

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 730**

51 Int. Cl.:

<b>A01N 43/90</b>	(2006.01)	<b>A61K 36/88</b>	(2006.01)
<b>A01N 65/00</b>	(2009.01)		
<b>A01N 65/34</b>	(2009.01)		
<b>A01P 1/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/14</b>	(2006.01)		
<b>A61K 38/15</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/75</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/76</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/77</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/87</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2011 E 11831602 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2624702**

54 Título: **Composiciones anti-biopelícula y métodos de uso**

30 Prioridad:

**23.05.2011 US 201161488878 P**  
**06.10.2010 US 390254 P**

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

**04.05.2016**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ARKANSAS (100.0%)**  
**2404 N. University Avenue**  
**Little Rock, AR 72207, US**

72 Inventor/es:

**QUAVE, CASSANDRA L.;**  
**SMELTZER, MARK S.;**  
**COMPADRE, CESAR M. y**  
**HENDRICKSON, HOWARD**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 568 730 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones anti-biopelícula y métodos de uso

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere generalmente a biopelículas. En particular, se refiere a composiciones y métodos de inhibición de la formación de biopelículas y/o reducción del crecimiento de una biopelícula establecida.

10 **Antecedentes de la invención**

[0002] Se podría mantener que *Staphylococcus aureus* es el patógeno más problemático al que se enfrentan los modernos sistemas sanitarios hoy en día, debido en gran parte a la aparición persistente de cepas resistentes a antibióticos. Esto es quizás más evidente en la reciente aparición de cepas resistentes a metilina, incluso entre cepas aisladas que causan infección extrahospitalaria. Además, muchas de estas cepas, la mayor parte en particular aquellas del linaje clonal USA300, tienen la capacidad de producir infección grave potencialmente mortal incluso en individuos por lo demás sanos. Esto representa en gran parte la observación de que, en los Estados Unidos solo en 2005, una estimación de 94.360 pacientes padecieron infección invasiva producida por *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), dando lugar aproximadamente 18.650 a un desenlace mortal.

[0003] La aparición continuada de cepas resistentes a antibióticos ha creado una necesidad urgente de nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, muchas infecciones por *S. aureus* son resistentes a antimicrobianos incluso en ausencia de cuestiones relacionadas con la resistencia adquirida. Un factor contribuyente primario a esta resistencia es la formación de una biopelícula sobre tanto tejidos nativos como dispositivos médicos permanentes. Esto es debido al hecho de que la biopelícula confiere un grado de resistencia intrínseca que frecuentemente necesita intervención quirúrgica para desbridar tejidos infectados y/o retirar dispositivos infectados. Por ejemplo, un estudio encontró que casi la mitad de los pacientes con dispositivos ortopédicos implantados ingresados en un hospital con bacteremia por *S. aureus* habían desarrollado una infección asociada al implante. Así, aunque hay una necesidad urgente de nuevos antibióticos, hay una necesidad igualmente urgente de desarrollar agentes terapéuticos que pudieran usarse para limitar la formación de biopelículas. Aunque tales agentes no funcionarían necesariamente como antibióticos de por sí, podrían usarse como profiláctico para limitar la formación de biopelículas (por ejemplo, recubrimiento para dispositivos implantados, lavado quirúrgico o profilaxis oral preoperatoria) o como terapéutico que va a usarse conjuntamente con antibióticos más convencionales para tratar una infección asociada a biopelícula establecida.

35 **Sumario de la invención**

[0004] Entre los diversos aspectos de la presente divulgación está la provisión de una composición polifenólica. La composición polifenólica es obtenible por un procedimiento que comprende (a) fraccionar un extracto de etanol al 95 % de raíces de *Rubus ulmifolius* con una mezcla de agua y hexano para formar un primer extracto de agua y un extracto de hexano; (b) fraccionar el primer extracto de agua con una mezcla de agua y acetato de etilo para formar un segundo extracto de agua y un extracto de acetato de etilo; (c) fraccionar el segundo extracto de agua con una mezcla de agua y butanol para formar un tercer extracto de agua y un extracto de butanol; y (d) fraccionar el extracto de butanol por cromatografía en columna de gel de sílice con una fase móvil que comprende una mezcla de metanol y diclorometano, en el que la composición polifenólica es eluida por la fase móvil en la que la relación de volumen de metanol con respecto a diclorometano es 40:60.

[0005] Otro aspecto de la divulgación proporciona una combinación que comprende la composición polifenólica obtenida como antes y al menos un agente antimicrobiano.

[0006] Todavía otro aspecto de la divulgación engloba un método de inhibición de la formación de una biopelícula. El método comprende poner en contacto una pluralidad de microorganismos de flotación libre con la composición polifenólica detallada anteriormente tal que se inhiba la formación de la biopelícula.

[0007] Otro aspecto de la divulgación proporciona un método de inhibición del crecimiento de una biopelícula establecida. El método comprende poner en contacto la biopelícula con la composición polifenólica obtenida como se ha descrito anteriormente y al menos un agente antimicrobiano de forma que la biopelícula tenga un número reducido de microorganismos.

[0008] Otras características e iteraciones de la invención se describen más abajo en más detalle.

## Breve descripción de las figuras

[0009]

- 5 La **FIG. 1** presenta el esquema de fraccionamiento para la extracción de la fracción rica en fenoles de raíces de *R. ulmifolius*.
- La **FIG. 2** ilustra el aumento en la actividad inhibitoria de biopelículas del extracto en bruto 220 durante el extracto y el fraccionamiento. Las CMIB para el extracto de etanol en bruto, extracto de butanol, y las fracciones MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de 40:60, 50:50 y 60:40, fueron 0,2, 0,1, 0,05, 0,05 y 0,05 mg/ml, respectivamente, en tanto cepas UAMS-1 (USA200) como UAMS-1782 (USA300). **(A)** Presenta resultados visuales de ensayos en placa de microtitulación. Las cepas no mutantes (WT) se identifican según sus UAMS I.D. en el lado izquierdo y la concentración de extracto añadida a los pocillos antes de la inoculación también se indica a la izquierda. Los extractos correspondientes probados se indican arriba. El mutante sin tratar y su mutante *sarA* isogénico respectivo también se indican arriba. **(B)** y **(C)** presentan gráficos de barras que ilustran la relación dosis-respuesta entre las diversas fracciones de planta y células UAMS-1 (USA200) o UAMS-1782 (USA300), respectivamente. Algunas fracciones presentaron niveles de inhibición de biopelícula que se aproximaron a aquellos de los controles de mutante *sarA* isogénico correspondiente. La significación estadística de la diferencia entre los pocillos sin tratar y tratados se indica con \* (P < 0,05) y t (P < 0,001). Ambos mutantes *sarA* isogénicos correspondientes fueron significativamente diferentes del no mutante.
- 10 La **FIG. 3** presenta un cromatograma de CL-EM de la fracción activa (220D-F2). El cromatograma se obtuvo usando un microsistema de CL-Q-ToF de columna Bondapak C-18. El trazo representado se extrajo para componentes en el intervalo m/z 290 - 500.
- La **FIG. 4** ilustra el impacto de la fracción 220D-F2 sobre el crecimiento de *S. aureus*. Se representan las curvas de crecimiento de WT, WT + 0,2 mg/ml de 220D-F2 y células de mutante *sarA*.
- 15 La **FIG. 5** muestra la actividad anti-biopelícula de la fracción 220D-F2. **(A)** Se presentan la placa de microtitulación en la que las células se tiñen con cristal violeta, que evalúa las biopelículas estáticas. Las cepas WT se identifican según sus UAMS I.D. arriba de la imagen. Las asignaciones del tipo de campo pulsado USA correspondiente se indican abajo. La concentración de 220D-F2 añadida a los pocillos antes de la inoculación se indica a la izquierda. El no mutante sin tratar y su mutante *sarA* isogénico respectivo también se indican aquí. **(B)** La densidad celular se representa en función de las células y/o tratamiento. Fue evidente una relación dosis-respuesta entre algunas de las fracciones de planta y bacterias y todas las cepas presentaron niveles de inhibición de biopelícula que se aproximaron a aquellos de los controles de mutante *sarA* isogénico correspondientes. La significación estadística de la diferencia entre los pocillos sin tratar y tratados se indica con \* (P < 0,05) y ‡ (P < 0,001). Todos los mutantes *sarA* isogénicos correspondientes fueron significativamente diferentes del no mutante a P < 0,001.
- 20 La **FIG. 6** presenta imágenes confocales de biopelículas estáticas. Las imágenes se recogieron después de 20 h de incubación. Con el fin de evaluar la capacidad profiláctica del agente en inhibir la formación de biopelículas, los pocillos se pre-trataron con tanto 220D-F2 como el excipiente solo (DMSO) 0 h después de la inoculación. Se usa una vista ortogonal de las biopelículas para representar la arquitectura global de la biopelícula con un aumento de 10X. **A-E** representan biopelículas formadas por UAMS-1 (USA200) y **F-J** son de UAMS-1782 (USA300) bajo las condiciones de prueba indicadas.
- La **FIG. 7** ilustra el efecto de la fracción 220D-F2 sobre la formación de biopelículas de *S. aureus* en un modelo de catéter *in vitro*. Las bacterias tratadas con 220D-F2 (0,2 mg/ml) en el momento de la inoculación formaron una biopelícula significativamente más débil (P < 0,05) que el control no tratado. Además, el nivel de formación de biopelículas fue similar al del mutante *sarA*.
- 25 La **FIG. 8** muestra la capacidad de la fracción 220D-F2 sola o en combinación con daptomicina para romper las biopelículas establecidas usando un modelo de catéter. **(A)** Los catéteres fueron colonizados en ausencia de cualquier extracto. Es evidente una tendencia que muestra la reducción de biopelícula en catéteres tratados con tanto 220D-F2 (0,2 mg/ml) como daptomicina (0,01 ml/ml). La diferencia entre los catéteres tratados con daptomicina y 220D-F2 en comparación con aquellos tratados con daptomicina sola es significativa (P < 0,05) en el día 7. **(B)** Los catéteres fueron colonizados en presencia de 0,2 mg/ml de 220D-F2, produciendo la formación de una biopelícula debilitada en el día 0, aproximadamente equivalente a la del mutante *sarA*. Ya es evidente una eficacia mejorada del tratamiento con tanto 220D-F2 como daptomicina (en comparación con daptomicina sola) en el día 1 (P < 0,05).
- 30 La **FIG. 9** ilustra la actividad sinérgica de la fracción 220D-F2 y un antibiótico sobre la rotura de biopelículas establecidas. **(A)** daptomicina, **(B)** clindamicina, **(C)** vancomicina, **(D)** oxacilina. Cuadrados negros: control de biopelícula (sin tratamiento); cuadrados blancos: control de extracto (200 mg/l de 220D-F2); triángulos negros: antibiótico a 1X la CMI en el punto de rotura; triángulos blancos: antibiótico a 1X la CMI en el punto de rotura + 200 mg/l de 220D-F2; círculos negros: antibiótico a 10X la CMI en el punto de rotura; círculos blancos: antibiótico a 10X la CMI en el punto de rotura + 200 mg/l de 220D-F2.
- 35 La **FIG. 10** presenta la inhibición de la formación de biopelículas por fracciones de 220D-F2. Se usó un ensayo de biopelículas en placa de microtitulación estáticas para evaluar la actividad inhibitoria de fracciones de 220D-F2 tanto solas como en combinación usando UAMS-1. Ninguna fracción individual de 220D-F2 mostró actividad inhibitoria mejorada de biopelículas con respecto a 220D-F2 en conjunto. Se hicieron múltiples combinaciones de las fracciones y la única combinación que produjo la restauración de la actividad al mismo nivel que 220D-

F2 fue cuando se recombinaron las 4 fracciones (f1+f2+f3+f4). Asimismo, un único conjunto, en el que 220D-F2 se ejecutó a través del sistema de HPLC y se recogió en conjunto (en lugar de dividirlo en fracciones) también produjo el mismo nivel de actividad que el 220D-F2 original. La significación estadística (\*, P <0,05; ‡, P <0,001) se refiere a diferencias observadas en comparación con el control no tratado.

5 La **FIG. 11** ilustra la inhibición de la formación de biopelículas por compuestos individuales. Se empleó un ensayo de biopelícula en microtítulo estático para evaluar la capacidad de varios compuestos de *R. ulmifolius* para limitar la formación de biopelículas de *S. aureus* y *S. epidermidis*. **(A)** muestra resultados contra UAMS-1, una cepa sensible a meticilina de osteomielitis clínica de *S. aureus*. **(B)** muestra resultados contra UAMS-1625, *S. aureus* de absceso cerebral clínico, resistente a meticilina. **(C)** muestra resultados contra UAMS-1864, *S. aureus* de circulación sanguínea clínica, resistente a meticilina. **(D)** muestra resultados contra UAMS-1865, una cepa aislada de *S. aureus* de circulación sanguínea clínica, resistente a meticilina. **(E)** muestra resultados contra UAMS-302, una cepa aislada sensible a meticilina de *S. epidermidis*. **(F)** muestra resultados contra UAMS-1037, una cepa aislada de *S. epidermidis* de septicemia por catéter clínico, resistente a meticilina.

10 La **FIG. 12** muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad usando una prueba de lactato deshidrogenasa (LDH) tras 24 horas de exposición a la fracción 220D-F2. Los resultados se informan como el porcentaje de viabilidad celular después de la exposición a la dosificación indicada de 220D-F2 en el medio de crecimiento de cultivo. Significación estadística (\*, P <0,05; ‡, P <0,001) se refiere a diferencias observadas en comparación con el control sin tratar (excipiente). **(A)** muestra resultados contra células tubulares proximales de riñón humano normal (HK-2). **(B)** muestra resultados contra células tubulares proximales de riñón de ratón normal (TKPTS). **(C)** muestra resultados contra células de riñón de rata normal (NRK-52E). **(D)** muestra resultados contra hepatocitos de ratón normal (AML12).

### Descripción detallada de la invención

25 **[0010]** La presente invención proporciona composiciones y métodos de inhibición de la formación y crecimiento de biopelículas. En un aspecto, la divulgación proporciona una composición polifenólica que comprende ácido elágico y derivados de ácido elágico. La composición polifenólica se deriva de un extracto de raíz de *Rubus ulmifolius* por un procedimiento desvelado en el presente documento. Se ha descubierto que la composición polifenólica inhibe la formación de biopelículas y aumenta la susceptibilidad de una biopelícula establecida a agentes antimicrobianos.

30 Otro aspecto de la divulgación proporciona una combinación que comprende la composición polifenólica extraída de raíz de *Rubus ulmifolius* y al menos un agente antimicrobiano, en la que la combinación inhibe el crecimiento de biopelículas establecidas. Ventajosamente, la actividad de la combinación desvelada en el presente documento es sinérgica, es decir, su actividad es superior a la suma de la actividad de cada componente individual. En el presente documento también se proporcionan métodos de inhibición de la formación de una biopelícula, además de métodos

35 de inhibición del crecimiento de una biopelícula establecida.

