



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 000**

51 Int. Cl.:
A01N 59/00 (2006.01)
C02F 1/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02715066 .3**
86 Fecha de presentación : **07.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1372397**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Control de *Pseudomonas aeruginosa*.**

30 Prioridad: **27.03.2001 US 819153**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **ALBEMARLE CORPORATION**
451 Florida Street
Baton Rouge, Louisiana 70801-1765, US

72 Inventor/es: **Nalepa, Christopher, J.**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Control de *Pseudomonas aeruginosa*.

5 *Pseudomonas aeruginosa* es una cepa de bacterias que pueden formar una biopelícula sobre las superficies en contacto con agua. Tal como se conoce bien en el arte, las biopelículas son más resistentes a la acción de microbicidas que las bacterias planctónicas, es decir las bacterias que no están pegadas a una superficie. En este contexto, la *Pseudomonas aeruginosa* es un formador de biopelícula especialmente tenaz en el sentido de que es altamente resistente a la remoción química. Adicionalmente, la *Pseudomonas aeruginosa* tiene la habilidad de protegerse a sí misma contra la acción de microbicidas formando capas de baba extracelular de polisacáridos que resisten la penetración de microbicidas cargadas en agua. La tasa a la que tales capas de baba se forman es muy rápida en el caso de la *Pseudomonas aeruginosa*; se pueden formar capas de baba altamente resistentes sobre una superficie limpia en menos de una semana. Adicionalmente, las biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* típicamente albergan patógenos peligrosos y causan daños a las superficies a las cuales se llegan a pegar.

15 WO 01/20996, que fue publicada después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, divulga métodos para desinfectar superficies y para limpiar cuerpos de agua usando una composición biocida líquida concentrada que se forma mezclando juntos (a) cloruro de bromo y (b) y una solución acuosa de sal de metal alcalino de ácido sulfámico que tiene un pH de por lo menos alrededor de 7, en cantidades tales que (i) el contenido activo de bromo de la composición es por lo menos de alrededor de 100 000 ppm (p/p), y (ii) la relación atómica de nitrógeno con el bromo activo en la composición es mayor que 0,93. WO 01/53209, que se publicó después de la fecha de prioridad de la presente patente, enseña que el control microbiológico en sistemas de agua se alcanza con una cantidad de 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoina que es menor que la cantidad de N,N'-bromocloro-5,5-dimetilhidantoina requerida para lograr el mismo grado de control microbiológico. WO 97/34827 divulga un método para preparar una solución acuosa estabilizada de hipobromito de metal alcalino o metal alcalino térreo a partir de una solución acuosa de hipoclorito de metal alcalino o alcalino férreo y una fuente de iones bromuro soluble en agua, seguido por la adición de un sulfamato de metal alcalino a la mezcla. Esta solución acuosa estabilizada de hipobromito de metal alcalino o alcalino térreo tiene propiedades antibacteriales. EP 0913091 enseña una composición sinérgica que comprende una combinación de hipobromito de sodio estabilizado con una mezcla de 5-cloro-2-metil 4-isotiazolin-3-ona y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona. Esta composición se usa para inhibir el crecimiento microbiológico. U.S. 4,297,224 divulga que se puede controlar la biocontaminación en sistemas que recirculan agua suministrando 1-bromo-3-cloro-5,5-dimetilhidantoina al agua a un nivel efectivo para controlar organismos que forman películas biológicas. WO 99/62339 divulga un proceso para producir una formulación biocida líquida concentrada mezclando junto (a) cloruro de bromo o bromo y (b) una solución acuosa de sal de metal alcalino de ácido sulfámico que tiene un pH de por lo menos alrededor de 7, en cantidades tales que (i) el contenido de bromo activo de la solución es de por lo menos alrededor de 100 000 ppm (p/p) y (ii) la relación atómica de nitrógeno con el bromo activo a partir de (a) y (b) es mayor de 1 cuando se usa bromo y es mayor de 0,93 cuando se usa cloruro de bromo. Clark y Smith, *Letters in Applied Microbiology*, 1992, **14**, 10-12, muestran que se puede usar 1-bromo-3-cloro-5,5-dimetilhidantoina contra *Pseudomonas aeruginosa* en un baño de remolino o jacuzzi. En May et al., Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, (Resúmenes de la Asamblea General de la Sociedad Americana para Microbiología) 2000, vol. 100, página 578, se enseña el uso de bromoclorodimetilhidantoina y bromuro de sodio con cloro oxidante contra las biopelículas.

