<br>o<br>calient<br>e |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| 0                                    | 0                                           | 0                                     | 0                                            | 0                                      | 0                                       | 0                                    |
|                                      | 0                                           | 0                                     | 0                                            | 0                                      | 0                                       | 0                                    |
|                                      | 0                                           | 0                                     | 0                                            | 0                                      | 0                                       | 0                                    |
|                                      | 0                                           | 0                                     | 0                                            | 0                                      |                                         | 0                                    |
| 40                                   | 18.3                                        | 17.9                                  | 16.2                                         | 15.5                                   | 6.8                                     | 10.6                                 |
|                                      | 18.3                                        | 17.9                                  | 16.2                                         | 15.5                                   | 6.8                                     | 10.6                                 |
|                                      | 18.3                                        | 17.9                                  | 16.2                                         | 15.5                                   | 6.8                                     | 10.6                                 |
|                                      | 18.3                                        | 17.9                                  | 16.2                                         | 15.5                                   | 6.8                                     | 10.6                                 |
| 80                                   | 19.7                                        | 19.7                                  | 18.9                                         | 18.3                                   | 10.0                                    | 10.8                                 |
|                                      | 19.7                                        | 19.7                                  | 18.9                                         | 18.3                                   | 10.0                                    | 10.8                                 |
|                                      | 19.7                                        | 19.7                                  | 18.9                                         | 18.3                                   | 10.0                                    | 10.8                                 |
|                                      | 19.7                                        | 19.7                                  | 18.9                                         | 18.3                                   | 10.0                                    | 10.8                                 |

000155

|     |      |      |      |      |     |      |
|-----|------|------|------|------|-----|------|
| 100 | 20.0 | 20.6 | 18.2 | 20.0 | 8.3 | 11.8 |
|     | 20.0 | 20.6 | 18.2 | 20.0 | 8.3 | 11.8 |
|     | 20.0 | 20.6 | 18.2 | 20.0 | 8.3 | 11.8 |
|     | 20.0 | 20.6 | 18.2 | 20.0 | 8.3 | 11.8 |

Tabla 22: valores actuales de EDTA con autoclave

| Concentración<br>de EDTA mg/mL | EDTA Di-amonio<br>caliente | EDTA Di-<br>potasio<br>caliente | EDTA magnesio<br>caliente |
|--------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 0                              | 0                          | 0                               | 0                         |
| 40                             | 39                         | 38                              | >140                      |
| 80                             | 80                         | 71                              | >140                      |
| 100                            | 150                        | >140                            | >140                      |

Los resultados demuestran que el autoclave no disminuye la eficacia de la mayoría de composiciones de sal EDTA. El autoclave de las composiciones antisépticas de la presente invención pueden por lo tanto ser llevadas a cabo siguiendo la preparación para suministrar composiciones antisépticas estériles.

#### Ejemplo 10

Valores de pH de sales EDTA, cloruro de calcio y citrato de sodio

000156

156

Los valores de pH de varias soluciones de sal EDTA, cloruro de calcio, y citrato de sodio, que atizan agua destilada como el solvente y concentraciones específicas se mide. Los resultados se muestran adelante.

|                                        |         |
|----------------------------------------|---------|
| EDTA ácido libre 10%                   | pH 4.7  |
| EDTA Di-amonio 10%                     | pH 4.33 |
| EDTA sodio calcio 10%                  | pH 6.68 |
| EDTA Di-potasio 10%                    | pH 4.3  |
| EDTA cobre 10%                         | pH 6.15 |
| EDTA tetrasodio 10%                    | pH 11.6 |
| EDTA tetrasodio 2%                     | pH 11   |
| EDTA TS neutralizado cloruro de calcio | pH 7.3  |
| Cloruro de calcio, 1 molar             | pH 3.8  |
| Citrato de sodio 50%, 25%              | pH 8.5  |

#### Ejemplo 11

#### Confirmación de las propiedades anticoagulante de soluciones

#### EDTA

Las propiedades anticoagulantes de la soluciones EDTA se verificaron utilizando la siguiente metodología.

#### Método:

. 000157

- Aliquotas de 100  $\mu$ L de un rango de concentraciones (0.5-100 mg/mL) de soluciones tetrasodio c EDTA Di-sodio, ajustadas un pH de 11.0-11.6, se colocaron en tubos plásticos tapados.
- 90  $\mu$ L de sangre fresca de voluntarios saludables se agregó a cada alícuota de soluciones mezcla gentilmente mediante inmersión de los tubos con sangre a intervalos regulares.

Los resultados revelaron que los tubos de control que contenían sangre sin solución de EDTA tiene tiempos de coagulación de 10-23 minutos. Los tubos que contienen soluciones de EDTA di-sodio todas tienen tiempos de coagulación en exceso de 5 días. Los tubos de EDTA tetrasodio que tiene una concentración mayor de 1 mg/ml tienen tiempos de coagulación en exceso de 5 días. Los tubos de EDTA tetrasodio que tiene una concentración de 0.5 mg/mL coagularon en 28 minutos. El EDTA tetrasodio es por lo tanto efectivo como un anticoagulante en concentraciones en exceso de 1 mg/mL (1% p/v).

### Ejemplo 12

#### Osmolaridad de las suspensiones de sal tetrasodio

000153

158

La osmolaridad y la lisis de células rojas de soluciones EDTA tetrasodio en agua y solución salina fisiológica que tienen varias concentraciones se ensayo utilizando técnicas de laboratorio estándar. La lisis de células rojas se ensayo al agregar 50 uL de EDTA de sangre en 2 mL cada concentración de cada solución durante 2 horas. El rango de osmolaridad de plasma era de 275-295 m/osmol.