#### (I) Composición polifenólica

**[0011]** En una realización se proporciona una composición polifenólica. La composición polifenólica se prepara por un procedimiento que comprende (a) fraccionar un extracto de etanol al 95 % de raíces de *Rubus ulmifolius* con una mezcla de agua y hexano para formar un primer extracto de agua y un extracto de hexano; (b) fraccionar el primer extracto de agua con una mezcla de agua y acetato de etilo para formar un segundo extracto de agua y un extracto de acetato de etilo; (c) fraccionar el segundo extracto de agua con una mezcla de agua y butanol para formar un tercer extracto de agua y un extracto de butanol; y (d) fraccionar el extracto de butanol por cromatografía en columna

40 de gel de sílice con una fase móvil que comprende una mezcla de metanol y diclorometano, en el que la composición polifenólica es eluída por la fase móvil en la que la relación de volumen de metanol con respecto a diclorometano es 40:60.

**[0012]** El método comprende una serie de etapas de forma que una fracción enriquecida con una composición polifenólica puede aislarse de un extracto de alcohol de una planta.

#### (a) extracto de alcohol

**[0013]** El extracto de alcohol se deriva de raíces de *Rubus ulmifolius*.

55 **[0014]** Las raíces pueden ser frescas, secas, congeladas o liofilizadas. Las raíces pueden molerse o pulverizarse en un material de planta usando un homogeneizador, una mezcladora, un mortero y pistilo, un sonicador, o un aparato similar.

60 **[0015]** El extracto de raíz de *Rubus ulmifolius* se prepara poniendo en contacto el material de planta con etanol al 95 % durante un periodo de tiempo apropiado.

**[0016]** El periodo de tiempo que el material de planta se pone en contacto con el disolvente de alcohol puede oscilar de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 5 días. En diversas realizaciones, el material de planta

65 puede ponerse en contacto con el disolvente de alcohol durante aproximadamente 1-24 horas, durante

aproximadamente 24-48 h, durante aproximadamente 48-72 horas, durante aproximadamente 72-96 horas, o durante aproximadamente 96-120 horas. En una realización a modo de ejemplo, el periodo de tiempo que el material de planta se pone en contacto con el disolvente de alcohol puede ser aproximadamente 72 horas. Tras la eliminación del extracto del material de planta, el material de planta puede extraerse una o más veces adicionales con disolvente de alcohol fresco, esencialmente como se ha detallado anteriormente.

**[0017]** El disolvente de alcohol puede eliminarse del extracto de alcohol de planta para formar un extracto de alcohol de planta seco. Aquellos expertos en la materia están familiarizados con técnicas adecuadas para eliminar el disolvente de alcohol que incluyen, sin limitar, evaporación, destilación y liofilización.

10

#### **(b) extracciones con líquido**

**[0018]** El procedimiento para preparar una fracción rica en los compuestos polifenólicos comprende someter el extracto de etanol de planta a una serie de extracciones con líquido de forma que los compuestos polifenólicos se repartan en una de las fases y los otros compuestos se repartan en la otra fase. En general, la serie de extracciones con líquido comprende poner en contacto el extracto de etanol de planta (o extracto del mismo) con un sistema de disolventes, en el que la polaridad de uno o más de los disolventes cambia durante cada serie sucesiva de extracciones. Aquellos expertos en la materia están familiarizados con los protocolos de extracción con líquido y sistemas de disolvente adecuados. Generalmente, los líquidos se mezclan por inversión suave a temperatura ambiente. Después de la separación de las fases, la fase que contiene los compuestos polifenólicos de la misma se extraen una o más veces con los disolventes de interés.

**[0019]** Por ejemplo, la primera etapa del procedimiento comprende una extracción con líquido durante la cual el extracto de etanol de planta se reparte en una mezcla de agua y hexano para formar un primer extracto de agua y un extracto de hexano. Los compuestos polifenólicos se repartieron en la fase acuosa tras la extracción con una mezcla de agua y hexano.

**[0020]** En la siguiente etapa del procedimiento, el primer extracto de agua se extrae en una mezcla de agua y acetato de etilo para formar un segundo extracto de agua y un extracto de acetato de etilo. Los compuestos polifenólicos se repartieron en la fase acuosa tras la extracción con una mezcla de agua y acetato de etilo.

**[0021]** La siguiente etapa de extracción y final comprende extraer el segundo extracto de agua con una mezcla de agua y butanol para formar un tercer extracto de agua y un extracto de butanol. Los compuestos polifenólicos se repartieron en la fase de butanol tras la extracción con una mezcla de agua y butanol.

35

**[0022]** La primera extracción líquido-líquido comprende agua y hexano, la segunda extracción líquido-líquido comprende agua y acetato de etilo, y la tercera extracción líquido-líquido comprende agua y butanol.

#### **(c) cromatografía en columna**

40

**[0023]** El método comprende además fraccionar la fracción rica en polifenoles por cromatografía en columna. La cromatografía en columna comprende una fase estacionaria de gel de sílice.

**[0024]** La fase móvil puede comprender una mezcla de metanol y diclorometano. La fracción rica en polifenoles eluye de la columna a una relación de volumen de metanol con respecto a diclorometano de 40:60. La fracción rica en polifenoles puede secarse eliminando los disolventes de la fase móvil usando procedimientos convencionales.

#### **(d) compuestos en la composición polifenólica**

**[0025]** La composición polifenólica comprende ácido elágico y derivados de ácido elágico (véase el Ejemplo 6). El derivado de ácido elágico puede estar metilado, acetilado, sulfatado, fosforilado, hidroxilado, glicosilado, o modificado con otro grupo adecuado. Ejemplos no limitantes de derivados glicosilados adecuados incluyen derivados metilados, derivados acetilados, derivados de arabinopiranosido, derivados de galactósido, derivados de glucopiranosido, derivados de glucósido, derivados de glucurónido, derivados de glucósido, derivados de manopiranosido, derivados de ramnósido, derivados de xilofuranósido y derivados de xilopiranosido. Derivados de ácido elágico a modo de ejemplo incluyen xilopiranosido de ácido elágico, xilofuranósido de ácido elágico, manopiranosido de ácido elágico y ramnósido de ácido elágico. La composición polifenólica puede comprender además al menos una sapogenina.

**[0026]** En algunos aspectos, la composición polifenólica puede comprender además al menos un compuesto elegido de [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2-[(6-desoxi- $\alpha$ -L-mannopiranosil)oxi]-3,7,8-trihidroxi-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2,8-dihidroxi-3-metoxi-7-(D-xilopiranosiloxi)-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2,3-dihidroxi-8-metoxi-7-(D-xilopiranosiloxi)-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2-( $\alpha$ -L-arabinofuranosiloxi)-3,7-dihidroxi-8-metoxi-; ácido 2-butenodioico, 2-[(2R,3R)-3,4-dihidro-5,7-dihidroxi-3-[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-2H-1-benzopirano-2-il]-, (2Z)-;

65



tales como almidón de maíz, almidón de patata, almidones pregelatinizados y modificados de los mismos, edulcorantes, arcillas, tales como bentonita, celulosa microcristalina, alginatos, glicolato sódico de almidón, gomas tales como agar, guar, semilla de algarroba, karaya, pectina y tragacanto.

5 **[0036]** En otra realización más, el excipiente puede incluir un potenciador de la dispersión. Dispersantes adecuados pueden incluir almidón, ácido algínico, polivinilpirrolidonas, goma guar, caolín, bentonita, celulosa de madera purificada, glicolato sódico de almidón, silicato isoamorfo y celulosa microcristalina.

10 **[0037]** En otra realización, el excipiente puede incluir un lubricante. Ejemplos de lubricantes adecuados incluyen minerales tales como talco o sílice; y grasas tales como estearina vegetal, estearato de magnesio o ácido esteárico.

**[0038]** En otra realización adicional, puede desearse proporcionar un colorante. Aditivos de color adecuados incluyen colores para alimentos, fármacos y cosméticos (FD&C), colores para fármacos y cosméticos (D&C), o colores para fármacos y cosméticos externos (Ext. D&C).

15 **[0039]** La fracción en peso del (de los) excipiente(s) en la composición puede ser aproximadamente el 98 % o menos, aproximadamente el 95 % o menos, aproximadamente el 90 % o menos, aproximadamente el 85 % o menos, aproximadamente el 80 % o menos, aproximadamente el 75 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, aproximadamente el 65 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos, aproximadamente el 55 % o menos, aproximadamente el 50 % o menos, aproximadamente el 45 % o menos, aproximadamente el 40 % o menos, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos, aproximadamente el 25 % o menos, aproximadamente el 20 % o menos, aproximadamente el 15 % o menos, aproximadamente el 10 % o menos, aproximadamente el 5 % o menos, aproximadamente el 2 %, o aproximadamente el 1 % o menos del peso total de la composición.

25

## **(II) Combinaciones sinérgicas**

**[0040]** En algunos aspectos se proporciona una combinación que comprende al menos la composición polifenólica y al menos un agente antimicrobiano. La combinación de la composición polifenólica y el al menos un antimicrobiano es sinérgica porque la combinación es más eficaz que los resultados aditivos de cualquier componente de la combinación.

30

### **(a) agente(s) antimicrobiano(s)**

35 **[0041]** La combinación también comprende al menos un agente antimicrobiano. Puede incluirse una variedad de agentes antimicrobianos en la combinación de la invención. Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede ser antibiótico, un agente antifúngico, un antiséptico, o una combinación de los mismos.

40 **[0042]** En algunas realizaciones, el agente antimicrobiano puede ser un antibiótico. Ejemplos de antibióticos adecuados incluyen aminoglucósidos (tales como, por ejemplo, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomycin y tobramicina); beta-lactámicos (es decir, penicilinas tales como amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina y ticarcilina; cefalosporinas tales como cefadroxilo-cefazolina, cefalexina, cefaclor, cefamandol, cefalexina, cefoxitina, cefprozilo, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoren, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuten, ceftizoxima y ceftriaxona; carbacefem tales como loracarbef; carbapenémicos tales como certapenem, imipenem y meropenem); glucopéptidos (tales como vancomicina, ramoplanina, teicoplanina, telavancina, bleomicina, ramoplanina y decaplanina); macrólidos (tales como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina y troleandomicina; monobactámico); polipéptidos (tales como actinomicina, bacitracina, colistina y polimixina B); quinolinas (tales como ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina y trovafloxacina); sulfonamidas (tales como co-trimoxazol, mafenida, sulfacetamida, sulfametizol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim y trimetoprim-sulfametoxazol); tetraciclinas (tales como demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina); y otros antibióticos (por ejemplo, rifamicinas tales como rifampina; lincosamidas tales como clindamicina y lincomicina; lipopéptidos tales como daptomicina; fenólicos tales como triclosán). En realizaciones preferidas, el antibiótico puede ser anfotericina B, clindamicina, daptomicina, dicloxicilina, minociclina, nafcilina, oxacilina, ramoplanina, rifampina, triclosán, vancomicina, o combinaciones de los mismos. En realizaciones a modo de ejemplo, el antibiótico puede ser clindamicina, daptomicina, oxacilina o vancomicina.

55

60 **[0043]** En otras realizaciones, el agente antimicrobiano puede ser un agente antifúngico. Agentes antifúngicos adecuados incluyen alilaminas (tales como amorolfina, butenafina, naftifina y terbinafina); antimetabolitos (tales como flucitosina); azoles (tal como bifonazol, clotrimazol, econazol, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, ravuconazol, posaconazol, terconazol y voriconazol); equinocandinas (tales como caspofungina, micafungina y anidulafungina); inhibidores mitóticos (tales como griseofulvina); fenólicos (tales como triclosán); y polienos (tales como anfotericina B, candicina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina y rimocidina). Agentes antifúngicos preferidos incluyen anfotericina B, fluconazol, griseofulvina, triclosán, y combinaciones de los mismos.

65

**[0044]** En realizaciones adicionales, el agente antimicrobiano puede ser un agente antiséptico. Ejemplos de agentes antisépticos adecuados incluyen biguanidas (tales como alexidina, clorhexidina, polihexametilbiguanida); colorantes (tales como violeta de genciana, violeta de metilo, azul de metileno); sales de ión metálico o conjugados de las mismas (tales como plata, sulfadiazona de plata, cinc, cobre, bismuto, galio, yodo); fenólicos (tales como cloroxilenol, hexaclorofeno, yodofeno, triclosán y timol); y compuestos de amonio cuaternario (tales como cloruro de benzalconio (también llamado cloruro de alquildimetilbencilamonio), cloruro de bencetonio, cloruro de cetalconio, cloruro de cetilpiridinio, cetrimonio, cetrimida, cloruro de didecildimetilamonio, cloruro de dofanio, bromuro de domifeno, cloruro de metilbencetonio, bromuro de tetraetilamonio y cloruro de 3-(trimetoxisilil)-propildimetiloctadecilamonio). Antisépticos preferidos incluyen cloruro de benzalconio, clorhexidina, óxido de plata, sulfadiazina de plata, y combinaciones de los mismos.

**[0045]** La concentración del agente antimicrobiano puede y variará dependiendo de la identidad del agente y el uso de la combinación. La concentración del agente antimicrobiano puede oscilar de niveles muy bajos (por ejemplo, el crecimiento de microorganismos no se reduce a un grado sustancial) a niveles muy altos (es decir, puede superar 2 a 1000 veces la concentración del agente que erradica una población de flotación libre equivalente de los mismos microorganismos).

#### **(b) excipiente(s) opcional(es)**

**[0046]** En algunas realizaciones, la combinación de la invención puede comprender opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de excipientes adecuados se detallan anteriormente en la sección (I)(e).

**[0047]** La fracción en peso del (de los) excipiente(s) en la combinación puede ser aproximadamente el 98 % o menos, aproximadamente el 95 % o menos, aproximadamente el 90 % o menos, aproximadamente el 85 % o menos, aproximadamente el 80 % o menos, aproximadamente el 75 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, aproximadamente el 65 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos, aproximadamente el 55 % o menos, aproximadamente el 50 % o menos, aproximadamente el 45 % o menos, aproximadamente el 40 % o menos, aproximadamente el 35 % o menos, aproximadamente el 30 % o menos, aproximadamente el 25 % o menos, aproximadamente el 20 % o menos, aproximadamente el 15 % o menos, aproximadamente el 10 % o menos, aproximadamente el 5 % o menos, aproximadamente el 2 %, o aproximadamente el 1 % o menos del peso total de la combinación.

#### **(c) combinaciones sinérgicas preferidas**

**[0048]** Algunas combinaciones preferidas pueden comprender una fracción rica en fenoles derivada de una planta como se detalla en la sección (I) y cualquier de clindamicina, daptomicina, dicloxacilina, minociclina, oxacilina, ramoplanina, rifampina, triclosán o vancomicina. Otras combinaciones preferidas pueden comprender una mezcla de ácido elálgico y/o derivados de ácido elálgico y cualquiera de clindamicina, daptomicina, dicloxacilina, minociclina, oxacilina, ramoplanina, rifampina, triclosán o vancomicina.

#### **(III) Método de inhibición de la formación de una biopelícula**

**[0049]** Otro aspecto de la invención engloba un método de inhibición de la formación de una biopelícula. El método comprende poner en contacto una pluralidad de microorganismos de flotación libre con una composición polifenólica proporcionada en la sección (I) tal que se inhibe la formación de una biopelícula. El tipo de microorganismo y la localización de los microorganismos que se ponen en contacto con las composiciones polifenólicas de la invención pueden y variarán. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, parece que las composiciones polifenólicas inhiben o interfieren con la formación de biopelículas rompiendo la adhesión de las células de manera que se forma una biopelícula debilitada o dispersa. Así, el método descrito en el presente documento puede usarse profilácticamente para prevenir la formación de una biopelícula.

#### **(a) composiciones polifenólicas**

**[0050]** La composición descrita en la sección (I) es adecuada para su uso en el método de inhibición de la formación de biopelículas.

