

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 798**

21 Número de solicitud: 201731462

51 Int. Cl.:

A61K 33/40 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

A01N 59/00 (2006.01)

A01N 37/36 (2006.01)

A01N 37/44 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

22.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.06.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE JAÉN (100.0%)
Campus Las Lagunillas, S/N
23071 Jaén ES**

72 Inventor/es:

**ABRIOUEL HAYANI, Hikmate;
BENOMAR EL BAKALI, Nabil y
LAVILLA LERMA, Leyre**

54 Título: **Composición desinfectante**

57 Resumen:

Composición desinfectante. La presente invención se encuadra en el sector de la industria alimentaria, en el ámbito sanitario o incluso puede ser usada a nivel doméstico.

Concretamente, la presente invención hace referencia a una composición desinfectante, sin agentes bactericidas tóxicos o contaminantes del medio ambiente, aplicable en cualquier tipo de utensilio o superficie expuesta a la contaminación bacteriana. La composición de la invención también puede ser usada para el tratamiento de pacientes aquejados de infecciones bacterianas y/o de intoxicaciones causadas por metales pesados.

ES 2 717 798 A1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN DESINFECTANTE

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuadra en el sector de la industria alimentaria, en el ámbito sanitario o incluso puede ser usada a nivel doméstico. Concretamente, la presente invención hace referencia a una composición desinfectante, sin agentes bactericidas tóxicos o contaminantes del medio ambiente, aplicable en cualquier tipo de utensilio o superficie expuesta a la contaminación bacteriana. La composición de la invención
10 también puede ser usada para el tratamiento de pacientes aquejados de infecciones bacterianas y/o de pacientes con intoxicaciones causadas por metales pesados.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 Una biopelícula, biofilm, tapiz bacteriano o tapete microbiano es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las células se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza por la excreción de una matriz
20 extracelular adhesiva protectora.

Una biopelícula puede contener aproximadamente un 15% de células y un 85% de matriz extracelular. Esta matriz generalmente está formada de exopolisacáridos, que forman canales por donde circulan agua, enzimas, nutrientes y residuos. Allí las células
25 establecen relaciones y dependencias: viven, cooperan y se comunican a través de señales químicas (percepción de quórum), que regulan la expresión de genes de manera diferente en las distintas partes de la comunidad, como un tejido en un organismo multicelular.

30 Se ha encontrado que más del 60% de las infecciones bacterianas son causadas por biopelículas. Por este motivo, han sido ampliamente estudiadas y se consideran una amenaza clínica contundente ya que son capaces de crecer en catéteres e utensilios médicos y quirúrgicos. En el ámbito sanitario es donde hay más susceptibilidad a infecciones nosocomiales.

35

Además del ámbito clínico o sanitario, es importante tener en cuenta la formación de biopelículas en las superficies y utensilios usados tanto a nivel doméstico como en la industria alimentaria. Particularmente, las biopelículas asociadas a las superficies usadas en la industria alimentaria, suponen un problema de mucha relevancia porque dichas biopelículas pueden llegar a estar en contacto con los alimentos, pudiendo causar enfermedades en el consumidor una vez ingeridos dichos alimentos contaminados. Además, dichas biopelículas pueden causar pérdidas económicas importantes debido a que los alimentos contaminados son desechados para evitar enfermedades asociadas a su consumo.

5
10

Por otro lado, es importante tener en cuenta los problemas asociados con el incremento de la resistencia a antimicrobianos y la resistencia cruzada entre los antibióticos (usados en terapia) y biocidas (usados como desinfectantes). Las fórmulas de los desinfectantes deberían estar basadas en componentes que no creen resistencia a largo plazo, ya que esto dificultaría los tratamientos terapéuticos de las infecciones con patógenos que cada vez son más resistentes e invencibles. Actualmente, el problema de resistencia a antibióticos es uno de los más alarmantes en la Comunidad Europea debido a las muertes causadas por bacterias multirresistentes (aproximadamente 25000 personas por año en Europa) y también por el elevado coste de los tratamientos terapéuticos.

15
20

En el estado de la técnica se ha descrito mucha información relativa a diversas composiciones que permiten eliminar las biopelículas. Sin embargo, las composiciones desinfectantes presentes en el estado de la técnica suelen contener entre sus componentes surfactantes y detergentes que son tóxicos y contaminantes para el medio ambiente.

25

Por lo tanto, se considera indispensable desarrollar una composición capaz de eliminar y/o evitar la formación de biopelículas de microorganismos patógenos de forma eficaz, pero que al mismo tiempo sea una composición que no comprenda agentes bactericidas tóxicos, ni contaminantes para el medio ambiente, y que tampoco comprenda componentes responsables de generar resistencias microbianas. La consecución de esta composición ayudaría a la eliminación eficaz de estos patógenos formadores de biopelículas en las diferentes superficies, interrumpiendo por ejemplo el proceso de diseminación y de transmisión de los agentes infecciosos tanto al personal sanitario como a los pacientes en el ámbito clínico y la contaminación de los alimentos en la industria alimentaria.

30
35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

5 En la presente invención, se investigó el efecto de una composición desinfectante que comprende ácido láctico, peróxido de hidrógeno y EDTA (en adelante composición de la invención) sobre biopelículas compuestas por bacterias Gram-positivas o Gram-negativas, y también sobre biopelículas mixtas formadas por múltiples especies. Estas biopelículas son muy resistentes a los diferentes tratamientos aplicados debido a la baja
10 difusión de los agentes antimicrobianos en la matriz de exopolisacáridos producidos por los mismos microorganismos. La composición de la invención permite evitar el desarrollo de estas biopelículas y también eliminarlas una vez establecidas sobre diferentes superficies. La composición de la invención permite la solubilización de la estructura de la biopelícula y la difusión de los agentes antimicrobianos que actúan sinérgicamente para
15 destruir los microorganismos que componen dicha estructura.