Tabla 23

|                                                         | Osmolaridad<br>(m/osmol) | Lisis de célula<br>roja |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 2% de EDTA tet sod en<br>agua Dist                      | 142                      | ++                      |
| 4% de EDTA tet sod en<br>agua Dist                      | 277                      | +                       |
| 2% de EDTA tet sod en<br>solución salina<br>fisiológica | 219                      | +/-                     |
| 4% de EDTA tet sod en<br>solución salina<br>fisiológica | 538                      | -                       |

Ejemplo 13

Eficacia de las tres sales EDTA en la disolución de cristales  
de orina artificial (AUC)

000159

Un problema con catéteres urinarios es que los cristales de orina tienden a acumularse en la superficie del catéter. El depósito de los cristales de orina puede promover la colonización microbiana y/o la formación de biopelículas, así como también reducir el flujo a través del catéter. Sería por lo tanto deseable utilizar una composición sanitaria en relación con los catéteres urinarios que reduzca la formación de cristales de orina. La eficacia de las tres soluciones de sal EDTA sobre la disolución de cristales de orina artificial se ensayó utilizando la metodología descrita adelante.

**Materiales:**

- 1 Orina artificial en contenedores universales plásticos de 25 ml con ureasa, incubada a 45°C durante 7 días.
- 2 Soluciones EDTA tetrasodio, di-amonio, di-potasio a 100 mg/ml.

**Método:**

- \* Centrifugar cristales de orina artificial a 4000 rpm durante 2 minutos.
- \* Decantar el supernadante y lavar los cristales en agua seguido por centrifugación.



000180

- Tras suspender los cristales a 1 mL en agua y alícuotas de 200  $\mu$ L dentro de 4 contenedores universales.
- Agregar 4 mL de 100 mg/mL de solución de cada sal EDTA y agua como un control a cada universal a temperatura ambiente.
- Después de 1, 2 y 3 horas observar visualmente la disolución de los cristales comparado con el control

Los resultados se muestran adelante. Todas las soluciones de sales EDTA reducen los depósitos de cristal de orina comparados con una solución acuosa. Las soluciones de sal EDTA son por lo tanto adecuadas para uso con catéteres urinarios.

Tabla 24

| solución            | Depósitos de cristal |
|---------------------|----------------------|
| Agua+AUC            | +++++                |
| EDTA tetrasodio+AUC | ++                   |
| Di-amonio+AUC       | +                    |
| Di-potasio+AUC      | +/-                  |

Todas las referencias citadas aquí, que incluyen referencias de patente y no publicaciones de patente se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Mientras en la anterior especificación esta invención se ha descrito con relación a ciertas modalidades específicas y muchos detalles se han establecido para propósito de ilustración, será evidente para aquellos expertos en la técnica que la invención susceptible de modalidades adicionales y que ciertos detalles escritos aquí pueden variar considerablemente sin apartarse de los principios básicos de la invención.

000142 162

REIVINDICACIONES

## Reivindicamos:

1. Una solución antiséptica que comprende al menos una sal de ácido tetracético diaminoetileno (EDTA) en una concentración de al menos 0.01% p/v y al menos un solvente, en donde la solución tiene un pH de al menos 8.0 y posee actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias.
2. La solución de la reivindicación 1, en donde la solución tiene un pH entre 8.5 y 12.5.
3. La solución de la reivindicación 2, en donde la solución tiene un pH entre 9.5 y 11.5.
4. La solución de la reivindicación 3, en donde la solución tiene un pH entre 10.5 y 11.5.
5. La solución de la reivindicación 1, en donde al menos una sal de EDTA se selecciona a partir del grupo que consiste de EDTA disodio; EDTA trisodio; EDTA tetrasodio; EDTA amonio; EDTA diamonio; EDTA potasio; EDTA dipotasio; EDTA disodio cúprico; EDTA disodio magnesio; EDTA sodio férrico y combinaciones de estos.

163

.. 000163

6. La solución de la reivindicación 5, en donde al menos 1 sal de EDTA se selecciona a partir del grupo que consiste de: EDTA trisodio; EDTA tetrasodio; y combinaciones de estos.

7. La solución de reivindicación 1, en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.2% p/v a 10% p/v.

8. La solución de la reivindicación 7, en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.2% a 6.0% p/v.

9. La solución de la reivindicación 8, en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.2% a 4.0% p/v.

10. La solución de la reivindicación 1, en donde el solvente se selecciona a partir del grupo que consiste de: agua; solución salina; alcoholes; y combinaciones de estos.

11. La solución de la reivindicación 10, en donde el solvente es una combinación de agua y etanol.

000164

164

12. La solución de la reivindicación 11 en donde la solución comprende etanol en una cantidad de 0.1% a 10% v/v.

13. La solución de la reivindicación 1, en donde la solución posee actividad bactericida contra bacterias en formas planctónicas y en formas deshiles.

14. La solución de la reivindicación 1, en donde la solución posee adicionalmente al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste de:

- (a) Actividad anticoagulante;
- (b) Actividad fungicida contra patógenos fungosos;
- (c) Actividad inhibitoria contra infecciones de protozcos;
- (d) Actividad inhibitoria contra infecciones de amebas;
- (e) Seguridad y biocompatibilidad, al menos en volúmenes modestos, en contacto con una paciente;
- (d) Seguridad y biocompatibilidad, al menos en volúmenes modestos, en el flujo sanguíneo de los pacientes;
- (e) Seguridad y compatibilidad con objetos industriales y superficies.

14. La solución de la reivindicación 1, en donde la solución es estéril y libre de pirógenos.

15. Una forma seca de la solución antiséptica de la reivindicación 1 que, luego de reconstitución con un solvente forma la solución de la reivindicación 1.

16. Una formulación de la solución de la reivindicación 1 que es adecuada para aplicación tópica a las superficies y objetos.

17. Una formulación de liberación en el tiempo de la solución de la reivindicación 1 que suministra actividad antiséptica durante un periodo de tiempo extendido.

18. Una solución antiséptica que comprende un solvente y al menos una sal EDTA de sodio en una concentración de entre 0.01% y 15% p/v, en donde la solución tiene pH de al menos 9.0 y posee actividad bactericida contra un amplio espectro de bacterias.