#### **(b) microorganismos**

**[0051]** Una variedad de microorganismos tienen la capacidad de formar biopelículas. Por ejemplo, las biopelículas pueden formarse por bacterias, arqueas, hongos, protozoos, algas y combinaciones de los mismos. Ejemplos de bacterias que pueden formar biopelículas incluyen *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio* y *Legionella*. Los hongos que pueden formar biopelículas incluyen, sin limitación,

*Candida*. En varias realizaciones, la biopelícula puede comprender tales como *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Legionella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* resistentes a metilicina, *Streptococcus mutans* o *Streptococcus sanguinis*. En una realización a modo de ejemplo, la biopelícula comprende *Staphylococcus aureus* o

5 *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina.

**[0052]** La localización de la pluralidad de microorganismos de flotación libre puede y variará. En algunas realizaciones, la pluralidad de microorganismos (o biopelícula) puede estar sobre una superficie o dentro de un sujeto (por ejemplo, un sujeto veterinario, un paciente sanitario, un trabajador sanitario o un trabajador de la

10 producción de alimentos). Por ejemplo, los microorganismos (o biopelícula) pueden estar sobre una superficie epitelial escamosa (por ejemplo, superficie de la piel), o una superficie de membrana mucosa (por ejemplo, superficies nasales, respiratorias o del tubo digestivo). Adicionalmente, los microorganismos (o biopelícula) pueden estar sobre la superficie de un órgano interno o tejido del sujeto, dentro de un órgano interno o tejido del sujeto, o sistémico al sujeto. Sujetos adecuados se detallan más adelante. En otras realizaciones, los microorganismos (o

15 biopelícula) pueden estar sobre una superficie de un dispositivo médico implantado. Dispositivos médicos adecuados se detallan más adelante. En todavía realizaciones adicionales, los microorganismos (o biopelícula) pueden estar sobre o dentro de un producto alimenticio, o un trozo de equipo usado en la preparación del producto alimenticio, como se detalla más adelante.

20 (i) sujetos

**[0053]** En algunas realizaciones, la pluralidad de microorganismos puede estar sobre una superficie o en el cuerpo de un sujeto. Por ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto veterinario. Ejemplos de sujetos veterinarios adecuados incluyen animales de compañía tal como gatos, perros, conejos, caballos, y roedores tales como jerbos; animales

25 agrícolas tales como vacas, ganado vacuno, cerdos, cabras, ovejas, caballos, ciervo, pollos y otras aves de corral; animales de zoológico tales como primates, elefantes, cebras, felinos grandes, osos y similares; y animales de investigación tales como conejos, ovejas, cerdos, perros, primates, ratones, ratas y otros roedores. Por ejemplo, la composición puede usarse para tratar infecciones de la piel, infecciones de tejido blando y/o mastitis en pacientes veterinarios tales como animales de compañía y/o animales agrícolas. El sujeto veterinario puede estar padeciendo

30 o estar diagnosticado con una afección que necesita tratamiento, o el sujeto veterinario puede tratarse profilácticamente.

**[0054]** En otras realizaciones, el sujeto puede ser un paciente sanitario humano. Ejemplos de pacientes sanitarios adecuados incluyen pacientes ambulatorios, pacientes de cirugía, pacientes de implantación médica, pacientes

35 hospitalizados, pacientes de cuidado a largo plazo, pacientes de residencia de ancianos, y similares. En otras realizaciones más, el sujeto puede ser un trabajador sanitario. Trabajadores sanitarios adecuados incluyen aquellos con acceso directo e indirecto a pacientes, equipo médico, instalaciones médicas, y similares.

**[0055]** En otras realizaciones más, el sujeto puede ser un trabajador de la producción de alimentos. Un trabajador

40 de la producción de alimentos engloba cualquier individuo con acceso a productos alimenticios frescos o procesados. Ejemplos incluyen trabajadores de restaurantes, preparadores de alimentos, trabajadores del procesamiento de alimentos, trabajadores de plantas de alimentos, trabajadores de granjas, etc.

**[0056]** En algunas realizaciones, el sujeto puede estar padeciendo o estar diagnosticado con una infección o

45 patología en el que el tratamiento con la composición inhibirá o prevendrá la formación de biopelículas. En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse profilácticamente con la composición de forma que se inhiba o prevenga la formación de biopelículas.

(ii) dispositivos médicos

50 **[0057]** En otras realizaciones, la pluralidad de microorganismos puede estar sobre una superficie de un dispositivo médico implantable. Por ejemplo, el dispositivo médico implantable puede ser un catéter. Ejemplos de catéteres adecuados incluyen catéteres intravasculares (tales como, por ejemplo, catéteres arteriales, catéteres venosos centrales, catéteres de hemodiálisis, catéteres periféricos y venosos), microbobinas de catéter endovascular,

55 catéteres de diálisis peritoneal, catéteres uretrales y puertos de acceso del catéter. En otra realización, el dispositivo implantable puede ser un dispositivo cardíaco. Dispositivos cardíacos adecuados incluyen prótesis endovasculares cardíacas, desfibriladores, válvulas del corazón, dispositivos de asistencia ventricular para el corazón, dispositivos de componentes OEM, marcapasos e hilos de conexión de marcapasos. En otra realización, el dispositivo médico implantable puede ser un dispositivo ortopédico. Ejemplos de dispositivos ortopédicos adecuados incluyen

60 artroplastias de rodilla, artroplastias de cadera, otras artroplastias, sustituciones de discos espinales, clavos ortopédicos, placas, tornillos, barras y componentes OEM ortopédicos. En todavía otras realizaciones, dispositivos médicos implantables adecuados incluyen tubos endotraqueales, tubos de alimentación nasogástrica, tubos de alimentación gástrica, injertos de hueso sintético, cemento óseo, piel sustituta biosintética, injertos vasculares, malla de hernia quirúrgica, filtro embólico, prótesis endovascular de uréter-renal-biliar, cabestrillos uretrales, balones de

65 derivación gástrica, marcapasos gástricos, bombas de insulina, neuroestimulantes, implantes de pene, implantes de

silicona de tejido blando, dispositivos anticonceptivos intrauterinos, implantes cocleares y dispositivos de restitución de la voz.

(iii) productos alimenticios

5

**[0058]** En realizaciones adicionales, la pluralidad de microorganismos puede estar sobre una superficie o dentro de un producto alimenticio, o una pieza de equipo usado en la preparación del producto alimenticio. Ejemplos de productos alimenticios adecuados incluyen pescado o alimento procesado. El alimento puede ser fresco, congelado, enlatado, secado, horneado, frito, procesado, fruta o basado en fruta, verdura o basado en verdura, grano o basado

10

en grano, cereal o basado en cereal, fruto seco o basado en fruto seco, lácteo o basado en lácteo, huevo o basado en huevo, carne o basado en carne, marisco o basado en marisco, alga o basado en alga, etc. También se incluye cualquier pieza de equipo usado en la preparación de un producto alimenticio. Ejemplos de equipo adecuado incluyen lavadores, secadoras, batidoras, picadoras, mezcladoras, homogeneizadores, prensas extrusoras, y similares.

15

**(c) puesta en contacto de los microorganismos de flotación libre**

**[0059]** El método comprende poner en contacto la pluralidad de microorganismos de flotación libre con una composición polifenólica descrita en la sección (I). En realizaciones en las que la pluralidad de microorganismos está sobre o dentro de un sujeto, la etapa de poner en contacto puede comprender administrar una preparación que comprende la composición polifenólica por vía oral, tópicamente (es decir, transdérmicamente o transmucosamente), o parenteralmente (por ejemplo, subcutáneamente, intradérmicamente, intravenosamente, intramuscularmente, o intraperitonealmente).

20

25

**[0060]** Las preparaciones para administración por vía oral generalmente contienen excipientes inertes, además del componente farmacéutico activo. Las preparaciones orales pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Excipientes comunes usados en tales preparaciones incluyen cargas/diluyentes farmacéuticamente compatibles tales como celulosa microcristalina, hidroxipropilmetilcelulosa, almidón, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol, fosfato de calcio dibásico, o carbonato cálcico; aglutinantes tales como ácido algínico, carboximetilcelulosa, celulosa microcristalina, gelatina, goma tragacanto o polivinilpirrolidona; disgregantes tales como ácido algínico, celulosa, almidón o polivinilpirrolidona; lubricantes tales como estearato de calcio, estearato de magnesio, talco, sílice o estearilfumarato de sodio; deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; aromatizantes tales como menta, salicilato de metilo o aromatizante cítrico; colorantes; y conservantes tales como antioxidantes (por ejemplo, vitamina A, vitamina C, vitamina E o palmitato de retinilo), ácido cítrico, o citrato de sodio. Las preparaciones orales también pueden administrarse como suspensiones acuosas, elixires o jarabes. Para éstas, el principio activo puede combinarse con diversos edulcorante o aromatizantes, colorantes, y, si así se desea, emulsionantes y/o agentes de suspensión, además de diluyentes tales como agua, etanol, glicerina, y combinaciones de los mismos.

30

35

40

**[0061]** Para administración tópica (por ejemplo, transdérmica o transmucosa), en la preparación se incluyen generalmente penetrantes apropiados a la barrera que va a atravesarse. La administración transmucosa puede llevarse a cabo mediante el uso de esprays nasales, esprays de aerosol, comprimidos, o supositorios, y la administración transdérmica puede ser mediante pomadas, bálsamos, geles, parches o cremas, como se conoce generalmente en la técnica.

45

**[0062]** Para administración parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), la preparación puede ser una disolución acuosa o una basada en aceite. Las disoluciones acuosas pueden incluir un diluyente estéril tal como agua, solución salina, un poliol farmacéuticamente aceptable tal como glicerol, propilenglicol, u otros disolventes sintéticos; un agente antibacteriano y/o antifúngico tal como alcohol bencílico, metilparabeno, clorobutanol, fenol, timerosal y similares; un antioxidante tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; un agente quelante tal como ácido etilendiaminatetraacético; un tampón tal como acetato, citrato o fosfato; y/o un agente para el ajuste de tonicidad tal como cloruro sódico, dextrosa, o un polialcohol tal como manitol o sorbitol. El pH de la disolución acuosa puede ajustarse con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Las disoluciones o suspensiones basadas en aceite pueden comprender además sésamo, cacahuete, aceite

50

55

de oliva o aceite mineral.

**[0063]** Adicionalmente, la etapa de poner en contacto puede comprender aclarar, limpiar, lavar, etc., la superficie de la piel de un sujeto con una preparación que comprende la composición polifenólica. En realizaciones adicionales, la etapa de poner en contacto puede comprender un lavado quirúrgico o antiséptico, en el que una cavidad del cuerpo, órgano o tejido de un sujeto quirúrgico se lava, aclara o pulveriza con una preparación que comprende la composición polifenólica.

60

**[0064]** En otras realizaciones en las que la pluralidad de microorganismos está sobre una superficie de un objeto (por ejemplo, dispositivo médico, producto alimenticio o equipo de preparación de alimentos), la etapa de poner en contacto puede comprender recubrir la(s) superficie(s) del objeto con una preparación que comprende la

65

composición polifenólica, en la que la composición polifenólica se eluye del recubrimiento durante un periodo de tiempo. El recubrimiento que cubre el objeto puede comprender un hidrogel (es decir, un gel que comprende polímeros solubles en agua) de forma que la elución de la composición polifenólica se produzca durante un periodo de tiempo prolongado. El periodo de tiempo durante el que la composición eluye del recubrimiento y se pone en contacto con la pluralidad de microorganismos de flotación libre puede oscilar de aproximadamente varios días a más de varios meses. En otras realizaciones, la etapa de poner en contacto puede comprender aclarar, sumergir, pulverizar, etc., la(s) superficie(s) del objeto con una preparación que comprende la composición polifenólica.

**[0065]** En general, el contacto con las composiciones polifenólicas inhibe o retarda la formación de una biopelícula. Aquellos expertos en la materia están familiarizados con técnicas para evaluar la presencia de una biopelícula. Por ejemplo, como se detalla en el Ejemplo 3, una biopelícula puede evaluarse por tinción con un colorante tal como cristal violeta, mientras que las células de flotación libre del (de los) mismo(s) organismo(s) no se tiñen con el colorante. La formación de biopelículas puede inhibirse en una cantidad que oscila de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 99 % con respecto al de microorganismos de control no tratados. La formación de biopelículas puede inhibirse por al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con microorganismos correspondientes no puestos en contacto con la composición polifenólica. En realizaciones preferidas, la formación de biopelículas puede inhibirse al menos el 50 % con respecto a microorganismos de control no tratados. En una realización a modo de ejemplo, la formación de biopelículas puede inhibirse por al menos el 90 % con respecto a microorganismos de control no tratados.

#### ***(IV) Método de reducción del crecimiento de una biopelícula establecida***

**[0066]** Otro aspecto de la invención engloba un método de inhibición del crecimiento de una biopelícula establecida. El método comprende poner en contacto la biopelícula con las combinaciones descritas en la sección (II) de forma que se reduzca el número de microorganismos en la biopelícula. En general, el contacto con una combinación que comprende un fitoquímico(s) fenólico(s) y un agente(s) antimicrobiano(s) es sinérgico porque el grado de inhibición del crecimiento microbiano es más que aditivo de la actividad de cualquiera del (de los) fitoquímico(s) o el (los) agente(s) antimicrobiano(s) solo(s).

**[0067]** Ejemplos de microorganismos adecuados que son capaces de formar biopelículas se detallan anteriormente en la sección (III)(b).

##### **(a) combinaciones**

**[0068]** Combinaciones adecuadas para su uso en el método se detallan en la sección (II) anterior. En algunas realizaciones preferidas, la combinación puede comprender al menos una composición de polifenol derivada de una planta como se detalla en la sección (I) y al menos un agente antimicrobiano.

##### **(b) puesta en contacto de la biopelícula**

**[0069]** El método comprende poner en contacto la biopelícula con la combinación detallada en la sección (II). La biopelícula puede estar presente sobre una superficie o dentro de un sujeto como se detalla anteriormente en la sección (III)(b)(i), un dispositivo médico como se detalla en la sección (III)(b)(ii), o un producto alimenticio/equipo de preparación de alimentos como se detalla en la sección (III)(b)(iii).

**[0070]** Medios para poner en contacto el sujeto u objeto de interés se detallan anteriormente en la sección (III)(c).

**[0071]** La biopelícula puede ponerse en contacto con los componentes de la combinación simultáneamente, que es como una preparación individual. Alternativamente, la biopelícula puede ponerse en contacto con los componentes de la combinación secuencialmente. Por ejemplo, la biopelícula puede ponerse en contacto con la composición polifenólica como se detalla en la sección (I), luego ponerse en contacto con el (los) agente(s) antimicrobiano(s). Alternativamente, la biopelícula puede ponerse en contacto primero con el (los) agente(s) antimicrobiano(s) y luego ponerse en contacto con la composición polifenólica como se detalla en la sección (I).

**[0072]** La duración del contacto entre la biopelícula y las combinaciones descritas en la sección (II) puede y variará. En diversas realizaciones, la duración del contacto puede oscilar de varios días a más de varios meses. Por ejemplo, la duración del contacto puede ser aproximadamente 3 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 3 meses, o más de 3 meses.