45 Un objeto de la presente invención es suministrar una manera efectiva de controlar *Pseudomonas aeruginosa* incluso después de que haya formado una capa de baba extracelular de polisacárido.

Conforme con esta invención, se ha encontrado que cierto biocida que contiene bromo es efectivo en el control de *Pseudomonas aeruginosa* sobre superficies expuestas al agua incluso después que se haya producido una capa defensiva extracelular de polisacáridos por parte de la especie de bacteria.

50 El microbicida basado en bromo usado conforme a esta invención es por lo menos un producto de bromo activo soluble en agua formado mezclando (a) bromo, cloruro de bromo, una mezcla de cloruro de bromo y bromo o una combinación de bromo y cloro en la cual la cantidad molar de cloro no excede la cantidad molar de bromo, y (b) una fuente soluble en agua de anión sulfamato, en (c) un medio acuoso, el cual se ajusta a un pH de por lo menos 12 y preferiblemente por lo menos 13 ya sea durante o después de la mezcla.

Dichos microbicidas se pueden preparar tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense U.S. No. 6,068,861. Una solución concentrada de cloruro de bromo estabilizada con sulfamato se encuentra disponible en el mercado bajo la enseña comercial Stabrom® 909 biocida (Albemarle Corporation).

60 En la práctica de esta invención el microbicida a base de bromo de arriba se puede aplicar a la biopelícula ya sea adicionando el microbicida al medio acuoso en contacto con la biopelícula o, en el caso de superficies que se puedan retirar del medio acuoso con el cual ellas están normalmente en contacto, poniendo en contacto la biopelícula con una solución acuosa del microbicida. En cualquier caso, la cantidad de microbicida usada es una cantidad efectiva para ser microbicida, la cual variará hasta cierto grado dependiendo de la identidad del microbicida que se usa y la edad de la colonia de la biopelícula. En este contexto, cuanto mayor sea la edad de una colonia de una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa*, más resistente será ésta a la acción del microbicida y así, en general, mayor debe ser el nivel de dosificación del microbicida. Hablando generalmente, las concentraciones en agua efectivas para ser biocidas si son

disueltas en el agua por cualquier método adecuado o si son una aplicación directa desde cualquier solución acuosa deben estar por lo menos en el rango de 2 hasta 200 ppm (p/p) y preferiblemente en el rango de 5 hasta 20 ppm (p/p). Las desviaciones de los rangos precedentes pueden considerarse siempre necesarias o deseables bajo circunstancias particulares disponibles, y tales desviaciones se encuentran dentro del alcance de esta invención. La duración de la exposición al medio acuoso microbiciado usado conforme a esta invención puede ser tan pequeña como unos pocos minutos hasta horas o incluso días, dependiendo de la edad de la biopelícula de colonia de *Pseudomonas aeruginosa*. Esto es, mientras más vieja sea la colonia, más largo debe ser el tiempo de contacto.