La composición de la invención resulta ser muy eficaz en la eliminación de biopelículas y se caracteriza por no contener agentes bactericidas tóxicos ni contaminantes del medio ambiente. La composición de la invención comprende componentes naturales producidos
20 por las bacterias del ácido láctico, bacterias con el estatus GRAS "Generally Recognized As Safe", con efecto antimicrobiano tales como el peróxido de hidrógeno y el ácido láctico, lo cual lo califica como producto natural con efectos antimicrobianos. Por otro lado, los componentes incluidos en la composición de la invención no tienen una diana específica y por lo tanto no se crean resistencias bacterianas tras sucesivas aplicaciones
25 tal como sí ocurre con los compuestos de amonio cuaternario (cloruro de cetilpiridinio por ejemplo). Es importante indicar que el peróxido de hidrógeno se degrada rápidamente a oxígeno y agua. Así, este componente no supone ningún riesgo para el medio ambiente como contaminante. Por su parte, el ácido láctico como ingrediente natural respetuoso con el medio ambiente se degrada fácilmente en CO₂, CO y CH₄.

30

Particularmente la composición de la invención comprende:

- Dos agentes bactericidas: el ácido láctico y el peróxido de hidrógeno. El ácido láctico es un agente antimicrobiano con un amplio espectro de acción que se usa
35 en la industria alimentaria por su poder acidulante más que antimicrobiano. En

cuanto al peróxido de hidrógeno es un potente agente oxidante y un agente bactericida que permite en primer lugar debilitar la integridad de la biopelícula para así ejercer su acción bactericida sobre los microorganismos embebidos en dicha estructura. Ambos antimicrobianos actúan sinérgicamente para eliminar todos los microorganismos.

- EDTA como agente quelante e inhibidor de las bombas de eflujo. El EDTA actúa con el objetivo de extraer iones de la membrana de las bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas y así facilitar la acción bactericida de los agentes bactericidas empleados. Además actúa como inhibidor de bombas de eflujo de los antimicrobianos (responsables de la resistencia inespecífica) y así incrementa la susceptibilidad de las bacterias a la acción bactericida de los antimicrobianos.

Los tres componentes actúan sinérgicamente a concentraciones precisas para eliminar todos los microorganismos incluso las bacterias esporuladas tales como *Bacillus cereus* cuya eliminación es un reto para la industria alimentaria debido a la resistencia de sus esporas tanto a tratamientos físicos como químicos.

El tiempo de contacto con las superficies altamente contaminadas (10^7 - 10^8 UCF/ml) debe ser al menos de 2 minutos, preferentemente entre 5-15 minutos, para reducir más del 99% de la población microbiana de la biopelícula. El ácido láctico y el peróxido de hidrógeno se encuentran entre las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias del ácido láctico (BAL). El ácido láctico, como producto de fermentación único o predominante en las BAL, desempeña un papel crucial en la conservación de alimentos, donde se produce hasta en un 8% en el proceso de fermentación. El efecto antimicrobiano del ácido láctico es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano a través de la acción disruptiva en la membrana citoplasmática que conduce a la pérdida de fuerza motriz del protón y a la filtración de iones intracelulares y constituyentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Además, desde el punto de vista de la seguridad, no se considera que el ácido láctico esté asociado a riesgos crónicos para la salud y no represente ningún riesgo para el medio ambiente.

Así, la composición de la invención permite resolver tres importantes problemas asociados con la desinfección de superficies: i) es capaz de eliminar las biopelículas de forma eficaz en tiempos muy cortos de al menos 2 minutos, preferentemente entre 5-15 minutos, ii) no contiene agentes bactericidas tóxicos usados en la mayoría de los agentes

desinfectantes debido a su poder desestabilizante de la integridad de la biopelícula pero que al mismo tiempo están asociados con un alto grado de toxicidad y contaminación del medio ambiente y iii) es capaz de inhibir las bombas de eflujo responsables de la resistencia de las bacterias a agentes antimicrobianos. Al tener solo agentes antimicrobianos con dianas no específicas, no crea resistencia tras repetidas aplicaciones como ocurre por ejemplo con los biocidas de amonio cuaternario que se usan en las diferentes formulaciones tales como cetilpiridinio.

Por lo tanto, la composición de la invención puede ser aplicada para la eliminación de biopelículas comprendidas por los microorganismos patógenos en el sector sanitario, la industria alimentaria e incluso el hogar. En el sector de la industria alimentaria, la composición de la invención se puede utilizar para descontaminar superficies donde se manipulan, se producen o se envasan alimentos. Además, se pueden desinfectar las maquinarias o instrumentos usados en estos ambientes. En este sentido, las empresas de la industria alimentaria, mataderos e incluso áreas de venta de los alimentos pueden tener interés en este tipo de productos especialmente cuando se trata de un producto que carece de toxicidad o peligro para crear resistencias microbianas. En el sector sanitario o clínico, su uso también permite descontaminar superficies e instrumentos para evitar el desarrollo de biopelículas o eliminarlas una vez establecidas. Por lo tanto, se evitaría el contagio y las infecciones nosocomiales que se pueden originar en este ambiente. A nivel doméstico, es importante destacar que la composición de la invención ofrece un alto poder desinfectante siendo un producto natural, lo que hace que carezca de toxicidad. La composición de la invención también puede ser usada para el tratamiento de pacientes aquejados de infecciones bacterianas y/o de intoxicaciones causadas por metales pesados.