**[0073]** El contacto con las combinaciones descritas en la sección (II) inhibe el crecimiento de biopelícula, reduciendo el número de microorganismos en la biopelícula. En algunos aspectos de la invención, el número de microorganismos se reducen en una cantidad que oscila del 1 % al 99 % en comparación con microorganismos de

control no tratados. En algunos aspectos de la invención, el número de microorganismos puede reducirse al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con microorganismos correspondientes no puestos en contacto con la combinación que comprende la composición polifenólica y el agente antimicrobiano.

**[0074]** Además, la actividad de las combinaciones puede ser superior a la suma de las actividades de cualquier componente solo. Por ejemplo, la FIG. 9 compara el número de células viables cuando la biopelícula se pone en contacto con un antimicrobiano solo, la composición polifenólica sola y la combinación del antimicrobiano y la composición polifenólica.

**[0075]** En algunas realizaciones, la combinación de la composición polifenólica y el antimicrobiano reduce el número de células viables una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo. En otras realizaciones, la combinación reduce el número de células viables aproximadamente 2 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo, o aproximadamente 4 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo, o aproximadamente 6 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo, o aproximadamente 8 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo, o aproximadamente 10 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo. En realizaciones preferidas, la combinación reduce el número de células viables aproximadamente 5 unidades logarítmicas con respecto al antimicrobiano solo.

**[0076]** En otro aspecto, la combinación reduce el número de células viables una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola. En otras realizaciones, la combinación reduce el número de células viables aproximadamente 2 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola, o aproximadamente 4 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola, o aproximadamente 6 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola, o aproximadamente 8 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola, o aproximadamente 10 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola. En realizaciones preferidas, la combinación reduce el número de células viables aproximadamente 5 unidades logarítmicas con respecto a la composición polifenólica sola.

**[0077]** En algunas realizaciones, el contacto con la combinación proporcionada en la sección (II) puede reducir significativamente el número de microorganismos aproximadamente 1 a 3 días. En otras realizaciones, el número de microorganismos puede reducirse significativamente después de 3 a 5 días de contacto. En otras realizaciones más, puede durar hasta 5 a 7 días de contacto con las combinaciones para reducir significativamente el número de microorganismos en la biopelícula. En realizaciones adicionales, puede durar más de aproximadamente 7 días de contacto con las combinaciones para reducir significativamente el número de microorganismos en la biopelícula.

#### 40 Definiciones

**[0078]** Para facilitar el entendimiento de la invención se definen los siguientes términos.

**[0079]** El término "biopelícula", como se usa en el presente documento, se refiere a un agregado de microorganismos en el que las células se adhieren entre sí y/o a una superficie. Estas células adherentes se incorporan frecuentemente dentro de una matriz auto-producida de sustancia polimérica extracelular. Los microorganismos que comprenden una biopelícula pueden incluir bacterias, arqueas, hongos, protozoos, algas o combinaciones de los mismos.

**[0080]** El término "fracción rica en fenoles", como se usa en el presente documento, se refiere a una fracción enriquecida en compuestos fenólicos y/o compuestos polifenólicos y sus derivados.

**[0081]** El término "sinérgico" como en "efecto sinérgico" se refiere a un efecto en el que dos o más agentes trabajan en sinergia para producir un efecto más que aditivo de los efectos de cada agente independientemente.

**[0082]** Cuando se introducen elementos de la presente invención o la(s) realización (realizaciones) preferida(s) de los mismos, los artículos "un", "una", "el", "la" y "dicho" pretenden significar que hay uno o más de los elementos. Los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" pretenden ser incluyentes y significan que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

**[0083]** Habiendo descrito la invención en detalle, será evidente que son posibles modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención definido en las reivindicaciones adjuntas.

#### Ejemplos

65

**[0084]** Los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la materia que las técnicas desveladas en los ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención. Aquellos expertos en la materia deben, sin embargo, en vista de la presente divulgación, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y todavía obtener un resultado igual o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, por tanto toda la materia expuesta debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

**Ejemplo 1: Preparación de fracción rica en fenoles de extracto de raíz de *Rubus ulmifolius***

10

**[0085]** El siguiente ejemplo detalla la purificación de fracciones ricas en fenoles de un extracto de etanol de raíces de *Rubus ulmifolius*. *R. ulmifolius* es un arbusto silvestre que pertenece a la familia de la rosa que es originaria del Mediterráneo. Las partes de la planta se han usado tradicionalmente para tratar afecciones de la piel. Por ejemplo, se aplican tópicamente hojas frescas con grasa de cerdo en el tratamiento de infecciones de la piel y de tejido blando y se usa una decocción de las raíces como lavado para prevenir la pérdida de pelo. En un estudio de selección reciente (Quave et al., 2008, Journal of Ethnopharmacology 118:418-428), extractos etanólicos en bruto de 104 plantas italianas se evaluaron para su potencial anti-biopelícula y se encontró que extractos de *R. ulmifolius* y otras nueve especies mostraron alguna promesa.

**[0086]** Adquisición de materiales botánicos. Se recogieron muestras a granel de *R. ulmifolius* Schott. (Rosaceae) de poblaciones silvestres en agosto de 2009 en el pueblo de Ginestra, Italia. Se siguieron los procedimientos de la OMS de 2003 Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices for Medicinal Plants para la recogida e identificación de especímenes a granel y de muestra en Potenza, Italia. Los especímenes se identificaron usando la flora italiana patrón y la identificación se confirmó en HLUC. Toda la tierra y otros contaminantes (es decir, insectos, otras especies de planta, etc.) se eliminaron de cada muestra. Los materiales de planta se separaron por parte (tallos, hojas, raíces, frutos), se cortaron en trozos pequeños y se secaron al aire. Tras el secado, los materiales se envasaron en bolsas de plástico con paquetes de sílice y se sellaron a vacío. Los materiales de planta se exportaron a EE.UU. bajo el permiso de USDA PDEP-09-00228 para evaluación fitoquímica y bioensayos.

**[0087]** Aislamiento de la fracción activa. Se molieron raíces secadas al aire (1 kg) de *R. ulmifolius* en un polvo fino y a continuación se extrajeron con EtOH al 95 % (2 X 10 l) a temperatura ambiente durante 72 horas con agitación constante. Los extractos filtrados se combinaron, se concentraron a presión reducida a temperaturas < 45 °C y se liofilizaron. El extracto liofilizado se resuspendió en agua y se repartió sucesivamente con: hexano, acetato de etilo y butanol. Los extractos se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron a presión reducida, se liofilizaron y se probaron para actividad. El extracto más activo (butanol) se sometió a cromatografía en columna usando gel de sílice (0,015-0,040 µm de tamaño de partícula, EMD Chemicals, Gibbstown, NJ) y las fracciones se recogieron después de eluir sucesivamente con mezclas de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10) seguido de MeOH al 100 % y 100 % de H<sub>2</sub>O (pureza 18Ω). La **FIG. 1** presenta un diagrama de flujo del procedimiento de purificación. Las fracciones se secaron, se pesaron y se probaron para actividad (es decir, inhibición de la formación de biopelículas esencialmente como se detalla en el Ejemplo 2). Se encontró que la fracción 40:60 (designada 220D-F2) era la más activa y se eligió para estudio adicional.

**[0088]** La fracción activa (220D-F2) se caracterizó por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas de tiempo de vuelo (CL-EM Q-ToF). La separación de componentes se logró sobre una columna µBondapak C-18 de 10 µm (300 mm x 3,9 mm) con una fase móvil isocrática que consistió de 79 % de H<sub>2</sub>O, 12 % de acetonitrilo, 8 % de 2-propanol y 1 % de ácido fórmico. La velocidad de flujo fue 1,0 ml/min. La detección se realizó usando un microespectrómetro de masas Micromass Q-ToF (Waters/Micromass, Beverly, MA). El instrumento se operó en el modo de electropulverización de ión negativo. La temperatura de la fuente y de desolvatación se establecieron a 140 y 350 °C, respectivamente. El voltaje capilar de ESI fue 3 kV y el voltaje del cono fue 35 V. La energía de colisión se estableció a 5 eV. Se usó ácido fosfórico (0,1 %) en acetonitrilo/metanol (50/50) para la calibración de masa y como compuesto de masa conocida. El instrumento se calibró durante un intervalo limitado (m/z 80 - 1000).

**[0089]** Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Se enumeran cepas de *Staphylococcus aureus* en la Tabla 1. Las cepas se cultivaron a 37 °C en caldo de Mueller-Hinton ajustado por cationes (CAMHB) para los ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) y en caldo de soja triptica (TSB) complementado con 3,0 % de NaCl y 0,25 % de dextrosa (medio de biopelícula, BM) para ensayos de biopelícula. Para todos los ensayos se usaron cultivos durante la noche cultivados en el medio apropiado para inocular medio fresco a una densidad celular inicial de 5 x 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. La densidad celular se confirmó por recuento de colonias de alícuotas tomadas inmediatamente tras la inoculación de la cepa de prueba. Las cepas de prueba incluyeron cepas aisladas clínicas primarias y, cuando estuvieron disponibles, mutantes isogénicos en los que el regulador accesorio estafilocócico (*sarA*) se había inactivado como se describe previamente (Beenken et al. 2010, PLoS ONE, 5:e10790).

**[0090]** Determinación de CMI y CMB. La CMI y CMB de la fracción activa (220D-F2) se determinaron siguiendo los métodos de microdilución de caldo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Brevemente, se inocularon

cepas de prueba en 0,1 ml de CAMHB que contenía 220D-F2 a concentraciones que oscilaban de 0,138-4 mg/ml (0,138 - 4 % de excipiente en disolución). Para la CMI, la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) se evaluó inmediatamente después de la inoculación y de nuevo después de 18 h usando un lector de microplacas Biotek Synergy II. Las correcciones para el color del extracto, que pueden alterar la salida de DO, se hicieron como se describe previamente (Quave et al., 2008, arriba). La CMI se definió como la concentración más baja que inhibió el crecimiento a un nivel  $\geq 90$  % (para CMI<sub>90</sub>) o  $\geq 50$  % (para CMI<sub>50</sub>) que la observada con el control no tratado. La CMB se determinó tomando recuentos de colonias de alícuotas tomadas de cada pocillo después de 24 h y se definió como la concentración más baja a la que la densidad inicial de células viables se redujo  $\geq 90$  % (para CMB<sub>90</sub>) o  $\geq 50$  % (para CMB<sub>50</sub>) por comparación con el control no tratado. Además, el impacto de una dosis sub-CMI (0,2 mg/ml) de 220D-F2 sobre el crecimiento de UAMS-1 se evaluó tomando recuentos de células a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación y comparando éstos con los recuentos de células obtenidos con tanto UAMS-1 como su mutante *sarA* isogénico (UAMS-929) en ausencia de exposición a 220D-F2. Para estos experimentos, se cultivaron cultivos de 10 ml a 37 °C en matraces Erlenmeyer de 25 ml en BM con agitación constante (200 rpm).

15 **[0091]** *Evaluación de la formación de biopelículas.* Se evaluó la formación de biopelículas usando un ensayo en placa de microtitulación como se describe previamente (Beenken et al., 2003, Infection and Immunity 71:4206-11), excepto que se incluyeron las diluciones sucesivas dobles (0,0125 - 0,4 mg/ml, 0,0125 - 0,4 % de excipiente en disolución) de 220D-F2 en el BM. Los controles para cada experimento fueron la cepa no mutante y su mutante *sarA* isogénico ensayado en ausencia de 220D-F2. La concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB) se definió como la concentración más baja a la que 220D-F2 inhibió la formación de biopelículas a un nivel  $\geq 90$  % (para CMIB<sub>90</sub>) o  $\geq 50$  % (para CMIB<sub>50</sub>) que la observada con la cepa parental en ausencia de 220D-F2.

25 **[0092]** *Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de biopelículas estáticas.* Se cultivaron dos cepas (UAMS-1 y la cepa aislada de USA300 UAMS-1782) y sus mutantes *sarA* isogénicos (UAMS-929 y UAMS-1804) en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar 3603, Corning Life Sciences) como se ha descrito anteriormente. Donde se indique, se añadió 220D-F2 a los pocillos en el momento de la inoculación. Después de 20 horas, se aspiraron los contenidos de los pocillos y los pocillos se lavaron suavemente tres veces con 0,85 % (peso/volumen) de NaCl. La biopelícula adherente se tiñó entonces con tinción LIVE/DEAD (Invitrogen) a temperatura ambiente en la oscuridad durante 18 minutos. Después de eliminar la tinción, los pocillos se lavaron suavemente con 0,85 % de NaCl antes de recoger las imágenes de CLSM usando un sistema confocal de barrido LSM 510 Meta de Zeiss y microscopio invertido. La fluorescencia de SYTO 9 se detectó por excitación a 488 nm y emisión recogida con un filtro paso banda de 500-530. Todas las secciones de z se recogieron a intervalos de 4  $\mu$ m usando una lente de objetivo 10X. Se seleccionó una sección de 0,9  $\times$  0,9 mm de biopelícula del centro del pocillo para cada imagen. La adquisición y el procesamiento de imágenes se realizó usando LSM Imagen Browser (Carl Zeiss). Se emplearon parámetros de adquisición idénticos para todas las muestras.

**[0093]** *Análisis estadístico.* Se realizó una prueba por parejas basada en pruebas de la t como se organiza en el software estadístico Sigma Stat<sup>®</sup> versión 2 (SPSS, Inc) con valores de P < 0,05 considerados significativos.

40 **[0094]** *Resultados.* Técnicas de fraccionamiento guiadas por el bioensayo produjeron el aislamiento de la fracción 220D-F2 de las raíces de *R. ulmifolius*. El porcentaje de rendimiento de esta fracción fue aproximadamente el 0,329 % de peso de raíz seca. En otras palabras, por cada kilogramo de raíz extraída pueden extraerse 3,29 gramos de esta fracción. La potencia del extracto aumentó (como se evidencia reduciendo la concentración total necesaria para inhibir la formación de biopelículas) tras el reparto y fraccionamiento (véase la **FIG. 2**). Por ejemplo, en la cepa aislada de USA-200 UAMS-1, la CMIB<sub>90</sub> del extracto etanólico en bruto fue 0,2 mg/ml. Cuando este extracto se separó por técnicas de reparto en disolvente, el extracto de hexano fue inactivo, la actividad en el extracto de acetato de etilo disminuyó (CMIB<sub>90</sub>: 0,3 mg/ml), la actividad en el extracto de butanol aumentó (CMIB<sub>90</sub>: 0,1 mg/ml) y la actividad en el extracto de agua no varió (CMIB<sub>90</sub>: 0,2 mg/ml). Así, el extracto más activo (butanol) se seleccionó para fraccionamiento adicional por cromatografía en columna. Basándose en las pruebas de separación con cromatografía en capa fina (datos no mostrados), se seleccionó el esquema de disolventes de un gradiente creciente de MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para el fraccionamiento del extracto de butanol (véase la **FIG. 1**). La principal actividad fue evidente en las fracciones 2-4, en las que CMIB<sub>90</sub> fue 0,05 mg/ml. Poca o ninguna actividad fue evidente en las otras fracciones.