La eficacia de esta invención en erradicar (es decir, controlar) la película de *Pseudomonas aeruginosa* de edad suficiente como para haber desarrollado una capa protectora extracelular de baba de polisacárido, fue mostrada mediante una serie de pruebas estandarizadas llevadas a cabo por encargo nuestro en MBEC Biofilm Technologies, Inc., Calgary, Canadá. El procedimiento de prueba desarrollado en la Universidad de Calgary utiliza un dispositivo que permite el crecimiento de 96 biopelículas idénticas en condiciones cuidadosamente controladas. El dispositivo consta de un recipiente de dos partes que comprende una lámina superior que contiene 96 clavijas que lo sellan contra una lámina de fondo. La lámina de fondo puede constar o bien de una artesa (para el crecimiento de biopelícula) o una lámina estándar de 96 pozos (para la demanda de biocida). Las biopelículas se desarrollan en las 96 clavijas. El dispositivo se ha usado como un método general para evaluar la eficacia de antibióticos y biocidas de las biopelículas. Ver en conexión con esto a H. Ceri, *et al.*, "La prueba MBEC: Un Nuevo ensayo *in Vitro* que permite tamizaje rápido de la sensibilidad antibiótica de la biopelícula" Actas de la ASM, 1998, 89, 525; Ceri, *et al.*, "Prueba de susceptibilidad antifúngica y biocida de las biopelículas de Candida usando el dispositivo MBEC", Actas de la conferencia interciencia sobre agentes microbianos y quimioterapia, 1998, 38, 495; y H. Ceri, *et al.*, "El dispositivo de Biopelícula de Calgary: Una nueva tecnología para la rápida determinación de susceptibilidad antibiótica de biopelículas bacteriales", Journal de Microbiología Clínica, 1999, 37, 1771-1776.

Se evaluaron seis sistemas biocidas usando el procedimiento de prueba de arriba y el quipo de prueba. Cinco de estos sistemas eran biocidas oxidantes, a saber: cloro (de NaOCl), bromo (de NaOCl + NaBr), bromo y cloro (de BCDMH), bromo (de cloruro de bromo estabilizado con sulfamato), y cloro (de ácido tricloroisocianúrico), todos expresados como bromo (Br₂) en mg/L, para poner todos los resultados de las pruebas sobre una misma base. El sexto biocida fue glutaraldehído, un biocida no oxidante.

Estos sistemas biocidas se usaron para desafiar biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). Esto es una bacteria gram (-) que se conoce por desarrollar rápidamente una capa extracelular de baba de polisacárido, y se encuentra en sistemas de agua industriales y de recreo. Ver en conexión con esto a J.W. Costerton y H. Anwar, "Pseudomonas aeruginosa: El microbio y el patógeno", en Infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* y Tratamiento, A.L. Baltch y R.P. Smith editores, Marcel Dekker publishers, New York, 1994.

En la tabla, los resultados de MBEC (por sus siglas en español de concentración mínima de erradicación de biopelícula) presentados son para un tiempo de contacto de biocida de una hora usado en la prueba. La colonia de *Pseudomonas aeruginosa* se dejó crecer en contacto con una solución nutritiva por siete días. Los valores dados para los biocidas que contienen halógeno se expresan en términos de mg/L de bromo, como Br₂. Los datos sobre el glutaraldehído están en términos de mg/L como ingrediente activo. Los datos indican que el microbiciado a base bromo usado conforme a esta invención fue sorprendentemente más efectivo contra la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* que otros, incluyendo a los microbicidas a base de cloro, así como al biocida de glutaraldehído.

TABLA

Efectividad contra biopelícula de Pseudomonas aeruginosa

Sistema Biocida	MBEC, ppm como Br ₂ , sobre una biopelícula de 7 días	MBEC, promedio
Bromo de BrCl estabilizado	5,5	5
Bromo (de NaOCl + NaBr)	5,10	7.5
Bromo y cloro (de BCDMH)	5,10	7.5
Cloro (de NaOCl)	20, 20	20
Cloro (de ácido Tricloroisocianúrico)	20,20	20
Glutaraldehído	100, > 200	200 (est.)