Por lo tanto, el primer aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprende peróxido de hidrógeno, ácido láctico y EDTA, caracterizada por no comprender agentes bactericidas tóxicos. En un aspecto preferido, la composición de la invención se caracteriza por no comprender fenoles, metales pesados, aldehídos y detergentes. En un aspecto preferido, la composición de la invención se caracteriza por no comprender: ácido mandélico, ácido peracético, SDS, cloruro de cetilpiridinio, Sodio Cocoyl Sarcosinato, Lauril sarcosinato de sodio, Sodio dodecil difenil éter disulfonato. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende: al menos 3-6% de peróxido de hidrógeno, al menos 2.2-4.4% de ácido láctico y al menos 12.5-25 mM de

EDTA. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende: 6% de peróxido de hidrógeno, 4.25% de ácido láctico y 25 mM de EDTA.

5 El segundo aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprende agentes bactericidas que consisten exclusivamente en peróxido de hidrógeno y ácido láctico, y un agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo por ejemplo el EDTA. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende dos agentes bactericidas que consisten en al menos 3-6% de peróxido de hidrógeno y al menos 2.2-4.4% de ácido láctico y como agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo al menos
10 12.5-25 mM de EDTA. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende dos agentes bactericidas que consisten en 6% de peróxido de hidrógeno y 4.25% de ácido láctico y como agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo 25 mM de EDTA.

15 El tercer aspecto de la presente invención hace referencia a una composición que comprende al menos dos agentes bactericidas que consisten en peróxido de hidrógeno y ácido láctico y EDTA como agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende al menos dos agentes bactericidas que consisten en al menos 3-6% de peróxido de hidrógeno y al menos 2.2-4.4% de ácido láctico y como agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo al menos
20 12.5-25 mM de EDTA. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende al menos dos agentes bactericidas que consisten en 6% de peróxido de hidrógeno y 4.25% de ácido láctico y como agente quelante inhibidor de la bomba de eflujo 25 mM de EDTA.

25 El cuarto aspecto de la invención hace referencia a un método ex vivo (fuera del cuerpo humano o animal) para la eliminación de biopelículas conformadas por al menos una bacteria, en cualquier utensilio o superficie, que comprende la aplicación de la composición de la invención arriba descrita. En un aspecto preferido, la composición de la
30 invención se aplica a la biopelícula al menos durante 2 minutos, preferentemente entre 5 y 15 minutos. En un aspecto preferido, las bacterias que conforman la biopelícula, que serían eliminadas por la composición de la invención, se seleccionan del grupo que comprende: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y
35 *Salmonella* Enteritidis UJ3449.

El quinto aspecto de la presente invención hace referencia al uso ex vivo de la composición de la invención como desinfectante. En un aspecto preferido, la invención hace referencia al uso de la composición de la invención para la eliminación de biopelículas conformadas por al menos una bacteria. En un aspecto preferido la composición se aplica a la biopelícula al menos durante 2 minutos, preferentemente entre 5 y 15 minutos. En un aspecto preferido las bacterias que conforman la biopelícula son: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449.

El sexto aspecto de la presente invención hace referencia a la composición de la invención para ser usada como medicamento, particularmente en el tratamiento de pacientes aquejados de infecciones bacterianas y/o de intoxicaciones causadas por metales pesados. En un aspecto preferido, la bacteria se selecciona de la lista que comprende: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449. En otro aspecto preferido, el metal pesado es Cadmio.

Es importante destacar que, en un aspecto particularmente preferido, la composición de la invención comprende unas concentraciones o cantidades precisamente establecidas con el objetivo de conseguir un efecto sinérgico entre sus componentes que dé lugar a la consecución de un triple efecto técnico: i) eliminación de la biopelícula en tiempos muy cortos de al menos 2 minutos, preferentemente entre 5-15 minutos, ii) sin generar toxicidad e iii) inhibiendo al mismo tiempo las bombas de eflujo responsables de la resistencia de las bacterias a agentes antimicrobianos. Las concentraciones o cantidades precisamente establecidas para conseguir dicho efecto sinérgico son: al menos 3-6% de peróxido de hidrógeno, al menos 2.2-4.4% de ácido láctico y al menos 12.5-25 mM de EDTA. En un aspecto preferido, la composición de la invención comprende 6% de peróxido de hidrógeno, 4.25% de ácido láctico y 25 mM de EDTA.

A los efectos de la presente invención se definen los siguientes términos:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a lo que sigue a la palabra "que comprende". Por lo tanto, el uso del término "que comprende"

indica que los elementos enumerados son obligatorios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.

- 5 • Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.
- Por "desinfectante" se entiende un producto que permite eliminar, o permite evitar el establecimiento, de microorganismos en general y bacterias en particular. La utilización de un desinfectante permite limitar o, incluso, hacer desaparecer completamente la contaminación causada por los microorganismos.
- 10 • Por "agente bactericida tóxico" se entiende cualquier agente capaz de provocar la muerte de las bacterias pero que al mismo tiempo exhibe una cierta toxicidad para el ser humano y los animales tras la exposición a dicho agente. Ejemplos de agentes bactericidas tóxicos son: fenoles, metales pesados, aldehídos y detergentes, particularmente ácido mandélico, ácido peracético, SDS, cloruro de cetilpiridinio, Sodio Cocoyl Sarcosinato, Lauril sarcosinato de sodio, Sodio dodecil difenil éter disulfonato.
- 15

Descripción de las figuras

20 **Figura 1.** Actividad antibacteriana de la composición de la invención en biopelículas mono y multiespecíficas (el cóctel de seis bacterias: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449) durante 0 min (control), 5 minutos (T5), 10 minutos (T10), 20 minutos (T20) y 30 minutos (T30) a temperatura ambiente según lo determinado por la determinación del recuento viable (Log₁₀ CFU/ml). En el eje Y se ilustra el Log₁₀ CFU/ml y el eje X las muestras.