55 **[0095]** CL-EM-Q/ToF dio un cromatograma con varios picos distintos, dos de los cuales se ha determinado que son glucósidos fenólicos o derivados de los mismos (**FIG. 3**). Se ha identificado que el pico A tiene la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>14</sub>. Posibles compuestos que tienen esta fórmula incluyen D-glucosa, 3,4-[(1R)-4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato] cíclico; ácido L-ascórbico, 6,6'-(1,4-bencenodicarboxilato); D-glucosa, 3,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico, (S)-; D-glucosa, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico, (R)-; 4,7-metanodibenzo[f,h][1,4]dioxecin-5,10-diona, 7,8-dihidro-1,2,3,12,13,14,15-heptahidroxi-8-(1,2,3-trihidroxipropil)-, estereoisómero; [ $\beta$ -D-glucopiranososa, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico;  $\alpha$ -D-glucopiranososa, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; D-glucosa, 2,4-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; D-glucosa, 4,6-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato] cíclico; D-glucosa, 3,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico, (R)-; D-glucosa, 2,3-[(1S)-4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato] cíclico; D-

glucosa, 3,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; D-glucosa, 4,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; D-glucosa, 4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato cíclico; D-glucosa, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; glucopiranosas, éster cíclico con ácido (6-carboxi-2,4-dihidroxi-3-oxo-1,4-ciclohexadien-1-il)gálico; glucopiranosas, 4,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico, D-; β-D-glucopiranosas, 4,6-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; D-glucopiranosas, 2,3-(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico; y β-D-glucopiranosas, mono(4,4',5,5',6,6'-hexahidroxi[1,1'-bifenil]-2,2'-dicarboxilato) cíclico. Se ha identificado que el pico C tiene la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>12</sub>. El pico se ha identificado provisionalmente como ramnósido del ácido elágico (es decir, [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2-[(6-desoxi-α-L-manopiranosil)oxi]-3,7,8-trihidroxi-). Otras posibilidades incluyen [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2,3-dihidroxi-8-metoxi-7-(β-D-xilopiranosiloxi)-; ácido 2-butenodioico, 2-[(2R,3R)-3,4-dihidro-5,7-dihidroxi-3-[(3,4,5-trihidroxibenzoil)oxi]-2H-1-benzopirano-2-il]-, (2Z)-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2-(α-L-arabinofuranosiloxi)-3,7-dihidroxi-8-metoxi-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2,8-dihidroxi-3-metoxi-7-(β-D-xilopiranosiloxi)-; [1]benzopirano[5,4,3-cde][1]benzopirano-5,10-diona, 2,8-dihidroxi-3-metoxi-7-(D-xilopiranosiloxi)-; 5H,13H-bis[1,3]dioxolo[4,5]furo[3,2-h:2',3'-s][1,4,7,11,14,17]hexaoxacicloeicosina; ácido 5H-benzociclohepteno-8,9-dicarboxílico, 2,3,4-tris(acetiloxi)-6-hidroxi-5-oxo-, éster 8-metilico; y 1,4-naftalenodiona, 2,3,5,6,8-pentaquis(acetiloxi)-. Los picos B y D dieron señales más débiles y no se han identificado posibles constituyentes.

**Ejemplo 2: Actividad profiláctica anti-biopelícula de la fracción rica en fenoles**

[0096] Se determinaron la CMI y la MDC de la fracción activa 220D-F2 esencialmente como se detalla anteriormente en el Ejemplo 1. Se evaluó la actividad profiláctica de 220D-F2 para prevenir la formación de biopelículas usando el ensayo en placa de microtitulación esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. La actividad profiláctica de esta fracción también se evaluó usando un modelo de catéter *in vitro*. Para esto, secciones de catéter de 1 cm se inocularon con UAMS-1 en presencia de BM que contenía 220D-F2 (0,2 mg/ml). Después de un periodo de incubación de 24 h en presencia de la fracción activa, los catéteres se procesaron para recuentos de placa como se ha descrito anteriormente (véase el Ejemplo 1).

[0097] La actividad de 220D-F2 se evaluó contra cada una de las 15 cepas aisladas clínicamente genótipicamente diversas de *S. aureus*. La Tabla 1 presenta los resultados.

**TABLA 1.** Actividad de 220D-F2 (mg/ml) contra cepas no mutantes de *Staphylococcus aureus*.

Tipo USA	I.D. de cepa de no mutante	I.D. de cepa de mutante <i>sarA</i>	CMI <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>	CMIB <sub>50</sub>	CMIB <sub>90</sub>
100	UAMS-1893	UAMS-1941	0,38	0,53	0,53	0,74	0,1	0,2
200	UAMS-1	UAMS-929	0,38	0,53	0,74	1,04	0,05	0,05
	UAMS-270	-	0,38	0,53	1,46	2,04	0,1	0,2
	UAMS-601	UAMS-950	0,53	0,74	1,46	2,04	0,05	0,1
	UAMS-1894	UAMS-1945	0,38	0,53	0,74	1,04	0,05	0,1
300	UAMS-1625	UAMS-1653	0,38	0,53	0,53	0,74	0,05	0,1
	UAMS-1782	UAMS-1804	0,38	0,53	0,38	0,53	0,05	0,1
	UAMS-1790	UAMS-1796	0,38	0,53	0,38	0,53	0,05	0,1
400	UAMS-1039	UAMS-1938	0,53	0,74	0,53	0,74	0,1	0,2
500	UAMS-1895	UAMS-1942	0,74	1,04	1,04	1,46	0,1	0,2
600	UAMS-1896	UAMS-1943	0,53	0,74	0,53	1,04	0,1	0,2
700	UAMS-1897	-	0,53	0,74	0,53	1,04	0,1	0,2
800	UAMS-1898	UAMS-1944	0,53	0,74	1,46	2,04	0,1	0,2
1000	UAMS-1899	UAMS-1930	0,53	0,74	1,04	1,46	0,1	0,3
1100	UAMS-1900	UAMS-1931	0,38	0,53	0,74	1,46	0,05	0,1

[0098] La CMI<sub>90</sub> para las 15 cepas osciló de 0,53-1,04 mg/ml, la CMB<sub>90</sub> osciló de 0,53-2,04 mg/ml y la CMIB<sub>90</sub> osciló de 0,05-0,3 mg/ml. Así, la CMIB<sub>90</sub> definida para cada cepa fue en todos los casos al menos 2 veces inferior a la CMI<sub>90</sub> y al menos 4 veces inferior a la CMB<sub>90</sub>. Además, una curva de crecimiento establecida basada en el recuento viable durante 24 h confirmó que, mientras que la fracción activa retrasó la entrada en la fase de crecimiento exponencial durante ~2 horas, los cultivos con y sin 220D-F2 alcanzaron la misma densidad en el plazo de 12 h y mantuvieron los mismos recuentos de células durante toda la fase de crecimiento estacionario (FIG. 4). Estos hallazgos sugieren que 220D-F2 inhibe la formación de biopelículas de un modo que es independiente de su actividad bacteriostática o bactericida.

**[0099]** La adición de 220D-F2 inhibió la formación de biopelículas en un modo dependiente de la concentración en las 15 cepas aisladas de *S. aureus* examinadas (véase la **FIG. 5**). El grado de inhibición fue comparable al observado con los mutantes *sarA* isogénicos a concentraciones de tan solo 0,1 mg/ml y, en algunos casos, 0,05 mg/ml. Esto se confirmó por microscopía confocal demostrando que 220D-F2 inhibió la formación de biopelículas a un grado comparable a mutantes *sarA* isogénicos en tanto UAMS-1 como la cepa aislada de USA300 UAMS-1782 (**FIG. 6**). Más específicamente, las cepas no mutantes sin tratar formaron biopelículas relativamente uniformes que oscilan de 88-92  $\mu\text{m}$  de espesor mientras que los mutantes *sarA* isogénicos formaron biopelículas muy dispersas con algunos grupos aislados de células adherentes. Las cepas no mutantes tratadas con 220D-F2, como los controles de *sarA* no tratados, también formaron biopelículas muy dispersas como se evalúan por microscopía confocal a concentraciones de tan solo 0,05 mg/ml.

**[0100]** La inhibición de la formación de biopelículas en el ensayo de catéter se evaluó comparando el número de bacterias recuperadas de catéteres colonizados con UAMS-1 en presencia o ausencia de 220D-F2. Fue que el número total de células viables adherentes a catéteres tras el tratamiento con 220D-F2 durante la colonización fue significativamente reducido por comparación con el control no tratado ( $P < 0,05$ ) y comparable al número observado con el mutante *sarA* isogénico (**FIG. 7**). Aunque la actual reducción en el número de células adherentes fue modesta ( $1,23 \times 10^6$  UFC/catéter en presencia de 220D-F2 frente a  $1,34 \times 10^7$  UFC/catéter en el control no tratado), el trabajo previo que comparó UAMS-1 con su mutante *sarA* isogénico demostró que un nivel de inhibición similar fue suficiente para mejorar la respuesta terapéutica de una infección asociada a biopelícula a terapia antimicrobiana bajo condiciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Weis et al., 2009a, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:4096-4102).

### **Ejemplo 3: Actividad de la fracción rica en fenoles contra la biopelícula establecida**

**[0101]** El siguiente ejemplo detalla la incapacidad de la fracción activa 220D-F2 para romper una biopelícula establecida, pero detalla la actividad sinérgica de la fracción activa y un antibiótico para limitar el crecimiento de célula incorporada en una biopelícula establecida. Se usaron ensayos de catéter *in vitro* para evaluar la viabilidad celular de la biopelícula.

**[0102]** Ensayos de catéter *in vitro*. Se cultivó UAMS-1 sobre segmentos de catéter de 1 cm como se describe previamente (Weiss et al., 2009b, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:2475-2482). Después de 24 h, el medio BM se sustituyó con medio BM que contenía 220D-F2 (0,2 mg/ml) y/o daptomicina. La concentración de daptomicina usada en estos experimentos fue 10 veces superior (10  $\mu\text{g/ml}$ ) a la CMI en el punto de rotura (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ) definida para una cepa sensible a daptomicina de *S. aureus* por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). El medio se sustituyó en su totalidad a intervalos de 24 h durante 7 días. La respuesta terapéutica de UAMS-1 a daptomicina en presencia de 220D-F2 se evaluó por comparación con UAMS-929 cultivada en ausencia de 220D-F2, pero expuesta a daptomicina como se describe previamente (Weiss et al., 2009a, 2009b, arriba). Específicamente, los grupos de tratamiento empleados para estos experimentos fueron 1) UAMS-1 con 0,2 % de DMSO como control de excipiente, 2) UAMS-1 con 0,2 mg/ml de 220D-F2 en DMSO, 3) UAMS-1 con 0,01 mg/ml de daptomicina, 4) UAMS-1 con 0,2 mg/ml de 220D-F2 y 0,01 mg/ml de daptomicina, 5) UAMS-929 con 0,2 % de control de excipiente en DMSO y 6) UAMS-929 con 0,01 mg/ml de daptomicina. Después de cada intervalo de 24 h, los catéteres se retiraron de cada grupo de tratamiento y se aclararon con PBS antes de eliminar las bacterias para los recuentos de placa como se describe previamente (Weiss et al., 2009a, 2009b, arriba).

**[0103]** Este ensayo también se usó para evaluar la actividad profiláctica de 220D-F2. En este caso, los compuestos de prueba se añadieron al BM en el momento de la inoculación en vez de después de un periodo de colonización de 24 h. Después de la incubación de 24 h en presencia de 220D-F2, los catéteres se procesaron para recuentos de placa como se ha descrito anteriormente. Para evaluar la respuesta a terapia complementaria tras la profilaxis (220D-F2 presente durante la colonización), se realizó un experimento final en el que los catéteres se expusieron a 220D-F2 durante la colonización y a continuación se expusieron a los mismos grupos de tratamiento descritos anteriormente empezando 24 horas después de la inoculación.

**[0104]** Resultados. Estos resultados demuestran que cuando 220D-F2 se añadió a una biopelícula previamente establecida (24 h), no se produjo rotura incluso después de 7 días de exposición consecutivos (**FIG. 8A**). Así, aunque 220D-F2 fue eficaz en interrumpir inicialmente la unión y la formación de biopelículas (véase el Ejemplo 2), fue ineficaz en romper una biopelícula establecida. Sin embargo, dada su ausencia relativa de propiedades bacteriostáticas o bactericidas, se exploró la posibilidad de sinergia entre 220D-F2 y antibióticos convencionales en romper una biopelícula establecida.

**[0105]** Para esto, las pruebas se realizaron usando 0,2 mg/ml de 220D-F2 junto con daptomicina a una concentración de 10X la CMI en el punto de rotura definida para una cepa sensible a daptomicina de *S. aureus* (1,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Estas pruebas revelaron que la combinación de 220D-F2 y daptomicina fue más eficaz que cualquier agente solo (**FIG. 8A**). Esta diferencia fue la más evidente en el día 7, presentando catéteres expuestos a tanto 220D-F2 como daptomicina recuentos promedio de colonias de  $3,37 \times 10^3$  UFC/catéter y aquellos expuestos a daptomicina solo presentaron recuentos de colonias de  $1,0 \times 10^7$ . Sin embargo, a pesar de esta reducción de casi 5 logaritmos,

ninguno de estos catéteres expuesto a tanto 220D-F2 como a daptomicina se depuró de todas las células viables. Cuando los catéteres se colonizaron en presencia de 220D-F2, se formó una biopelícula debilitada. La exposición a tanto 220D-F2 como a daptomicina produjo números reducidos de células en el día 1 (**FIG. 8B**). Además, uno de los tres catéteres se depuró de todas las células adherentes cuando se trató con tanto 220D-F2 como daptomicina en los días 2 y 4, y dos de los tres catéteres se depuraron en los días 3, 5, 6 y 7.

**Ejemplo 4: Combinaciones de fracción rica en fenoles y antibióticos limitan el crecimiento de biopelícula establecida**

10 **[0106]** Se examinó en más detalle la actividad sinérgica de la fracción rica en fenoles y los antibióticos adicionales. Se usó un modelo de catéter para la rotura de una biopelícula establecida (esencialmente como se detalla en el Ejemplo 3) para evaluar la capacidad terapéutica de 220D-F2 en eliminar una biopelícula establecida como terapia complementaria a los antibióticos a 1X y 10X la CMI en el punto de rotura establecida por CLSI.

15 **[0107]** Los catéteres fueron colonizados con UAMS-1 en ausencia de cualquier extracto. Después de 24 horas, los catéteres se expusieron a 220D-F2 (200 mg/l); antibiótico a 1X la CMI en el punto de rotura; antibiótico a 1X la CMI en el punto de rotura + 200 mg/l de 220D-F2; antibiótico a 10X la CMI en el punto de rotura; antibiótico a 10X la CMI en el punto de rotura + 200 mg/l de 220D-F2. Los antibióticos probados fueron daptomicina, clindamicina, vancomicina y oxacilina.

20 **[0108]** Estos experimentos revelaron que hubo una reducción de biopelícula en catéteres tratados con tanto 220D-F2 como antibiótico en todos los casos examinados. Los resultados confirman aquellos presentados anteriormente en el Ejemplo 3 de que la fracción rica en fenoles sola no afecta el crecimiento de una biopelícula establecida. La **FIG. 9A** presenta el crecimiento celular en la biopelícula de catéter en presencia de 220D-F2, daptomicina, y combinaciones de los mismos. La diferencia entre catéteres tratados con daptomicina a 1X la CMI (1 mg/l) y 220D-F2 en comparación con aquellos tratados con daptomicina sola fue significativa a  $P < 0,001$  en los días 3 y 6 y a  $P < 0,05$  en el día 7. La diferencia entre aquellos tratados con 10X la CMI (10 mg/l) sola frente a la terapia complementaria con 220D-F2 es significativa ( $P < 0,05$ ) en el día 7.