19. La solución de la reivindicación 15, en donde el solvente se selecciona del conjunto que consiste de: agua; solución salina; alcoholes; y combinaciones de estos.

20. Una solución antiséptica que consiste esencialmente de al menos una sal de ácido tetraacético diamina etileno (EDTA) en una concentración de al menos 0.01% p/v y al menos un solvente, en donde la solución tiene un pH de al menos 8.0 y posee actividad bactericida contra una amplio espectro de bacterias.

21. La solución de la reivindicación 20, en donde la solución tiene un pH entre 8.5 y 12.5.

22. La solución de la reivindicación 20, en donde la solución tiene un pH entre 9.5 y 11.5.

23. La solución de la reivindicación 20, en donde la solución tiene un pH entre 10.5 y 11.5.

24. La solución de la reivindicación 20, en donde al menos una sal de EDTA se selecciona del grupo que consiste de: EDTA disodio; EDTA trisodio; EDTA tetrasodio; EDTA amonio; EDTA diamonio; EDTA potasio; EDTA dipotasio; EDTA disodio cúprico; EDTA disodio magnesio; EDTA sodio férrico; y combinaciones de estos.

25. La solución de la reivindicación 21, en donde al menos una sal de EDTA se selecciona a partir del

grupo que consiste de: EDTA trisodio; EDTA tetrasodio; y combinaciones de estos.

26. La solución de la reivindicación 20, en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.02% p/v a 10.0% p/v.

27. La solución de la reivindicación 26 en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.02% a 6.0% p/v.

28. La solución de la reivindicación 27, en donde al menos una sal de EDTA está presente en una concentración de 0.02% a 4.0% p/v.

29. La solución de la reivindicación 20, en donde el solvente se selecciona a partir del grupo que consiste de: agua; solución salina; alcoholes; y combinaciones de estos.

30. La solución de la reivindicación 29, en donde el solvente es una combinación de agua y etanol.

31. La solución de la reivindicación 29, en donde la solución comprende etanol en una cantidad de 0.1% a 10% v/v.



000163

32. La solución de la reivindicación 20, en donde la solución posee actividad bactericida contra bacterias en formas planctónicas y en formas deshiles.
33. El método para inhibir el crecimiento y proliferación de una población de al menos un microorganismos indeseado sobre una superficie o dentro de un objeto, que comprende poner en contacto la superficie o el objeto con una solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1-31.
34. El método de la reivindicación 33, en donde el microorganismo indeseado se selecciona de los grupos que consisten de poblaciones microbianas; patógenos fungosos; poblaciones de protozoos; y poblaciones de anebas.
35. El método de la reivindicación 34, en donde el microorganismo indeseado es *Acanthamoeba*.
36. El método de la reivindicación 33, en donde la superficie u objeto se selecciona a partir del grupo que consiste de: catéteres; tubos y conductos médicos; dispositivos intravasculares; dispositivos médicos implantados; instrumentos médicos y veterinarios;

lentes de contacto; implantes ópticos; dispositivos dentales, ortodónticos y periodónticos; instalaciones para almacenamiento, distribución y tratamiento de agua; equipo industrial; y equipo para preparación y procesamiento de alimentos.

37. Un método para inhibir el crecimiento y proliferación de una biopelícula, que comprende poner en contacto la biopelícula con una solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32.

38. un recubrimiento para uso en la curación de heridas, en donde el recubrimiento se impregna con una solución de una cualquiera de las reivindicaciones 1-32.

000170

**COMPOSICIONES ANTISÉPTICAS, MÉTODOS Y SISTEMAS****Resumen:**

Las composiciones antisépticas comprender por lo menos una sal de EDTA se describen aquí. Estas composiciones tienen un espectro antimicrobial y actividad antifúngica junto con propiedades anticoagulantes. Las composiciones antisépticas también han demostrado una actividad en la penetración y rompimiento de seta microbiano, o biopelículas. Estos son seguros para humanos usos médicos, y pueden ser usados para prevenir la infección, o para reducir la proliferación de y/o eliminar infecciones existentes o establecidas.

FIGURA 1A

| ID<br>Organismo        | EDTA dipotasio |     | EDTA diamonio |     | EDTA disodio |      | EDTA trisodio |      | EDTA tetrasodio |      |
|------------------------|----------------|-----|---------------|-----|--------------|------|---------------|------|-----------------|------|
|                        | MIC            | MBC | MIC           | MBC | MIC          | MBC  | MIC           | MBC  | MIC             | MBC  |
| R24 Staph. epidermidis | <0.5           | 8   | <0.5          | 4   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| 31 Staph. epidermidis  | <0.5           | 8   | <0.5          | 8   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| 381 Staph. xylosum     | <0.5           | 6   | <0.5          | 4   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | 20   |
| 300 Staph. epiderm.    | <0.5           | 10  | <0.5          | 8   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | 10   |
| 146 Staph. lentus      | <0.5           | 10  | <0.5          | 10  | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| 824 Staph. epiderm.    | <0.5           | 8   | <0.5          | 10  | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| 818 Staph. aureus      | <0.5           | 8   | <0.5          | 10  | <0.5         | 1    | <0.5          | 1.5  | <0.5            | 1    |
| 72 S. aureus           | 1              | 6   | 1             | 6   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| R17 S. aureus          | 1              | 8   | 1             | 10  | <0.5         | 10   | <0.5          | <0.5 | <0.5            | 8    |
| R13 S. aureus          | 1              | 6   | 1             | 15  | <0.5         | 10   | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| R30 S. aureus          | 1              | 8   | 1             | 15  | <0.5         | 10   | <0.5          | <0.5 | —               | —    |
| 8 S. aureus            | 1              | 8   | 1             | 10  | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | —               | —    |
| R64 MRSA               | 1              | 6   | 1             | 8   | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |

FIGURA 1B

| ID<br>Organismo                            | EDTA dipotasio |     | EDTA diamonio |     | EDTA disodio |      | EDTA trisodio |      | EDTA tetrasodio |      |
|--------------------------------------------|----------------|-----|---------------|-----|--------------|------|---------------|------|-----------------|------|
|                                            | MIC            | MBC | MIC           | MBC | MIC          | MBC  | MIC           | MBC  | MIC             | MBC  |
| R51 MRSA                                   | 1              | 10  | 1             | 6   | <0.5         | 1    | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| R92 MRSA                                   | 1              | 8   | 1             | >15 | <0.5         | 10   | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| S93 MRSA                                   | 1              | 8   | 1             | 10  | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| J67 MRSA                                   | 1              | 8   | 1             | 10  | <0.5         | 10   | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| RE VRE                                     | <0.5           | 8   | <0.5          | 15  | <0.5         | 100  | <0.5          | 20   | <0.5            | 20   |
| Woods VRE                                  | 1              | 8   | 1             | >15 | <0.5         | 100  | <0.5          | 2    | <0.5            | 1    |
| S77 <i>Bacterovorus</i><br><i>Faecium</i>  | <0.5           | 8   | <0.5          | 15  | <0.5         | 100  | <0.5          | 20   | <0.5            | 6    |
| S76 <i>Bacterovorus</i><br><i>Faecalis</i> | 1              | 15  | 1             | 15  | <0.5         | 100  | <0.5          | 1.5  | <0.5            | 40   |
| 66 <i>Klebsiella</i><br><i>pneumoniae</i>  | 1.5            | 15  | 4             | >10 | 1            | 60   | 20            | 40   | 6               | 6    |
| R51 <i>Klebsiella</i><br><i>pneumoniae</i> | 1              | 15  | 1.5           | >10 | —            | —    | —             | —    | —               | —    |
| 128 <i>Klebsiella</i><br><i>oxytoca</i>    | 1              | 15  | 1             | >10 | 1            | 90   | 4             | 20   | 4               | 6    |
| J7 <i>Klebsiella</i><br><i>anthropylus</i> | 1              | >15 | 1             | >10 | 1            | 60   | 20            | 70   | 4               | 8    |
| 250 <i>E. coli</i>                         | 1              | >15 | 1             | >10 | 1.5          | 80   | 10            | 20   | 1.5             | 1.5  |
| IMC <i>E. coli</i>                         | 1              | 15  | 1.5           | >10 | —            | —    | —             | —    | —               | —    |

FIGURA 1C

| ID<br>Organismo                | EDTA dipotasio |       | EDTA diamonio |      | EDTA disodio |      | EDTA trisodio |      | EDTA tetrasodio |      |
|--------------------------------|----------------|-------|---------------|------|--------------|------|---------------|------|-----------------|------|
|                                | MIC            | MBC   | MIC           | MBC  | MIC          | MBC  | MIC           | MBC  | MIC             | MBC  |
| 137 E. coli                    | 1              | 15    | 4             | >10  | 4            | 60   | 4             | 10   | 2               | 2    |
| 292 Ent. cloacae               | 4              | 15    | 4             | >10  | 4            | >100 | 20            | 20   | 6               | 15   |
| 190 Ent. cloacae               | 4              | >15   | 4             | >10  | 4            | 100  | 20            | 20   | 6               | 15   |
| 172 Ent. cloacae               | 6              | >15   | <0.5          | >10  | 6            | >100 | 20            | 20   | 6               | 10   |
| R4 Sten.<br>mitisphilia        | <0.5           | 10    | 1             | >10  | ---          | ---  | ---           | ---  | ---             | ---  |
| B/C Pseudomonas<br>aeruginosa  | 1              | >15   | 1             | >10  | ---          | ---  | ---           | ---  | ---             | ---  |
| J20 Pseudomonas<br>aeruginosa  | 1              | >15   | 1             | >10  | <0.5         | 50   | 4             | 20   | 2               | 4    |
| J26 Pseudomonas<br>sp.         | 1              | 15    | <0.5          | >10  | <0.5         | 25   | 4             | 60   | 8               | 4    |
| R75 Coryne.<br>smycolatum      | <0.5           | <0.5  | <0.5          | 1    | NG           | NG   | NG            | NG   | <0.5            | 20   |
| R23 Coryne.<br>strain/amy      | <0.5           | <0.5  | <0.5          | 1    | NG           | NG   | NG            | NG   | <0.5            | <0.5 |
| 177 Acinetobacter<br>baumannii | <0.5           | <0.5  | <0.5          | <0.5 | <0.5         | <0.5 | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |
| 144 Acinetobacter<br>baumannii | <0.5           | 60-70 | <0.5          | >10  | <0.5         | 1    | <0.5          | <0.5 | <0.5            | <0.5 |

FIGURA 1D

| ID Organismo                 | EDTA dipotasio |     | EDTA diamonio |     | EDTA disodio |     | EDTA trisodio |     | EDTA tetrasodio |     |
|------------------------------|----------------|-----|---------------|-----|--------------|-----|---------------|-----|-----------------|-----|
|                              | MIC            | MBC | MIC           | MBC | MIC          | MBC | MIC           | MBC | MIC             | MBC |
| R16 <i>Proteus mirabilis</i> | <0.5           | >15 | <0.5          | >10 | <0.5         | 50  | <0.5          | 40  | <0.5            | 15  |
| R81 <i>Proteus vulgaris</i>  | 1              | >15 | <0.5          | >10 | <0.5         | 15  | <0.5          | 40  | <0.5            | 8   |
| R26 <i>Proteus mirabilis</i> | <0.5           | 15  | <0.5          | >10 | <0.5         | 50  | <0.5          | 60  | 1               | 15  |