25

Figura 2. Visualización de la inactivación de la biopelícula multiespecífica utilizando el kit de viabilidad BacLight Live / Dead (Invitrogen) después del tratamiento con la composición de la invención (100% v / v) durante 0 minutos (A, Control), 2 minutos (B), 5 minutos (C) y 10 minutos (D) a temperatura ambiente y resuspensión de la biopelícula en PBS. Todas las imágenes se obtuvieron utilizando microscopio confocal LEICA TCS SP5

30 II (objetivo x63) y zoom de 2,5 (A y D), 1,5 (C) y 1 (B).

Figura 3. Fotos de microscopía confocal de biopelícula del cóctel de bacterias tratadas o no con el compuesto. Izquierda (control, células vivas), centro (tratamiento durante 5 minutos, gran cantidad de células muertas) y derecha (tratamiento durante 10 minutos, totalidad de células muertas).

5

Figura 4. La composición de la invención adicionada a una concentración sub-inhibitoria (1/2 MIC) al cóctel de bacterias en TSB permitió la inhibición de la expresión de genes que codifican para las bombas de eflujo EfrAB (genes *efrA* y *efrB*) y NorE (el gen *norE*). C (Control). T (tratado con 1/2 MIC de la composición de la invención). Eje Y (Expresión relativa normalizada).

10

Descripción detallada de la invención

MATERIAL Y MÉTODOS

15

Ejemplo 1. Cepas y condiciones de crecimiento bacteriano.

En la presente invención se usaron *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449. Las cepas se cultivaron en Tryptone Soya Broth (TSB) (Fluka, Madrid, España) a 37°C durante 24 horas. Los cultivos se mantuvieron en 20% de glicerol a -20°C y -80°C para almacenamiento a corto y largo plazo, respectivamente.

20

Ejemplo 2. Efecto de la composición de la invención sobre el crecimiento de células planctónicas.

25

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC) de la composición de la invención (6% de H₂O₂, 4.25% de ácido láctico y 25 mM de EDTA), se utilizó el método de microdilución en caldo. Durante la noche, los cultivos bacterianos cultivados en caldo TSB a 37°C durante 24 horas se diluyeron 1/10 (v/v) en caldo TSB fresco y se agregaron 20 µl a cada pocillo de las placas de microtitulación de 96 pocillos. Posteriormente, se agregaron 180 µl de caldo TSB suplementado con la composición de la invención a diferentes concentraciones (0.25-50%, v/v). Las placas se incubaron a 37°C en condiciones aerobias durante 24 horas y se evaluó el crecimiento bacteriano por la presencia de turbidez. Los pocillos que exhibieron

30

35

la ausencia de turbidez se sometieron a determinación de recuento de viables (UFC/ml) mediante la siembra de las muestras (10 µl) en placas de agar triptona Soja (TSA). Posteriormente las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La MIC se definió como la concentración más baja de la composición de la invención que inhibe el crecimiento visible y la MBC se definió como la concentración más baja de la composición de la invención que mata las bacterias (99%). Cada experimento fue hecho por triplicado.

Ejemplo 3. Determinación de la actividad anti-biopelícula.

Las propiedades anti-adherencia de la composición de la invención a diferentes cepas bacterianas (*S. aureus* CECT 4468, *L. monocytogenes* CECT 4032, *E. faecalis* S-47, *B. cereus* CECT 5148, *E. coli* CCUG 47553 y *S. Enteritidis* UJ3449) y el cóctel de todas las cepas se ensayaron en placas de microtitulación. Durante la noche, los cultivos bacterianos cultivados en caldo TSB a 37°C durante 24 horas se diluyeron 1/10 (v/v) en caldo TSB fresco y se agregaron 20 µl a cada pocillo de las placas de microtitulación de 96 pocillos. Posteriormente, los pocillos se completaron con 180 µl de caldo TSB suplementado con la composición de la invención a concentraciones sub-MIC (1/2 MIC de la composición de la invención para cada cepa hasta el 20% de la composición de la invención, v/v). Los controles sin la composición de la invención consistieron en 180 µl de caldo TSB. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones aerobias durante 24 horas y los pocillos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS). La actividad anti-biopelícula de la composición de la invención se determinó tiñendo los pocillos lavados con 100 µl de cristal violeta al 1% (p/v) que se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 590 nm usando un lector de microplacas (lector de absorbancias de microplacas iMark, instrumento Bio-Rad). El porcentaje de inhibición de la formación de biopelículas se determinó usando la siguiente fórmula como se describe por Zmantar et al. (2017):

DO: densidad óptica.

30

$$\frac{\text{DO Control} - \text{DO Muestra}}{\text{DO Control}} \times 100$$

35 **Ejemplo 4. Efecto antimicrobiano de la composición de la invención sobre la biopelícula preformada.**

Se usó un inóculo con el 2% de cada bacteria y el cóctel de todas las cepas en TSB para la preparación de la biopelícula que se cultivó en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas a 37°C. Después de la incubación, el caldo de cultivo que contenía bacterias no adheridas se retiró y los pocillos se lavaron con PBS estéril. Las biopelículas se trataron con la composición de la invención durante diferentes períodos de tiempo (5, 10, 15, 20 y 30 minutos) a temperatura ambiente. Después de los tratamientos, se retiró la composición de la invención y los pocillos se incubaron con 200 µl de caldo neutralizante D / E (Difco, Barcelona) durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se lavaron con 200 µl de PBS. Las biopelículas se resuspendieron en 200 µl de PBS y luego se sembraron en TSA. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas para la determinación del número total de UFC/ml.