30 **[0109]** El crecimiento de biopelícula en presencia de combinaciones de 220D-F2 y clindamicina se presenta en la **FIG. 9B**. La diferencia entre catéteres tratados con clindamicina a 1X la CMI (0,5 mg/l) y 220D-F2 en comparación con aquellos tratados con clindamicina sola fue significativa a  $P < 0,05$  en los días 2, 5 y 7 y a  $P < 0,001$  en el día 6. La diferencia entre aquellos tratados con 10X la CMI (5 mg/l) sola frente a la terapia complementaria con 220D-F2 fue significativa a  $P < 0,001$  en los días 5 y 7 y a  $P < 0,05$  en el día 6. Así, hubo una reducción de ~2,5 logaritmos en la biopelícula en los días de tratamiento 4-7 para los catéteres tratados con 220D-F2 y 5 mg/l de clindamicina (10X la CMI en el punto de rotura) en comparación con terapia de clindamicina sola. Aunque es evidente a un menor grado (reducción de 0,5 - 1 logaritmos) en los grupos de tratamiento que recibieron 0,5 mg/l de clindamicina (1X CMI en el punto de rotura), el grupo que recibió la terapia complementaria (extracto más antibiótico) demostró una ventaja del tratamiento significativa con respecto a la terapia de clindamicina sola en los días 2, 5, 6 y 7.

40 **[0110]** La **FIG. 9C** presenta el crecimiento de células en la biopelícula en presencia de 220D-F2, vancomicina, y combinaciones de los mismos. La diferencia entre catéteres tratados con vancomicina a 1X la CMI (2 mg/l) y 220D-F2 en comparación con aquellos tratados con vancomicina sola fue significativa ( $P < 0,05$ ) en los días 3, 4 y 6. La diferencia entre aquellos tratados con 10X la CMI (20 mg/l) sola frente a la terapia complementaria con 220D-F2 fue significativa ( $P < 0,05$ ) en los días 3 y 7. Así, fue evidente una pequeña ventaja (reducción de 0,5 - 1 logaritmos) en los grupos de terapia complementaria (220D-F2 más vancomicina) con respecto a la vancomicina sola durante tanto 1X como 10X (2 y 20 mg/l) las concentraciones de prueba. Esta ventaja fue significativa para los grupos de prueba de 1X en los días 3, 4 y 6 y significativa para los grupos de prueba de 10X en los días 3 y 7.

50 **[0111]** El crecimiento de biopelícula en presencia de 220D-F2, oxacilina, y combinaciones de los mismos, se presenta en la **FIG. 9D**. La diferencia entre catéteres tratados con oxacilina a 1X la CMI (0,5 mg/l) y 220D-F2 en comparación con aquellos tratados con oxacilina sola fue significativa a  $P < 0,001$  en los días 1, 2, 4 y 6 y a  $P < 0,05$  en los días 3, 5 y 7. La diferencia entre aquellos tratados con 10X la CMI (5 mg/l) sola frente a la terapia complementaria con 220D-F2 fue significativa ( $P < 0,05$ ) en el día 7. Así, los catéteres tratados con una terapia complementaria de oxacilina más 220D-F2 demostró una ventaja de 0,5 - 2 logaritmos con respecto a aquellos tratados con oxacilina solo en los grupos de tratamiento de 10X (5 mg/l) y una reducción de 2 - 5 logaritmos (aumentando con el número de días de tratamiento) para los grupos de tratamiento de 1X (0,5 mg/l). Esta ventaja fue estadísticamente significativa para todos los días de tratamiento en los grupos de tratamiento de 1X y en el día 7 para los grupos de 10X. Además, el 25 % de los catéteres tratados con 10X oxacilina más 220D-F2 se depuraron de todas las células adherentes en el día 6 de tratamiento y el 50 % se depuraron en el día 7.

**Ejemplo 5: Fraccionamiento de la fracción activa y actividad de fracciones adicionales**

65 **[0112]** Se desarrolló un método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa preparativa (RP-HPLC) para separar adicionalmente 220D-F2 en cuatro fracciones. Brevemente, se disolvió 220D-F2 en 2-

propanol:agua (2:8) a una concentración de 50 mg/ml. Se usó una columna C-18 ( $\mu$ Bondapak™, 19 mm x 300 mm, 125 Å, 10  $\mu$ m) para separar inyecciones de 1 ml (total 5 mg) con un controlador de sistema 600E de Waters y bomba y una fase móvil isocrática de H<sub>2</sub>O:acetonitrilo:2-propanol:ácido fórmico (74:17:8:1) a una velocidad de flujo de 7 ml/min (todos los disolventes de calidad para HPLC, Fisher Chemical) y detección a una longitud de onda de 360 nm usando un detector de absorbancia 486 Tunable de Waters y C-R5A Chromatopac de Shimadzu. Las fracciones se recogieron a 17,5 (220D-F2-f1), 20,5 (-f2), 27 (-f3) y 45 (-f4) minutos. Los picos individuales más grandes se localizaron en las fracciones 2 y 3, mientras que las fracciones 1 y 4 contuvieron múltiples picos menores. Las fracciones se ensayaron para la inhibición de la formación de biopelículas esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. La concentración mínima inhibitoria de biopelícula (CMIB) se definió como la concentración más baja de extracto en la que la formación de biopelículas se limitó a un nivel  $\geq 90$  % (para CMIB<sub>90</sub>) o  $\geq 50$  % (para CMIB<sub>50</sub>) por comparación con la cepa de control parental sin tratar.

**[0113]** Los bioensayos para la inhibición de biopelículas con estas fracciones revelaron que ninguna fracción individual era más eficaz que 220D-F2 en conjunto, sugiriendo que era necesaria más de una fracción para la actividad anti-biopelícula (**FIG. 10**). Así, se realizaron experimentos adicionales en los que las fracciones se combinaron en todas las posibles permutaciones y se probaron para actividad (datos no mostrados). La única combinación en la que actividad se restauró fue cuando las cuatro fracciones se recombinaron (**FIG. 10**). Estos resultados también se compararon con 220D-F2 antes y después de ejecutar a través del sistema de HPLC para determinar si el propio protocolo de separación tenía algún efecto sobre la actividad. No pudo determinarse diferencia significativa entre las muestras. Estos datos sugieren que el efecto anti-biopelícula de 220D-F2 es debido a la actividad sinérgica de múltiples compuestos, y las proporciones relativas de esta mezcla es importante para la actividad.

#### **Ejemplo 6: Análisis de espectrometría de masas en tándem con cromatografía de líquidos de la fracción activa**

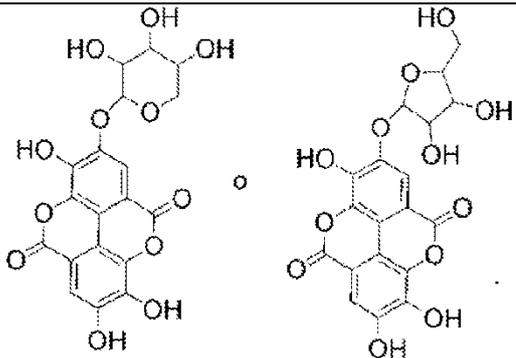
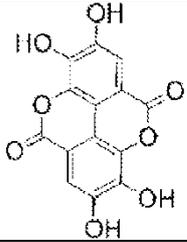
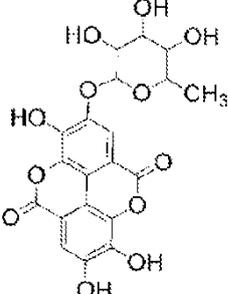
**[0114]** Se realizó caracterización adicional de 220D-F2 (suspensa en 5 % de isopropanol en H<sub>2</sub>O, 1 mg/ml) usando espectrometría de masas en tándem con cromatografía de líquidos-absorción ultravioleta de masa precisa (CL/UV/EM/EM) para identificar los principales componentes. Se usó una columna Mac-Mod HALO C18 (3,0 x 100 mm) con una fase móvil (A: 0,1 % de ácido fórmico en agua; B: 0,1 % de ácido fórmico en acetonitrilo) con un gradiente (mantenimiento 2 % de B durante 2 min, 2-50 % de B durante 18 min, 100 % de B durante 5 min), flujo de 0,4 ml/min e intervalo de detección con PDA (detector de matriz de fotodiodos) de 200-790 nm. La detección por EM fue con un Thermo LTQ Orbitrap Discovery, modo +ESI, e intervalo de barrido de 140-2000 Da. Se realizaron búsquedas de múltiples bases de datos (Human Metabolome Database (versión 2.5), ChemSpider, SciFinder y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) LIGAND Database) usando búsquedas de fórmulas químicas. Todas las mediciones de masa estuvieron dentro de 0,5 uma de las fórmulas propuestas, perfectamente dentro de las tolerancias de medición esperadas del espectrómetro de masas.

**[0115]** Este análisis reveló la presencia de ácido elágico (EA) y varios derivados de ácido elágico (EAD) o compuestos relacionados con sapogenina. Se identificaron las fórmulas moleculares de C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>, C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub>, C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>8</sub> (Tabla 2) y se confirmaron con mediciones de masa precisas (<5 ppm). De los principales componentes de UV identificados, el más abundante fue el ácido elágico (n.º 2, MW 302). El segundo componente de UV más abundante (n.º 7) no dio una clara señal de EM. El tercer componente de UV más abundante (n.º 1, MW 434) parece ser ácido elágico más un resto de C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>. Se encontró que un cuarto componente de UV (n.º 3, MW 448) estaba de acuerdo con un derivado glucosilado de ácido elágico. La investigación de las posibles fórmulas de acuerdo con la medición de masa del quinto componente de UV (n.º 4) no proporcionó datos suficientes para la propuesta de una estructura. De los principales componentes de EM, el más abundante (n.º 8) no proporcionó información suficiente para soportar la propuesta de una estructura, sin embargo los pesos moleculares y los defectos de masa sugieren que pueden ser dímeros de especies de MW~500 (similar a n.º 6). El segundo componente de EM más abundante (n.º 6) está de acuerdo con una sapogenina. La sucesiva pérdida de agua (m/z 18) está de acuerdo con un compuesto poli-hidroxiado. El tercer componente de EM más abundante (n.º 5, MW 534) parece ser similar al n.º 6 y tiene pérdida por EM/EM de acuerdo con un compuesto múltiplemente hidroxiado como una sapogenina. No se observaron pérdidas de acuerdo con la pérdida neutra de un azúcar.

<b>TABLA 2.</b> Compuestos detectados en el extracto 220D-F2 por CL/UV/EM/EM de masa precisa.					
N.º	Compuesto propuesto <sup>†</sup>	Fórmula molecular	Tiempo de retención (minutos)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragmentación por EM/EM (m/z)
1	Xilopiranosido de ácido elágico o xilofuranósido de ácido elágico	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	10,9	435,05594	303,01346
2	Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	11,1	303,01354	285,00281, 275,01868, 259,02338, 241,01314

TABLA 2. Compuestos detectados en el extracto 220D-F2 por CL/UV/EM/EM de masa precisa.					
N.º	Compuesto propuesto <sup>†</sup>	Fórmula molecular	Tiempo de retención (minutos)	[M+H] <sup>+</sup> m/z	Fragmentación por EM/EM (m/z)
3	Manopiranosido de ácido elágico	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	11,1	449,07158	352,33952, 303,01366, 249,11220, 182,98514
4	desconocido	desconocido	11,5	437,97815	409,09189, 303,01351, 219,10153, 182,98507
5	Derivado de sapogenina	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	13,5	535,32637	517,31604, 499,30499, 481,29480, 469,29486
6	Derivado de sapogenina	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub>	13,7	519,33139 y 501,32097	501,32071, 483,31012, 473,32559, 455,31543, 437,30457, 409,30994
7	desconocido	desconocido	14,7	573,98540 y 396,98622	532,95864, 505,35274, 485,32649, 451,99400, 440,95009, 352,33958, 317,02929, 273,07586, 199,98796, 182,98517
8	desconocido	desconocido	16,9	1017,62898 y 999,61893	955,62813, 937,61896, 499,30520, 437,30489

[0116] Las posibles estructuras para tres de estos compuestos (C<sub>14</sub>H<sub>6</sub>O<sub>8</sub>, C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>12</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>O<sub>12</sub>) se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Estructuras de compuestos identificados en el extracto 220D-F2.		
Compuesto	Fórmula molecular	Estructura
1 Xilopiranosido de ácido elágico o xilofuranósido de ácido elágico	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub>	
2 Ácido elágico	C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> O <sub>8</sub>	
3 Manopiranosido de ácido elágico	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>12</sub>	

5

#### Ejemplo 7 (comparativo): Actividad anti-biopelícula de fitoquímicos de *R. ulmifolius*

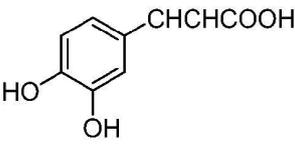
[0117] Se compraron diez constituyentes fitoquímicos comercialmente disponibles informados en la bibliografía por haber sido aislados de *R. ulmifolius* (Tabla 4) y se examinaron para su eficacia profiláctica en la prevención de la formación de biopelículas usando un ensayo de biopelícula en placa de microtitulación estática. Se compraron ácido

10

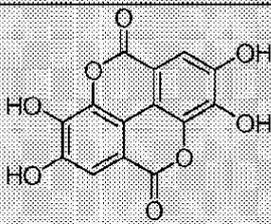
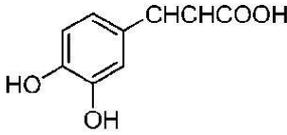
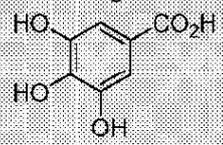
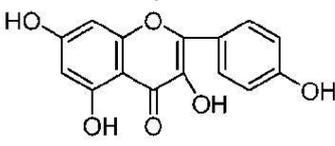
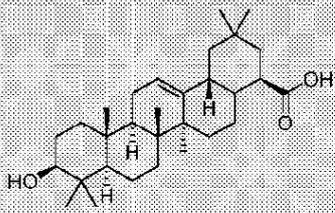
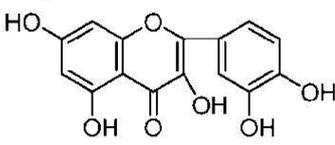
ferúlico, campferol, ácido ursólico, quercetina deshidratada, ácido cafeico, ácido elágico y ácido oleanólico de MP BioMedicals (Solon, OH, EE.UU.); quercetin-3-O-glucurónido y tilirósido de Chromadex (Irvine, CA, EE.UU.); y ácido gálico de Acros Organics (NJ, EE.UU.). Los compuestos se probaron para el crecimiento y actividad inhibitoria de biopelícula a dosis que oscilaban de 25-2000  $\mu\text{M}$ . Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada fracción, cepas de *S. aureus* se cultivaron a 37 °C en caldo de Mueller-Hinton ajustado por catión (CAMHB). Se determinaron CMI y CMB siguiendo las pautas de microdilución de caldo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLBI). Brevemente, se inocularon cepas en 0,1 ml de CAMBH que contenía concentraciones variables del compuesto. Para CMI, se evaluó la densidad óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) inmediatamente después de la inoculación y de nuevo después de 18 horas usando el lector de microplacas Biotek Synergy II. La CMI se definió como la concentración más baja que inhibió el crecimiento a un nivel superior o igual al 90 % (para  $\text{CMI}_{90}$ ) o superior o igual al 50 % (para  $\text{CMI}_{50}$ ) por comparación con cultivos sin tratar.