FIGURA 2

| ID Organismo                | MIC Tetrasodio | MBC Tetrasodio | MIC Dipotasio | MBC Dipotasio | MIC Diamonio | MBC Diamonio |
|-----------------------------|----------------|----------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| J96 Candida albicans        | 0.5            | 15             | 0.5           | >100          | 0.5          | >100         |
| J92 Candida albicans        | 0.5            | 15             | 0.5           | >100          | 0.5          | >100         |
| Myc. Candida albicans       | 0.5            | 0.5            | 0.5           | >100          | 0.5          | >100         |
| J98 Candida Incitansae      | 0.5            | 6              | 0.5           | >100          | 0.5          | >100         |
| Myc. Candida tropicalis     | 0.5            | 10             | 1             | >100          | .1           | 100          |
| Myc. Candida Guilliermondii | 0.5            | 0.5            | 0.5           | >100          | 0.5          | >100         |
| Myc. Candida glabrata       | 0.5            | 2              | 0.5           | >100          | 0.5          | 90           |
| Myc. Candida parapsilosis   | 0.5            | 8              | 0.5           | >100          | 0.5          | 100          |
| J96 Candida glabrata        | 0.5            | 8              | 0             | 100           | 0.5          | >100         |



FIGURA 3A

| ID<br>Organismo            | EDTA disodio<br>cúprico |      | EDTA disodio<br>magnesio |     | EDTA sodio<br>Férrico |     |
|----------------------------|-------------------------|------|--------------------------|-----|-----------------------|-----|
|                            | MIC                     | MBC  | MIC                      | MBC | MIC                   | MBC |
| S24 Staph. epidermidis     | <0.5                    | <0.5 | 6                        | 30  | >20                   | >30 |
| 31 Staph. epidermidis      | <0.5                    | <0.5 | 6                        | 30  | >20                   | >30 |
| 301 Staph. xylosus         | <0.5                    | <0.5 | 2                        | >30 | >20                   | >30 |
| 300 Staph. capitis         | <0.5                    | <0.5 | 1.5                      | >30 | >20                   | >30 |
| J46 Staph. lentus          | <0.5                    | <0.5 | 6                        | >30 | >20                   | >30 |
| S24 Staph. capitis         | <0.5                    | <0.5 | 6                        | >30 | >20                   | >30 |
| R8 Staph. simulans         | <0.5                    | <0.5 | 1.5                      | >30 | >20                   | >30 |
| 72 S.aureus                | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R57 S.aureus               | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R13 S.aureus               | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R30 S.aureus               | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| 8 S.aureus                 | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R64 MRSA                   | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R51 MRSA                   | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R92 MRSA                   | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| S93 MRSA                   | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| J67 MRSA                   | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| R8 VRE                     | <0.5                    | <0.5 | 25                       | >30 | 2                     | >30 |
| Woods VRE                  | >30                     | >30  | >30                      | >30 | >20                   | >30 |
| S77 Entero-coccus faecium  | <0.5                    | <0.5 | 1.5                      | >30 | 4                     | >30 |
| S76 Entero-coccus faecalis | <0.5                    | <0.5 | >30                      | >30 | 4                     | >30 |
| 68 Klebsiella pneumoniae   | >30                     | >30  | >30                      | >30 | >15                   | >15 |
| R51 Klebsiella pneumoniae  | >30                     | >30  | >30                      | >30 | 15                    | >15 |

FIGURA 3B

| ID<br>Organismo             | EDTA dihidrato<br>cúprico |      | EDTA disodio<br>magnésio |      | EDTA sodio<br>Férrico |     |
|-----------------------------|---------------------------|------|--------------------------|------|-----------------------|-----|
|                             | MIC                       | MBC  | MIC                      | MBC  | MIC                   | MBC |
| 128 Klebsiella oxytoca      | >30                       | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| 17 Klebsiella ornitholytica | >30                       | >30  | >30                      | >30  | 15                    | >15 |
| 250 E. coli                 | >30                       | >30  | >30                      | >30  | 15                    | >15 |
| B/C E. coli                 | 6                         | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| 137 E. coli                 | >30                       | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| 292 Ent. cloacae            | >30                       | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| 190 Ent. cloacae            | >30                       | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| 122 Ent. cloacae            | 6                         | 8    | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| R4 Steno. maltophilia       | 6                         | >30  | >30                      | >30  | 10                    | >15 |
| B/C Pseudomonas aeruginosa  | >30                       | >30  | >30                      | >30  | 15                    | >15 |
| 120 Pseudomonas aeruginosa  | >30                       | >30  | >30                      | >30  | 15                    | >15 |
| 126 Pseudomonas sp.         | >30                       | >30  | >30                      | >30  | 15                    | >15 |
| R75 Coryna. amycolatum      | <0.5                      | <0.5 | <0.5                     | 4    | 10                    | 10  |
| R23 Coryna. striat/amy      | <0.5                      | <0.5 | <0.5                     | 4    | 10                    | 10  |
| 177 Acinetobacter baumannii | <0.5                      | <0.5 | <0.5                     | <0.5 | 6                     | 10  |
| 144 Acinetobacter baumannii | 6                         | 15   | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| R16 Proteus mirabilis       | 6                         | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |
| R81 Proteus vulgaris        | >30                       | >30  | >30                      | 30   | >15                   | >15 |
| R26 Proteus mirabilis       | 6                         | >30  | >30                      | >30  | >15                   | >15 |