Ejemplo 5. Evaluación microscópica del efecto de la composición de la invención en la biopelícula.

La obtención de imágenes de la biopelícula tratada con la composición de la invención se realizó utilizando LIVE/DEAD BacLight™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU) y un microscopio de escaneo láser confocal (LEICA TCS-SP5 II, Mannheim, Alemania) equipado con Plan-Apochromat 63x / 1.4 objetivo. Después de cultivar la biopelícula en una placa de microtitulación (200 µl) como se describió anteriormente, algunos pocillos no se trataron con la composición de la invención (control) y los otros se sometieron a tratamiento con la composición de la invención durante 5 y 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS estéril y se resuspendieron en 50 µl de PBS. Posteriormente, 20 µl de las suspensiones (control y tratamiento con la composición de la invención) fueron completadas con 0,5 µl de tinción LIVE/DEAD y posteriormente se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se obtuvieron imágenes usando un microscopio de escaneo láser confocal.

Ejemplo 6. Efecto de la concentración sub-inhíbitora de la composición de la invención sobre la resistencia a la biopelícula.

Se añadió (o no) 1/2 MIC de la composición de la invención en caldo TSB (2 ml) al cóctel de las seis cepas bacterianas (2%) y posteriormente se incubaron durante 18 horas a 37°C en tubos y también en placas de microtitulación de 12 pocillos para formación de biopelículas. La extracción de ARN se realizó a partir de cultivos bacterianos planctónicos

y también de biopelículas multiespecie utilizando el kit de ARN Direct-zol™ (Zymo Research, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 7. Análisis estadístico.

5

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EE. UU). Para determinar los promedios y las desviaciones estándar. La evaluación estadística de la inhibición del desarrollo de biopelículas se realizó por análisis de

10 varianza (ANOVA) usando el software Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologie, Warrenton, Virginia, EE. UU). El mismo software se usó para realizar las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para verificar la normalidad de los datos y realizar el contraste múltiple de Tukey bilateral para determinar las diferencias por pares entre las cepas, donde el nivel de significancia se estableció en el valor P de <0.05.

15

RESULTADOS

Ejemplo 8. Actividad antimicrobiana de la composición de la invención en cultivos planctónicos.

20

La **Tabla 1** muestra el efecto antimicrobiano que ejerce la composición de la invención sobre el crecimiento de las células planctónicas de cada bacteria y también sobre el cóctel de todas las bacterias ensayadas. La **Tabla 1** muestra la determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (MIC) y Concentración Bactericida Mínima (MBC) de la

25 composición de la invención.

Tabla 1

Cepas	MIC de HLE (% v/v)	MBC de HLE (% v/v)
<i>E. faecalis</i> S-47	0.25	0.25
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032	0.15	0.2
<i>S. aureus</i> CECT 4468	0.4	0.4
<i>B. cereus</i> CECT 5148	0.3	0.5
<i>E. coli</i> CCUG 47553	0.3	0.4
<i>S. Enteritidis</i> UJ3449	0.3	0.5
Cocktail		

Se detectó una alta susceptibilidad de las cepas bacterianas planctónicas ya que exhibían MIC muy bajas que variaban de 0.15% a 0.4% de la composición de la invención (v/v) siendo *L. monocytogenes* CECT 4032 y *E. faecalis* S-47 las cepas más susceptibles. Sin embargo, *S. aureus* CECT 4468 fue menos susceptible que otras especies y también el cóctel. En cuanto a los valores de MBC, fueron muy similares, oscilando entre 0.2% y 0.5% de la composición de la invención (v/v). En este sentido, la composición de la invención fue efectiva contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y además frente al cóctel hecho con las seis bacterias ya que también fue eliminado a la vista de la baja concentración de la composición de la invención (0.5%).

Ejemplo 9. Inhibición de la formación de biopelículas por la composición de la invención.

Se logró una fuerte inhibición del desarrollo de biopelículas usando la composición de la invención para cada cepa y para el cóctel bacteriano. Los resultados obtenidos mostraron que se logró el 80-91% de la inhibición de la biopelícula en desarrollo para cepas individuales y también el cóctel (**Tabla 2**). Además, el uso de 1/2 MIC de la composición de la invención permitió una inhibición del 33-50% del desarrollo de la biopelícula (**Tabla 2**). Estos resultados indicaron que la composición de la invención inhibió la adherencia bacteriana al poliestireno (**Tabla 2**).

Tabla 2

Cepas	Inhibición del desarrollo de las biopelículas (%±DS*)	
	1/2MIC de HLE (%, v/v)	MIC de HLE (%, v/v)
<i>E. faecalis</i> S-47	36 ± 0.04 ^a	87 ± 0.10 ^d
<i>L. monocytogenes</i> CECT 4032	48 ± 0.05 ^b	85 ± 0.06 ^a
<i>S. aureus</i> CECT 4468	33 ± 0.01 ^a	80 ± 0.02 ^b
<i>B. cereus</i> CECT 5148	46 ± 0.02 ^b	90 ± 0.01 ^a
<i>E. coli</i> CCUG 47553	49 ± 0.04 ^b	85 ± 0.30 ^c
<i>S. Enteritidis</i> UJ3449	47 ± 0.02 ^b	83 ± 0.01 ^c
Cocktail		

±DS, desviación estándar de tres experimentos independientes.