ES 2 268 000 T3

Los compuestos a los que nos referimos por su nombre químico o fórmula en cualquier parte de este documento, ya sean referidos en singular o en plural, se identifican como ellos existen previamente antes de entrar en contacto con otra sustancia a la cual nos referimos por nombre químico o tipo químico (por ejemplo, otro componente o solvente). No importa qué cambios químicos preliminares, si hay alguno, tienen lugar en la mezcla o solución resultante ya que tales cambios son el resultado natural de juntar sustancias especificadas en las condiciones exigidas conforme a esta divulgación. También, aunque las reivindicaciones puedan referirse a sustancias en tiempo presente (por ejemplo, “comprende” o “es”), la referencia se hace a la sustancia tal como en el momento justo antes de ser por primera vez contactada, combinada o mezclada con una o más otras sustancias de acuerdo con la presente divulgación.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método de erradicar o por lo menos reducir una película de *Pseudomonas aeruginosa* en una superficie, conteniendo dicha biopelícula polisacárido extracelular; dicho método comprende poner en contacto dicha biopelícula con un medio acuoso o agua a la cual se ha introducido una cantidad efectiva para ser microbicida de por lo menos un producto de bromo activo soluble en agua formado mezclando (a) bromo, cloruro de bromo, una mezcla de cloruro de bromo y bromo o una combinación de bromo y cloro en la cual la cantidad molar de cloro no excede la cantidad molar de bromo, y (b) una fuente de anión sulfamato soluble en agua, en (c) un medio acuoso, el cual se ajusta a un pH de por lo menos 12 ya sea durante o después de esa mezcla, dicho contacto siendo para uno o más períodos lo suficientemente largos para erradicar o por lo menos reducir dicha biopelícula y donde dicho contacto entre dicha biopelícula y dicho medio acuoso bactericida depende de la edad de la colonia de la película de *Pseudomonas aeruginosa* y cuanto más vieja sea la colonia más largo es el tiempo de contacto.

2. Un método de la reivindicación 1 donde dicha biopelícula comprende por lo menos un organismo adicional patagénico.

3. Un método de las reivindicaciones 1 ó 2 donde la substancia (a) usada en tal mezcla es cloruro de bromo.

4. Un método de erradicar o por lo menos reducir la película de *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie, conteniendo dicha biopelícula un polisacárido extracelular, dicho método comprende adicionar al medio acuoso en contacto con dicha biopelícula una carga efectiva para ser microbicida de por lo menos un producto de bromo activo soluble en agua formado mezclando (a) bromo, cloruro de bromo, una mezcla de cloruro de bromo y bromo o una combinación de bromo y cloro en la que la cantidad molar de cloro no excede la cantidad molar de bromo, y (b) una fuente de anión sulfamato soluble en agua, en (c) un medio acuoso, el cual se ajusta a un pH de por lo menos 12 bien durante o después de esa mezcla, siendo dicho contacto por uno o más períodos lo bastante largo para erradicar o por lo menos reducir dicha biopelícula y donde dicho contacto entre dicha biopelícula y dicho medio acuoso microbicida depende de la edad de la colonia de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* y cuanto más vieja sea la colonia, más largo es el tiempo de contacto.

5. Un método de la reivindicación 4 donde dicha biopelícula comprende por lo menos un organismo patagénico adicional.

6. Un método de las reivindicaciones 4 ó 5 donde la substancia (a) usada en dicha mezcla es cloruro de bromo.

7. Uso de por lo menos un producto de bromo activo soluble en agua formado mezclando (a) bromo, cloruro de bromo, una mezcla de cloruro de bromo y bromo o una combinación de bromo y cloro en la que la cantidad molar de cloro no excede la cantidad molar de bromo y (b) una fuente soluble en agua de anión sulfato en (c) un medio acuoso, el cual se ajusta a un pH de por lo menos 12 bien durante o después de esa mezcla, para erradicar o por lo menos reducir una biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* sobre una superficie que contiene polisacárido extracelular, por medio de poner en contacto dicha biopelícula con un medio acuoso o agua a la cual se ha introducido una cantidad efectiva para ser microbicida de dicho producto de bromo activo soluble en agua, siendo dicha puesta en contacto por uno o más períodos lo bastante largos para erradicar o por lo menos reducir dicha biopelícula y donde dicha puesta en contacto entre dicha biopelícula y dicho medio acuoso microbicida depende de la edad de la colonia de la película de *Pseudomonas aeruginosa* y cuanto más vieja sea la colonia, más largo es el tiempo de contacto.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7 donde la substancia (a) usada en esa mezcla es cloruro de bromo.