FIGURA 4A

| ID Organismo           | EDTA Tetrasodio + Disodio Cúprico |     | EDTA Dipotasio + Disodio Cúprico |     | EDTA Diamonio + Disodio Cúprico |     |
|------------------------|-----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|---------------------------------|-----|
|                        | MIC                               | MBC | MIC                              | MBC | MIC                             | MBC |
| S24 Staph. epidermidis | 0.25                              | 2   | 0.25                             | 15  | 0.5                             | 20  |
| 31 Staph. epidermidis  | 0.25                              | 8   | 0.25                             | 20  | 0.5                             | 20  |
| 301 Staph. xyloesus    | <0.1                              | >20 | <0.1                             | >20 | <0.1                            | 20  |
| 300 Staph. capitis     | <0.1                              | >20 | <0.1                             | 20  | <0.1                            | 20  |
| J46 Staph. lentus      | 0.25                              | 6   | 0.25                             | 15  | 0.5                             | 20  |
| S24 Staph. capitis     | 0.25                              | 8   | 0.25                             | 20  | 0.5                             | 20  |
| R8 Staph. simulans     | 0.25                              | >20 | 1                                | >20 | 1                               | 20  |
| 72 S. aureus           | <0.1                              | >20 | <0.1                             | >20 | <0.1                            | 20  |
| R57 S. aureus          | <0.1                              | >20 | <0.1                             | 20  | <0.1                            | 20  |
| R13 S. aureus          | <0.1                              | >20 | <0.1                             | 20  | <0.1                            | >20 |
| R30 S. aureus          | <0.1                              | 15  | <0.1                             | 20  | <0.1                            | >20 |
| 8 S. aureus            | <0.1                              | >20 | <0.1                             | >20 | <0.1                            | 20  |
| R64 MRSA               | <0.1                              | >20 | <0.1                             | >20 | <0.1                            | >20 |
| R51 MRSA               | <0.1                              | >20 | <0.1                             | 20  | <0.1                            | >20 |

FIGURA 4B

| ID<br>Organismo             | EDTA Tetrasodio<br>+ Disodio Cúprico |     | EDTA Dipotasio<br>+ Disodio Cúprico |     | EDTA Diamonio<br>+ Disodio Cúprico |     |
|-----------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
|                             | MIC                                  | MBC | MIC                                 | MBC | MIC                                | MBC |
| R92 MRSA                    | <0.1                                 | >20 | <0.1                                | >20 | <0.1                               | >20 |
| S93 MRSA                    | <0.1                                 | 15  | <0.1                                | 20  | <0.1                               | 20  |
| J67 MRSA                    | <0.1                                 | >20 | <0.1                                | 20  | <0.1                               | 20  |
| R8 VRE                      | 0.25                                 | 20  | 0.25                                | 20  | 0.5                                | >20 |
| Woods VRE                   | 0.25                                 | >20 | <0.1                                | 20  | <0.1                               | >20 |
| S77 Enterococcus faecium    | 0.5                                  | >20 | 0.5                                 | >20 | 1                                  | >20 |
| S76 Enterococcus faecalis   | 0.25                                 | >20 | <0.1                                | >20 | <0.1                               | >20 |
| 68 Klebsiella pneumoniae    | 10                                   | >20 | 6                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| R51 Klebsiella pneumoniae   | 4                                    | >20 | 4                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 128 Klebsiella oxytoca      | 4                                    | >20 | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| J7 Klebsiella ornitholytica | 6                                    | >20 | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 250 E. coli                 | 6                                    | 15  | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| B/C E. coli                 | 6                                    | 1   | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 137 E. coli                 | 6                                    | 4   | 2                                   | >20 | 2                                  | >20 |
| 292 Ent. cloacae            | 20                                   | >20 | 8                                   | >20 | 8                                  | >20 |

FIGURA 4C

| ID<br>Organismo                    | EDTA Tetrasodio<br>+ Disodio Cúprico |      | EDTA Dipotasio<br>+ Disodio Cúprico |      | EDTA Diamonio<br>+ Disodio Cúprico |      |
|------------------------------------|--------------------------------------|------|-------------------------------------|------|------------------------------------|------|
|                                    | MIC                                  | MBC  | MIC                                 | MBC  | MIC                                | MBC  |
| 190 <i>Ent. cloacae</i>            | 20                                   | >20  | 8                                   | >20  | 6                                  | >20  |
| 122 <i>Ent. cloacae</i>            | 20                                   | >20  | 8                                   | >20  | 6                                  | >20  |
| R4 <i>Steno. maltophilia</i>       | 6                                    | 10   | 1                                   | >20  | 1                                  | >20  |
| B/C <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 6                                    | 10   | 2                                   | >20  | 2                                  | >20  |
| 120 <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 6                                    | 15   | 2                                   | >20  | 2                                  | >20  |
| 126 <i>Pseudo-monas</i> sp.        | 6                                    | >20  | 2                                   | >20  | 2                                  | >20  |
| R75 <i>Coryne. amycolatum</i>      | <0.1                                 | <0.1 | 0.25                                | 0.25 | 0.25                               | 0.25 |
| R23 <i>Coryne. stralkamy</i>       | 6                                    | 10   | 1                                   | >20  | 1                                  | >20  |
| 177 <i>Acinetobacter baumannii</i> | 6                                    | 0.5  | 0.5                                 | 0.25 | 0.25                               | <0.1 |
| 144 <i>A. baumannii</i>            | 6                                    | >20  | 2                                   | >20  | 1                                  | >20  |
| R16 <i>Proteus mirabilis</i>       | 6                                    | >20  | 2                                   | >20  | 1                                  | >20  |
| R81 <i>Proteus vulgaris</i>        | 6                                    | >20  | 2                                   | >20  | 2                                  | >20  |
| R26 <i>Proteus mirabilis</i>       | 6                                    | >20  | 2                                   | >20  | 1                                  | >20  |