*Cada letra minúscula diferente representa diferencias significativas según el HSD de Tukey entre las cepas (p <0.05).

Ejemplo 10. Evaluación del efecto antimicrobiano de la composición de la invención en biopelículas.

Las biopelículas preformadas de diferentes cepas bacterianas en placas de microtitulación se sometieron al efecto antimicrobiano de la composición de la invención durante varios tiempos de contacto (5, 10, 15, 20 y 30 minutos). Los resultados obtenidos mostraron el efecto bactericida total de la composición de la invención contra todas las cepas bacterianas y también el cóctel después de todos los tiempos de contacto que varían de 5 a 30 minutos (ver **Figura 1**). Además, la microscopía confocal reveló que la composición de la invención tenía un fuerte efecto sobre la biopelícula multiespecie ya que no se detectaron células viables de las biopelículas tratadas con la composición de la invención (5 y 10 minutos) dentro de la matriz de la biopelícula (ver **Figura 2 B-D**), en comparación con controles no tratados con la composición de la invención (ver **Figura 2 A**). Sin embargo, se visualizaron células muertas (ver **Figura 2 C y D**).

15

Ejemplo 11. La composición de la invención inhibe las bombas de eflujo.

La composición de la invención es capaz de inhibir las bombas de eflujo que actúan como mecanismos de resistencia inespecífica en las bacterias (particularmente bombas de eflujo EfrAB y NorE). Esto se demuestra en la presente invención mediante análisis de la expresión de dichos genes en el cóctel de las bacterias estudiadas en ausencia y presencia de bajas concentraciones del compuesto (1/2 MIC). La composición de la invención adicionada a una concentración sub-inhibitoria (1/2 MIC) al cóctel de bacterias en TSB permitió la inhibición de la expresión de genes que codifican para las bombas de eflujo EfrAB (genes *efrA* y *efrB*) y NorE (el gen *norE*) tal y como se muestra en la **Figura 4**. Esta inhibición de las bombas de eflujo reduce la diseminación de patógenos resistentes a los diferentes antimicrobianos. Así, se evita el desarrollo de biopelículas con mayor resistencia a los antimicrobianos. En la **Figura 4** se ve claramente que la aplicación de la composición de la invención a una concentración sub-inhibitoria del crecimiento (1/2 MIC) tiene una baja expresión de los genes codificadores de las bombas de eflujo EfrAB y NorE, las cuales juegan un papel importante en la resistencia intrínseca e inespecífica a los diferentes agentes antimicrobianos (antibióticos y biocidas). Por lo tanto, por un lado, gracias a la acción inhibitoria de las bombas de eflujo, la composición de la invención permite potenciar la acción antimicrobiana de los dos agentes bactericidas (ácido láctico y peróxido de hidrógeno) al bloquear uno de los mecanismos de defensa bacteriana, permitiendo así restaurar la actividad antimicrobiana de diversos

35

compuestos antimicrobianos que han perdido su actividad debido a la presencia de bombas de eflujo. Por otra parte, el uso de la composición de la invención, al bloquear o inhibir las bombas de eflujo, reducirá la emergencia existente relativa a la existencia de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos. Actualmente, las bombas de eflujo
5 representan unas dianas muy atractivas para reducir la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos (antibióticos y biocidas). Particularmente, el mecanismo mediante el cual se cree que el EDTA promueve la inhibición de la bomba de eflujo es mediante el secuestro de los iones de calcio, así, no puede producirse la hidrólisis del ATP y no puede ponerse en funcionamiento las bombas de exporte de la familia de los
10 transportadores ABC, como es el caso de la bomba de exporte EfrAB.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende peróxido de hidrógeno, ácido láctico y EDTA, caracterizada por no comprender agentes bactericidas tóxicos.
5
2. Composición, según la reivindicación 1, caracterizada porque el agente bactericida tóxico se selecciona de la lista que comprende: fenoles, metales pesados, aldehídos y detergentes.
- 10 3. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque el agente bactericida tóxico se selecciona de la lista que comprende: ácido mandélico, ácido peracético, SDS, cloruro de cetilpiridinio, Sodio Cocoyl Sarcosinato, Lauril sarcosinato de sodio y/o Sodio dodecil difenil éter disulfonato.
- 15 4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a. Al menos 3-6% de peróxido de hidrógeno.
 - b. Al menos 2.2-4.4% de ácido láctico.
 - c. 12.5-25 mM de EDTA.
- 20 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 - a. 6% de peróxido de hidrógeno.
 - b. 4.25% de ácido láctico.
 - 25 c. 25 mM de EDTA.
6. Método para la eliminación de biopelículas conformadas por al menos una bacteria, presentes en cualquier superficie o utensilio, que comprende la aplicación de la composición de la reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Método, según la reivindicación 6, donde la composición se aplica a la biopelícula al menos durante 2 minutos, preferentemente durante 5-15 minutos.
8. Método, según las reivindicaciones 6 o 7, donde las bacterias que conforman la
35 biopelícula son: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes*

CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449.

- 5 9. Uso de la composición de las reivindicaciones 1 a 5 como desinfectante de cualquier tipo de utensilio o superficie.
10. Uso, según la reivindicación 9, para la eliminación de biopelículas conformadas por al menos una bacteria.
- 10 11. Uso, según las reivindicaciones 9 o 10, donde la composición se aplica a la biopelícula al menos durante 2 minutos, preferentemente durante 5-15 minutos.
12. Uso, según las reivindicaciones 9 a 11, donde las bacterias que conforman la biopelícula son: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449.
- 15
13. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para ser usada en el tratamiento de pacientes aquejados de infecciones bacterianas y/o de intoxicaciones causadas por metales pesados.
- 20
14. Composición para ser usada, según la reivindicación 13, donde la bacteria se seleccionada de la lista que comprende: *Staphylococcus aureus* CECT 4468, *Listeria monocytogenes* CECT 4032, *Enterococcus faecalis* S-47, *Bacillus cereus* CECT 5148, *Escherichia coli* CCUG 47553 y *Salmonella* Enteritidis UJ3449.
- 25
15. Composición para ser usada, según la reivindicación 13, donde el metal pesado es Cadmio.