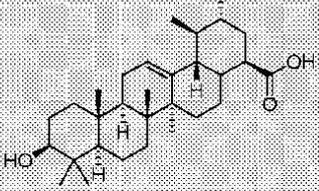
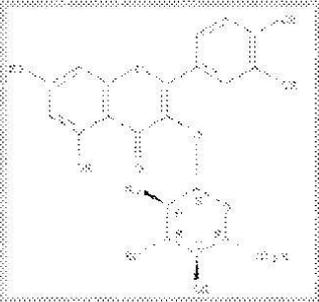
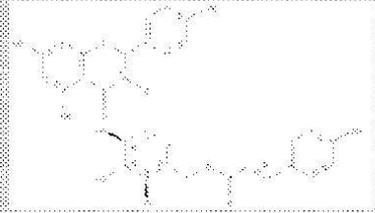
[0118] La FIG. 11 ilustra la formación de biopelículas por diversas cepas de *Staphylococcus* en ausencia o presencia de diversas concentraciones de ácido cafeico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, campferol, ácido oleanólico, quercetina dihidratada y ácido ursólico. Los resultados para los 10 compuestos se presentan en la Tabla 4. El único compuesto que presentó actividad anti-biopelícula significativa a dosis muy por debajo de cualquier efecto inhibitor del crecimiento fue el ácido elágico (EA) (Tabla 4). Este hallazgo soporta la hipótesis de que EA y EAD presentes en 220D-F2 son responsables de las propiedades anti-biopelícula del extracto.

**TABLA 4.** Efectos inhibidores de fitoquímicos individuales

Compuesto	Formación de biopelícula		Crecimiento	
	$\text{CMIB}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CMIB}_{90}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CMIB}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CMIB}_{90}$ ( $\mu\text{M}$ )
Ácido cafeico 	>2000	>2000	>2000	>2000
Ácido elágico	38±13	763±32	>2000	>2000

20

<b>TABLA 4. Efectos inhibidores de fitoquímicos individuales</b>				
<b>Compuesto</b>	<b>Formación de biopelícula</b>		<b>Crecimiento</b>	
	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>
				
<p>Ácido ferúlico</p> 	>2000	>2000	>2000	>2000
<p>Ácido gálico</p> 	713±32	2010±10	>2000	>2000
<p>Campferol</p> 	560±53	773±6	1640±10	1787±42
<p>Ácido oleanólico</p> 	190±26	940±35	1077±15	1613±31
<p>Quercetina dihidratada</p> 	543±21	1987±21	1720±20	1903±29

<b>TABLA 4. Efectos inhibidores de fitoquímicos individuales</b>				
<b>Compuesto</b>	<b>Formación de biopelícula</b>		<b>Crecimiento</b>	
	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>	<b>CMIB<sub>50</sub> (µM)</b>
Ácido ursólico 	207±32	397±6	640±46	763±32
Quercetin-3-O-glucurónico 	>2000	>2000	>2000	>2000
Tilirosido 	>2000	>2000	>2000	>2000

**Ejemplo 8: Inhibición de biopelículas en presencia y ausencia de proteínas plasmáticas humanas.**

5 [0119] Estudios previos han indicado que el ácido elágico no es un inhibidor de biopelícula eficaz para *S. aureus* (véase Durig et al., Applied Microbiology and Biotechnology 87: 309-317, 2010). Se usaron la cepa sensible a metilina UAMS-1 (USA200) y la cepa resistente a metilina UAMS-1782 (USA300) para evaluar la eficacia de 220D-F2 y ácido elágico en experimentos que incluyeron u omitieron el uso de recubrimiento plasmático para los pocillos de prueba. El tratamiento con 220D-F2 provocó una respuesta dependiente de la dosis en limitar la

10 formación de biopelículas bajo ambas condiciones de crecimiento (datos no mostrados). Esto sugiere que la actividad anti-biopelícula de 200D-F2 no es debida al EA solo, sino que otro(s) constituyente(s) presente(s) en el extracto también deben desempeñar una función que puede implicar otros mecanismos, que no han sido esclarecidos.

15 **Ejemplo 9: Citotoxicidad de 220D-F2 en células de mamífero normales.**

[0120] Para examinar los efectos citotóxicos de 220D-F2 sobre células de hígado y riñón de mamífero normales, se empleó un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima citosólica estable que es liberada tras el daño de la membrana en células necróticas. La actividad de LDH puede servir de medida útil para determinar

20 la toxicidad del fármaco a líneas celulares.

[0121] Se midió LDH usando un kit de ensayo de citotoxicidad comercial (ensayo de citotoxicidad no radiactivo Promega CytoTox 96®, WI, EE.UU.), en el que la LDH liberada en sobrenadantes de cultivo se mide con un ensayo

enzimático acoplado, produciendo conversión de una sal de tetrazolio en un producto de formazán rojo. Las células se trataron con concentraciones de extracto 220D-F2 que oscilaron de 0,1-7.000 µg/ml y se incubaron en aire humidificado con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas. También se incluyeron controles para el excipiente de extracto (20 % de DMSO en solución salina tamponada con fosfato, PBS), control de LDH positivo y control de LDH positivo con medios y extracto. Se eliminó la disolución de muestra (sobrenadante), y la LDH se liberó de las células en medio de cultivo tratado según las instrucciones del kit, luego se midió a una DO490nm. La liberación máxima se obtuvo después de tratar las células con una disolución de lisis durante 45 minutos, luego tratando el sobrenadante según las instrucciones del kit. Todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado. El porcentaje necrótico (% de citotoxicidad) se expresó usando la fórmula: (valor de muestra /liberación máxima) × 100 %.

10

**[0122]** Se cultivaron células tubulares proximales de riñón humano normal (HK-2), células de riñón de rata normal (NRK-52E), hepatocitos de ratón normal (AML12) y células tubulares proximales de riñón de ratón normal (TKPTS) con diferentes medios: queratinocito-medio libre de suero (K-SFM) complementado con extracto de pituitaria bovina (BPE) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) recombinante humano para células HK-2; medio Eagle modificado por Dubelcco (DMEM) para células NRK-52E; y medio de crecimiento completo de la ATCC (mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 de Ham complementado con insulina, transferrina, dexametasona y suero bovino fetal) para células AML12 y TKPTS. Las células se mantuvieron en aire humidificado con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las células se transfirieron a placas de cultivo celular de 96 pocillos (se sembraron 10.000 células por pocillo) y se incubaron durante 24 horas antes de aspirar el medio, añadir extracto 220D-F2 en medio libre de suero y realizar pruebas de citotoxicidad.

20

**[0123]** Los resultados se informan como el porcentaje de viabilidad celular después de la exposición a la dosificación indicada de 220D-F2 en el medio de crecimiento de cultivo (**FIG. 11**). Las células de riñón tubulares proximales humanas (HK-2) y de ratón (TKPTS) normales demostraron muy buena tolerancia por el extracto, y no pudo identificarse CI<sub>50</sub> incluso a dosis extremadamente altas de 7.000 µg/ml. Las células de riñón de rata (NRK-52E) y los hepatocitos de ratón (AML-12) fueron ligeramente más sensibles y tuvieron CI<sub>50</sub> de 4.000 y 7.000 µg/ml, respectivamente. Las células de riñón humano fueron las menos afectadas y fue notable un efecto significativo en disminuir la viabilidad celular solo a concentraciones ≥ 500 µg/ml. Estos resultados son relevantes, ya que las dosis activas para inhibición de biopelícula oscilan de 50-200 µg/ml (dependiendo de la cepa de *S. aureus*) y no fue notable un impacto o impacto muy limitado (<20 %) sobre la viabilidad celular a estas concentraciones en las líneas celulares examinadas.

25

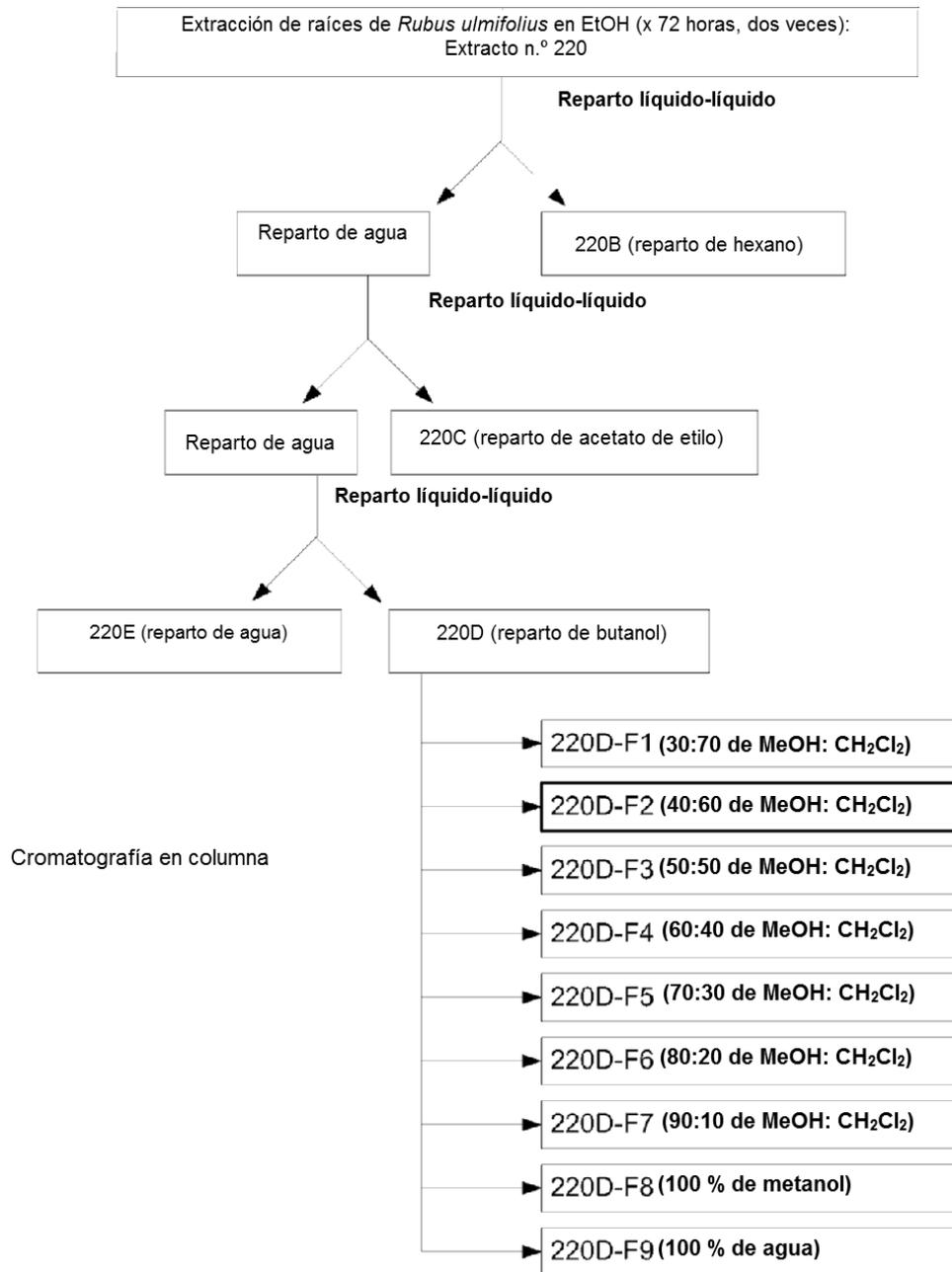
30

**REIVINDICACIONES**

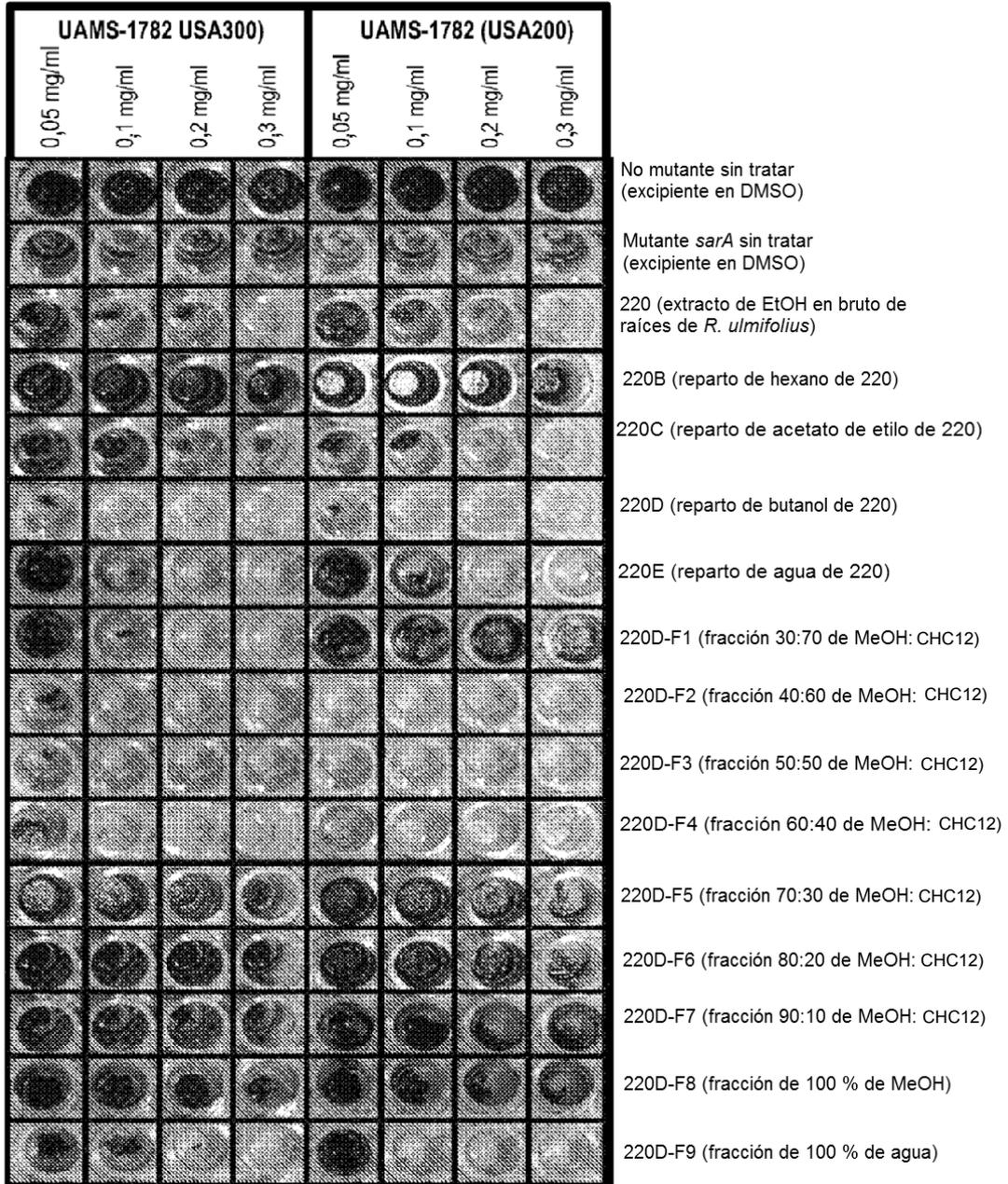
1. Una composición polifenólica obtenible por un procedimiento que comprende:
  - 5 a) fraccionar un extracto de etanol al 95% de raíces de *Rubus ulmifolius* con una mezcla de agua y hexano para formar un primer extracto de agua y un extracto de hexano;
  - b) fraccionar el primer extracto de agua con una mezcla de agua y acetato de etilo para formar un segundo extracto de agua y un extracto de acetato de etilo;
  - 10 c) fraccionar el segundo extracto de agua con una mezcla de agua y butanol para formar un tercer extracto de agua y un extracto de butanol; y
  - d) fraccionar el extracto de butanol por cromatografía en columna de gel de sílice con una fase móvil que comprende una mezcla de metanol y diclorometano, en la que la composición polifenólica es eluida por la fase móvil en la que la relación de volumen de metanol con respecto a diclorometano es 40:60.
- 15 2. La composición polifenólica de la reivindicación 1, en la que la composición comprende ácido elálgico y derivados de ácido elálgico.
3. Una composición polifenólica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende al menos una sapogenina.
- 20 4. Una composición polifenólica según cualquier reivindicación precedente que comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Una composición polifenólica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende al menos un
- 25 antibiótico.
6. Una composición polifenólica según la reivindicación 5, en la que el antibiótico se selecciona entre anfotericina B, clindamicina, daptomicina, dicloxicilina, minociclina, nafcilina, oxacilina, ramoplanina, rifampina, triclosán y vancomicina.
- 30 7. Un método para la inhibición de la formación de una biopelícula, comprendiendo el método poner en contacto una pluralidad de microorganismos de flotación libre con la composición polifenólica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siempre que dicho método no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
- 35 8. Un método para la inhibición del crecimiento de una biopelícula establecida, comprendiendo el método poner en contacto la biopelícula con la composición polifenólica de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, siempre que dicho método no sea un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
9. Un método según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en el que la pluralidad de microorganismos de flotación libre o la biopelícula establecida comprenden microorganismos elegidos de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Helicobacter*, *Stenotrophomonas*, *Bdellovibrio*, *Legionella*, *Candida*, y combinaciones de los mismos.
- 40 10. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que la pluralidad de microorganismos de flotación libre o la biopelícula establecida comprende *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus* spp. resistente a metilicina, o combinaciones de los mismos.
- 45 11. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la pluralidad de microorganismos de flotación libre o la biopelícula establecida están sobre una superficie de un dispositivo médico implantable; sobre una superficie o en un producto alimenticio o una pieza de equipo usado en la preparación del producto alimenticio; o combinaciones de los mismos.
- 50 12. Una composición polifenólica para su uso en la inhibición de la formación de una biopelícula sobre una superficie o en el cuerpo de un sujeto que padece o diagnosticado con una infección o patología, donde el tratamiento con la composición inhibe o previene la formación de biopelículas, siendo la composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 55 13. Una composición polifenólica para su uso en el tratamiento profiláctico de un sujeto de forma que se inhiba o prevenga la formación de biopelículas, siendo la composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 60 14. Una composición polifenólica para su uso en la inhibición del crecimiento de una biopelícula establecida sobre una superficie o en el cuerpo de un sujeto que padece o ha sido diagnosticado con una infección o patología, donde el tratamiento con la composición inhibe el crecimiento de una biopelícula establecida, siendo la composición según la reivindicación 5 o la reivindicación 6.
- 65