FIGURA 5A

| ID Organismo           | EDTA Diamonio + Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio + Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio + Diamonio |     |
|------------------------|----------------------------|-----|-----------------------------|-----|---------------------------|-----|
|                        | MIC                        | MBC | MIC                         | MBC | MIC                       | MBC |
| S24 Staph. epidermidis | 0.5                        | >20 | 1                           | 20  | 0.5                       | >8  |
| 31 Staph. epidermidis  | 0.5                        | >20 | 1                           | 6   | 0.5                       | >8  |
| 301 Staph. xylosus     | 0.5                        | >20 | 1                           | >20 | 0.5                       | >8  |
| 300 Staph. capitis     | 0.5                        | >20 | 1                           | >20 | 0.5                       | 8   |
| J46 Staph. lentus      | 0.5                        | >20 | 0.5                         | 8   | 0.5                       | >8  |
| S24 Staph. capitis     | 0.5                        | >20 | 0.5                         | 8   | 0.5                       | >8  |
| R8 Staph. simulans     | 0.5                        | >20 | 0.5                         | >20 | 0.5                       | >8  |
| 72 S. aureus           | 1                          | >20 | 0.5                         | 20  | 0.5                       | 8   |
| R57 S. aureus          | 1                          | >20 | 1                           | 20  | 1                         | >8  |
| R13 S. aureus          | 0                          | 0   | 0                           | 0   | 0                         | 0   |
| R30 S. aureus          | 1                          | 4   | 1                           | 4   | 1                         | 8   |
| 8 S. aureus            | 1                          | >20 | 1                           | 20  | 1                         | 8   |
| R64 MRSA               | 1                          | >20 | 1                           | 20  | 1                         | >8  |
| R51 MRSA               | 1                          | >20 | 1                           | 20  | 0.5                       | >8  |

FIGURA 5B

| ID<br>Organismo             | EDTA Diamonio<br>+ Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio<br>+ Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio<br>+ Diamonio |     |
|-----------------------------|-------------------------------|-----|--------------------------------|-----|------------------------------|-----|
|                             | MIC                           | MBC | MIC                            | MBC | MIC                          | MBC |
| R92 MRSA                    | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >8  |
| S93 MRSA                    | 1                             | >20 | 1                              | 20  | 1                            | 8   |
| I67 MRSA                    | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | 8   |
| R8 VRE                      | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >8  |
| Woods VRE                   | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >8  |
| S77 Enterococcus faecium    | 0.5                           | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >8  |
| S76 Enterococcus faecalis   | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >8  |
| 68 Klebsiella pneumoniae    | >20                           | >20 | >20                            | >20 | 10                           | >10 |
| R51 Klebsiella pneumoniae   | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >10 |
| 128 Klebsiella erytroca     | 1                             | >20 | 1                              | >20 | 1                            | >10 |
| J7 Klebsiella ornitholytica | >20                           | >20 | 20                             | >20 | 10                           | >10 |
| 250 E. coli                 | >20                           | >20 | 20                             | >20 | 2                            | >10 |
| H/CX. coli                  | 1                             | 0.5 | 1                              | 1   | 0.5                          | >10 |
| 137 E. coli                 | 4                             | >20 | 20                             | >20 | 1                            | >10 |
| 292 Bnt. clausae            | 8                             | >20 | >20                            | >20 | 4                            | >10 |

FIGURA 5C

| ID Organismo                       | EDTA Diamonio + Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio + Tetrasodio |     | EDTA Dipotasio + Diamonio |     |
|------------------------------------|----------------------------|-----|-----------------------------|-----|---------------------------|-----|
|                                    | MIC                        | MBC | MIC                         | MBC | MIC                       | MBC |
| 190 <i>Ent. cloacae</i>            | >20                        | >20 | >20                         | >20 | 6                         | >10 |
| 122 <i>Ent. cloacae</i>            | >20                        | >20 | >20                         | >20 | 4                         | >10 |
| R4 <i>Steno. maltophilia</i>       | 1                          | >20 | 1                           | >20 | 0.5                       | >10 |
| B/C <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 8                          | >20 | 15                          | 15  | 2                         | >10 |
| J20 <i>Pseudo-monas aeruginosa</i> | 6                          | >20 | 15                          | 20  | 2                         | >10 |
| J25 <i>Pseudo-monas sp.</i>        | 8                          | >20 | 20                          | >20 | 2                         | >10 |
| R75 <i>Coryne. amycolatum</i>      | 0.5                        | 4   | 0.5                         | 1   | 0.5                       | 2   |
| R23 <i>Coryne. strain/amy</i>      | 0.5                        | 0.5 | 0.5                         | 0.5 | 0.5                       | 0.5 |
| 177 <i>Acinetobacter baumannii</i> | 4                          | 8   | 1                           | >20 | 0.5                       | >10 |
| J44 <i>A. baumannii</i>            | >20                        | >20 | >20                         | >20 | 2                         | >10 |
| R16 <i>Proteus mirabilis</i>       | 1                          | >20 | 1                           | >20 | 0.5                       | >10 |
| R81 <i>Proteus vulgaris</i>        | 1                          | >20 | 1                           | >20 | 0.5                       | >10 |
| R26 <i>Proteus mirabilis</i>       | >20                        | >20 | >20                         | >20 | 2                         | >10 |



FIGURA 6

| Organism                    | MBIC EDTA<br>Tetracido (mg/ml, $\mu$ /v) |
|-----------------------------|------------------------------------------|
| 31 Staph. epidermidis       | 20-40                                    |
| 301 Staph. xylosus          | 20-40                                    |
| 300 Staph. epider           | <5                                       |
| 146 Staph. aureus           | <5                                       |
| 23 Staph. glaucus           | 20-40                                    |
| 72 Staph. aureus            | <5                                       |
| 237 Staph. aureus           | <5                                       |
| 8 Staph. aureus             | <5                                       |
| 292 MRSA                    | <5                                       |
| 293 MRSA                    | <5                                       |
| 167 MRSA                    | <5                                       |
| 618 Klebsiella pneumoniae   | <5                                       |
| 77 Klebsiella oxytoca       | <5                                       |
| 292 Enterobacter cloacae    | <5                                       |
| 198 Enterobacter cloacae    | 20                                       |
| 122 Enterobacter cloacae    | 15                                       |
| 24 Streptococcus pyogenes   | <5                                       |
| 128 Pseudomonas aeruginosa  | <10                                      |
| 126 Pseudomonas aeruginosa  | <5                                       |
| 144 Acinetobacter baumannii | 10                                       |
| 116 Proteus mirabilis       | <5                                       |
| 181 Proteus mirabilis       | <5                                       |
| 11 Enterobacter             | <5                                       |
| 708651 S. coli              | <5                                       |
| 250 E. coli                 | <10                                      |
| 7113449 Klebsiella oxytoca  | <5                                       |