30

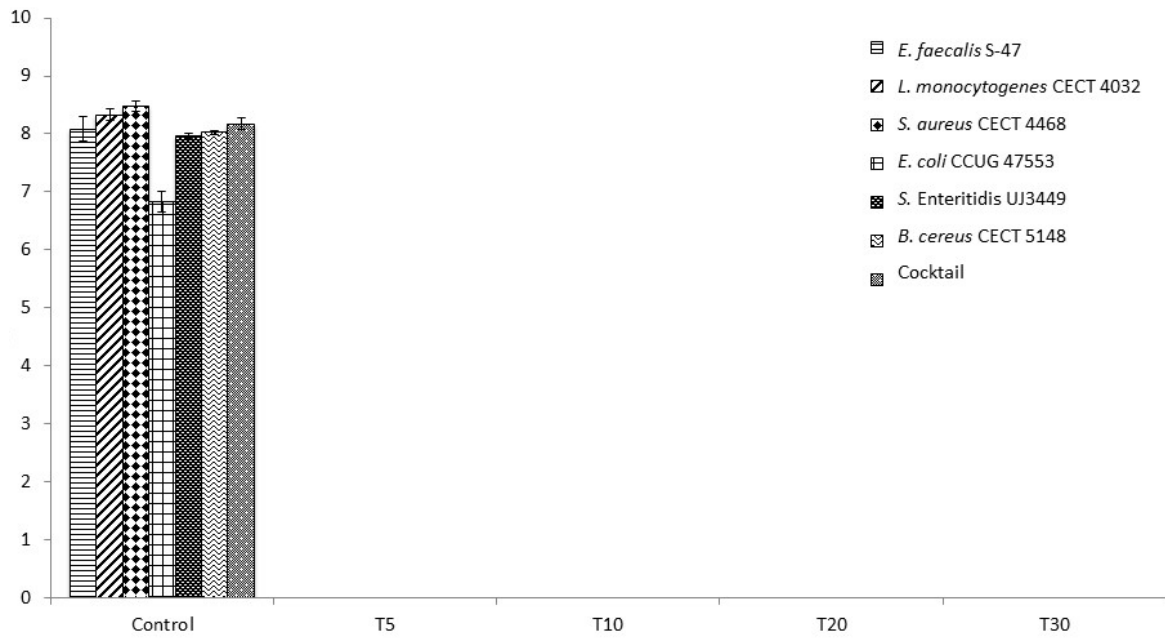


Figura 1

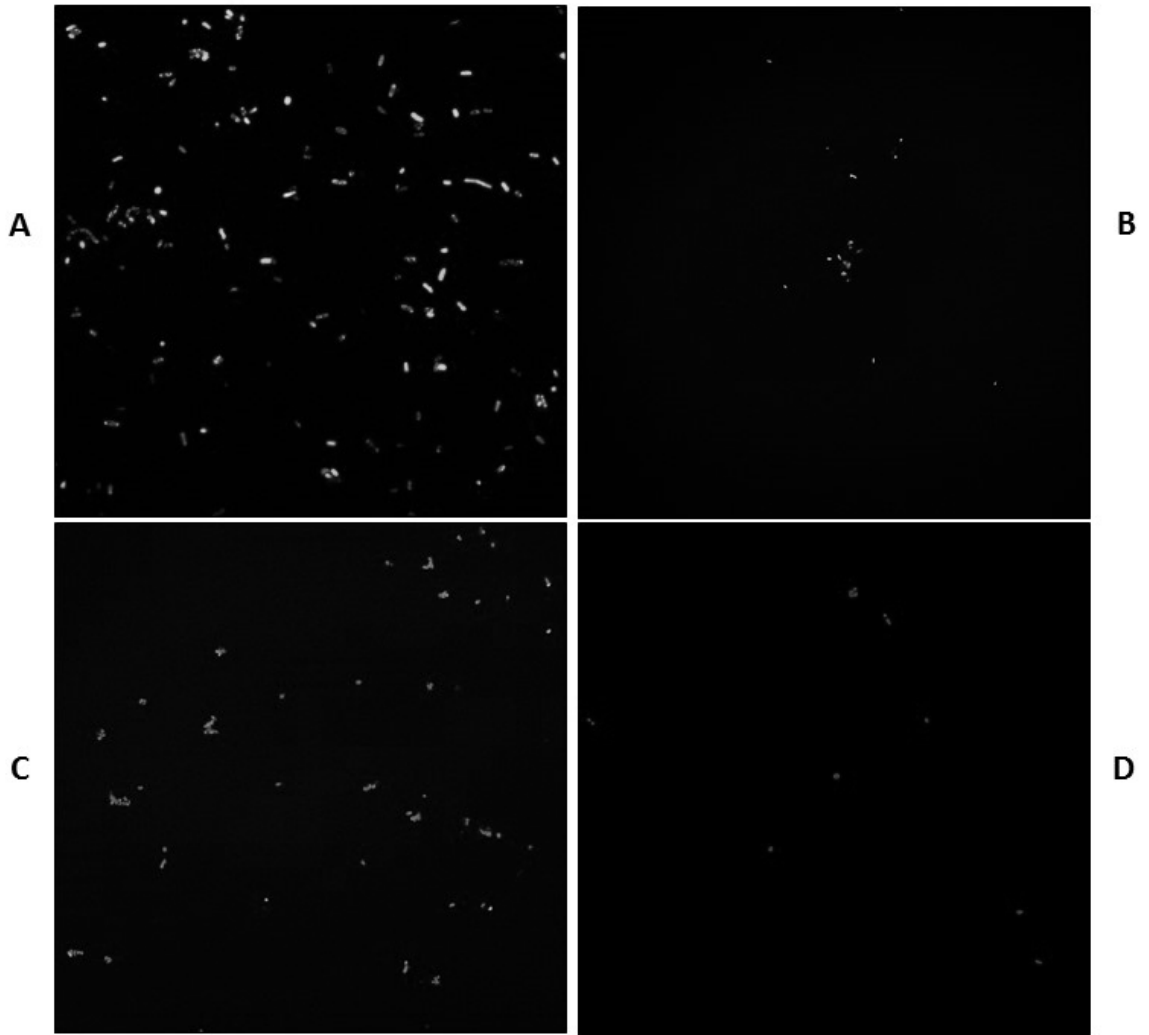


Figura 2

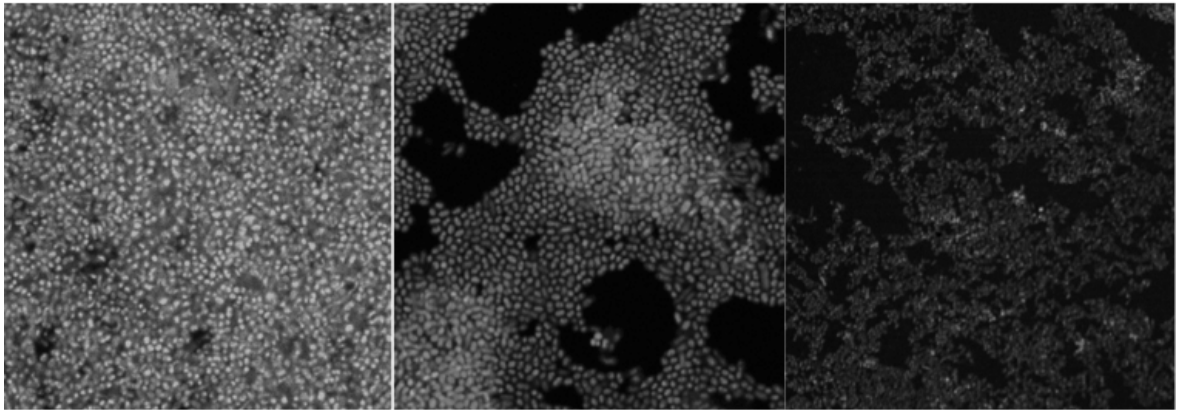


Figura 3

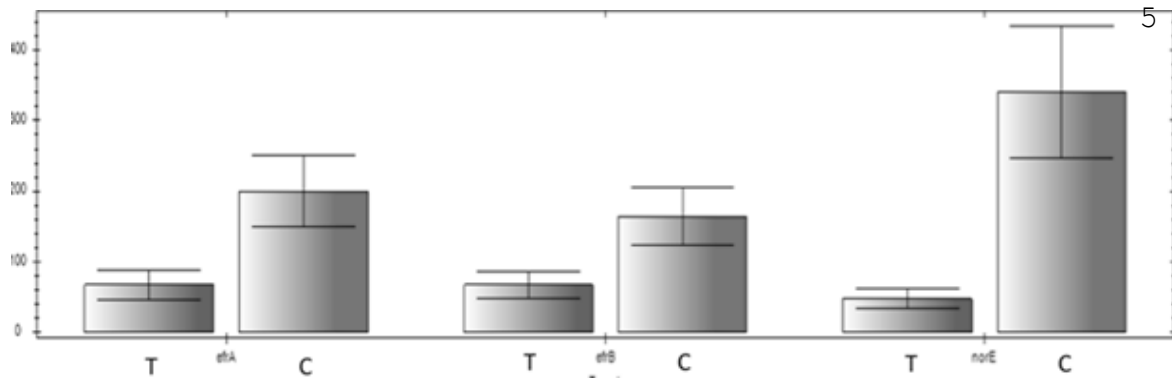


Figura 4



- ②① N.º solicitud: 201731462
②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9302973 A1 (TRAWOEGER WERNER <i>et al.</i>) 18/02/1993, Página 8, línea 31-página 9, línea 3; ejemplos.	1-3, 6-15
X	US 2009312279 A1 (MOOKERJEE PRADIP <i>et al.</i>) 17/12/2009, Tabla 1, página 12, línea 8; página 13, líneas 22-44; página 14, líneas 13-25, 29-31, 35, 43-46; Párrafos [0099], [0102], [0106], [0112], [0113].	1-3, 6-15
A	US 2005153031 A1 (MAN VICTOR F <i>et al.</i>) 14/07/2005, Párrafos [0005], [0228], Tabla 5, composición BA, párrafos [0299], [0300].	1-15
A	US 5731275 A (PREVOST ANDRE <i>et al.</i>) 24/03/1998, Columna 3, línea 65-columna 4, línea 6.	1-15
A	US 2002016278 A1 (BARBEAU JEAN <i>et al.</i>) 07/02/2002, Tabla 1 (línea 2).	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.09.2018

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K33/40 (2006.01)
A61K31/19 (2006.01)
A61K31/198 (2006.01)
A01N59/00 (2006.01)
A01N37/36 (2006.01)
A01N37/44 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, CAS, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP, PATENW