FIGURA 7

| ID Catéter | Conc. EDTA (mg/ml) | Conteo de Colonia a 0 horas (cfu/ml) | Conteo de Colonia a 3 horas (cfu/ml) | Conteo de Colonia a 6 horas (cfu/ml) | Conteo de Colonia a 24 horas (cfu/ml) | Organismos Presentes                      |
|------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| G          | 40                 | >100000                              | 120000                               | 6000                                 | 0                                     | Cultivos Gram+ve y Gram-ve Mezclados      |
| H          | 40                 | >100000                              | 80000                                | 0                                    | 0                                     | Cultivos Gram+ve y Gram-ve Mezclados      |
| I          | 40                 | 200000                               | >500000                              | 25000                                | 0                                     | CNS + Copine/Gripes                       |
| J          | 40                 | >500000                              | 180000                               | 0                                    | 0                                     | CNS                                       |
| K          | 40                 | >1000000                             | 600000                               | 500000                               | 180000                                | Streptococcus sp., CNS y Gram-ve bacillas |
| P          | 40                 | >500000                              | 2500000                              | 150000                               | 54500                                 | Pseudomonas sp. + Streptococcus sp.       |
| Q          | 40                 | 205000                               | 650000                               | 1000                                 | 3500                                  | Streptococcus sp.                         |
| R          | 40                 | 5000                                 | 500                                  | 0                                    | 0                                     | MRSA                                      |
| S          | 40                 | >500000                              | 100000                               | 30000                                | 0                                     | CNS                                       |
| T          | 40                 | 137500                               | 1000                                 | 0                                    | 0                                     | MRSA                                      |
| U          | 40                 | >500000                              | 182500                               | 67500                                | 13500                                 | CNS                                       |
| V          | 40                 | 700000                               | 38500                                | 37500                                | 13000                                 | CNS + Grupo D Streptococcus               |
| W          | 40                 | >500000                              | 0                                    | 0                                    | 0                                     | Enterobacter cloacae                      |
| X          | 40                 | >500000                              | 20000                                | 0                                    | 0                                     | CNS Mezclado                              |
| Z          | 40                 | >500000                              | 0                                    | 0                                    | 0                                     | CNS                                       |
| A1         | 40                 | 700000                               | 57000                                | 60000                                | 0                                     | MRSA                                      |
| B1         | 40                 | 24000                                | 0                                    | 0                                    | 0                                     | MRSA                                      |

FIGURA 8

| ID<br>Catéter   | Conc.<br>HDTA<br>(mg/ml) | Conteo de<br>Colonia a<br>0 horas<br>(cfu/mL) | Conteo de<br>Colonia a<br>3 horas<br>(cfu/mL) | Conteo de<br>Colonia a<br>6 horas<br>(cfu/mL) | Conteo de<br>Colonia a<br>24 horas<br>(cfu/mL) | Organismos<br>Presentes                 |
|-----------------|--------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| A               | 100                      | 1000000                                       | 0                                             | 0                                             | 0                                              | CNS                                     |
| B               | 100                      | 1000000                                       | 100                                           | 200                                           | 0                                              | CNS                                     |
| C               | 50                       | 1000000                                       | 0                                             | 0                                             | 0                                              | Coliformes mezclados                    |
| D               | 20                       | >100000                                       | 250000                                        | 100000                                        | 0                                              | Cultivos Gram+ve y<br>Gram-ve Mezclados |
| E               | 30                       | >100000                                       | 400000                                        | 360000                                        | 0                                              | Cultivos Gram+ve y<br>Gram-ve Mezclados |
| F               | 30                       | 300000                                        | 57000                                         | 2000                                          | 0                                              | Cultivos Gram+ve y<br>Gram-ve Mezclados |
| L               | 60                       | 600000                                        | 5000                                          | 4000                                          | 0                                              | Enterococcus sp.                        |
| M               | 60                       | >500000                                       | 300000                                        | 17000                                         | 17000                                          | Proteus sp. CNS                         |
| O               | 50                       | 500000                                        | 30000                                         | 130000                                        | 0                                              | Staphylococcus aureus                   |
| N<br>(arterial) | 50                       | 500000                                        | 10000                                         | 0                                             | 0                                              | CNS                                     |
| N<br>(Venoso)   | 50                       | 300000                                        | 10000<br>(Solo<br>CNS)                        | 60000<br>(Solo<br>CNS)                        | 0                                              | Klebsiella pneumoniae<br>+ CNS          |

Extrato publicación Folio 187

Folio 188 y 189  
tarjetas  
2

• • •

11

{ }

- $$\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$$

{ }

( )

- $$\begin{array}{cc} \{ \} : & \{ \} \\ \{ \} & \{ \} \\ \{ \} & \{ \} \\ \{ \} & \{ \} \end{array}$$

! !



**પેષ્કશિન:**

181  
S<sup>a</sup>

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Bogotá,  
2010

Doctor(a)  
CORREA CRDOÑEZ ALVARO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
TYCO HEALTHCARE GROUP LP.

|            |                            |               |
|------------|----------------------------|---------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 5 122742      |
|            | Solicitud internacional    | US2004/018009 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 04/01/2006    |
|            | Trámite                    | 11            |
|            | Evato                      | 178           |
|            | Actuación                  | 430           |
|            | Oficio No.                 | 2129          |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Debe aclarar la numeración de las reivindicaciones por cuanto aparecen duplicados el número 14. De ser el caso presentar un nuevo capítulo reivindicatorio.
2. La solicitud no contenga la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 3.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

~~ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL~~  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 24 FEB. 2006  
adpal