15. Un procedimiento para la preparación de una composición polifenólica, comprendiendo el procedimiento:

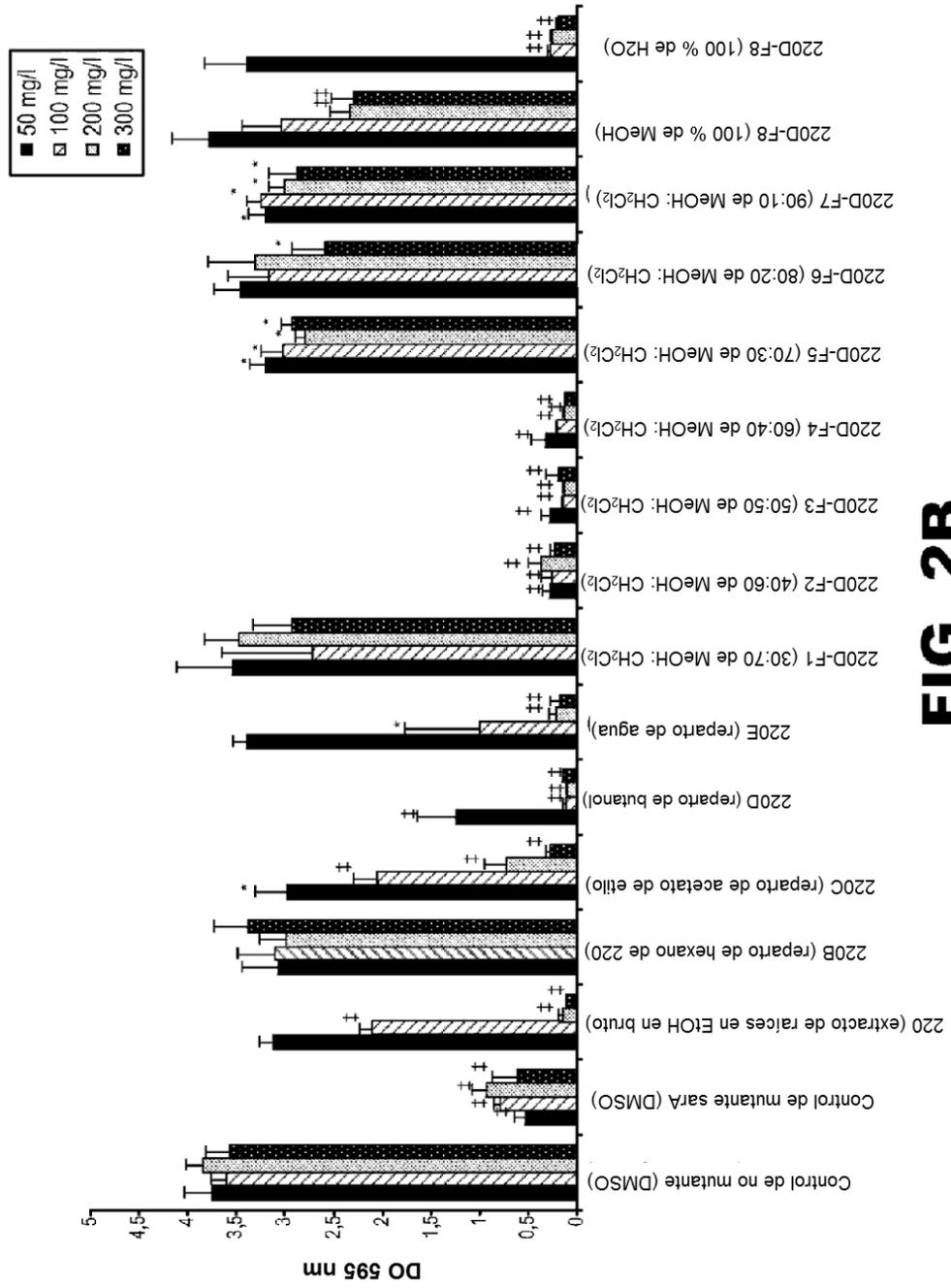
- 5 a) fraccionar un extracto de etanol al 95 % de raíces de *Rubus ulmifolius* con una mezcla de agua y hexano para formar un primer extracto de agua y un extracto de hexano;
- b) fraccionar el primer extracto de agua con una mezcla de agua y acetato de etilo para formar un segundo extracto de agua y un extracto de acetato de etilo;
- c) fraccionar el segundo extracto de agua con una mezcla de agua y butanol para formar un tercer extracto de agua y un extracto de butanol; y
- 10 d) fraccionar el extracto de butanol por cromatografía en columna de gel de sílice con una fase móvil que comprende una mezcla de metanol y diclorometano, en el que la composición polifenólica es eluída por la fase móvil en la que la relación de volumen de metanol con respecto a diclorometano es 40:60.



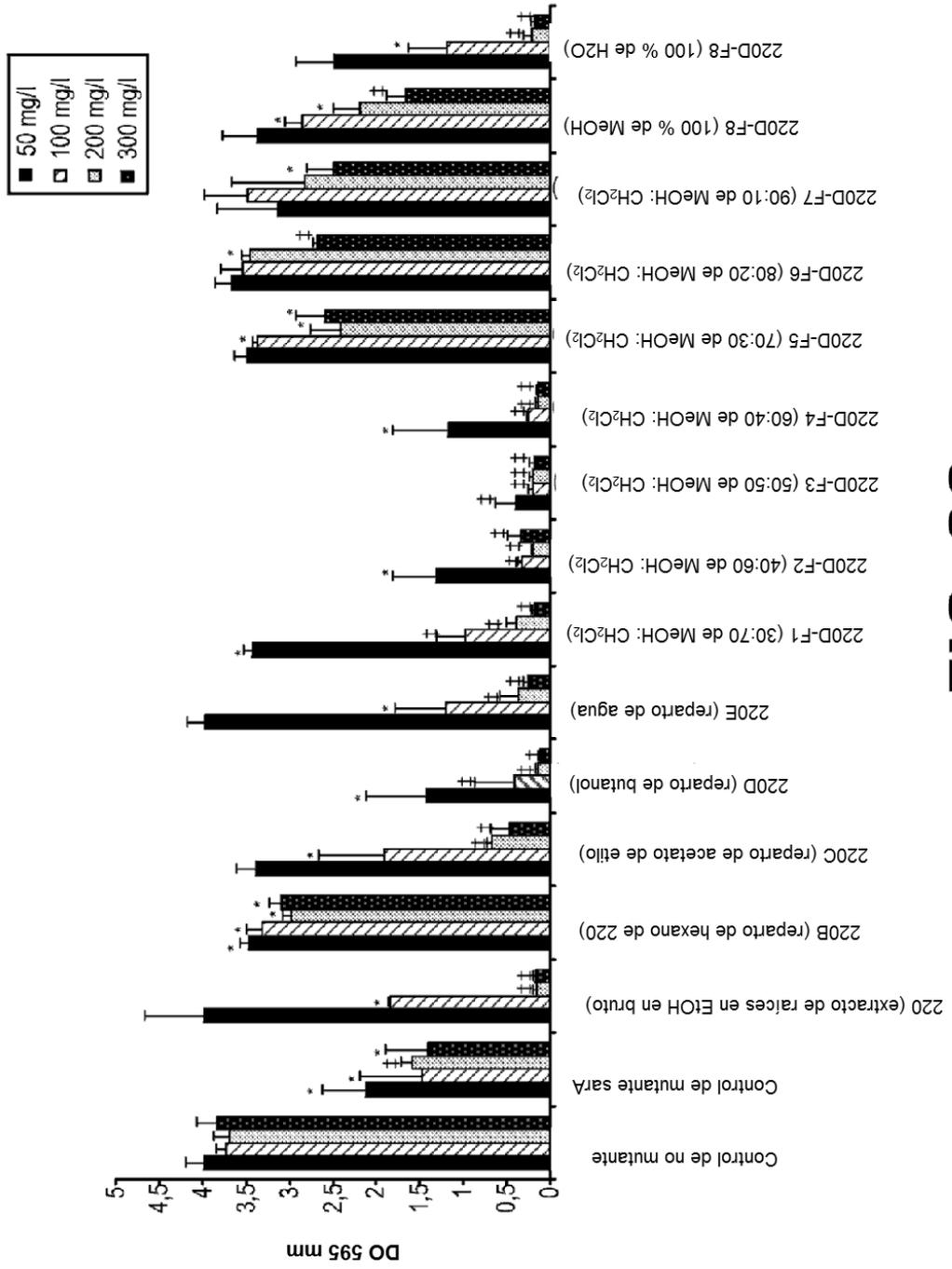
**FIG. 1**



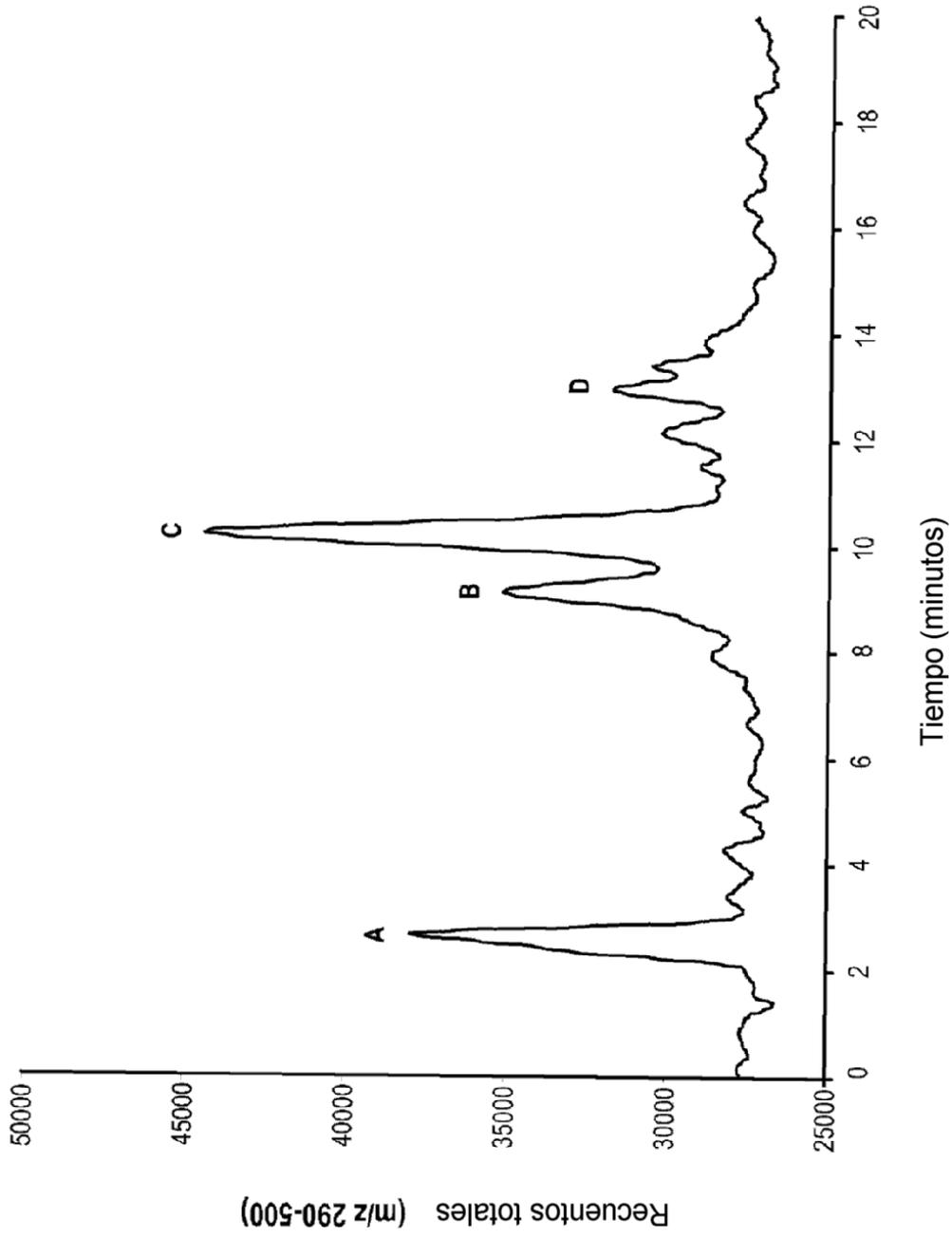
**FIG. 2A**



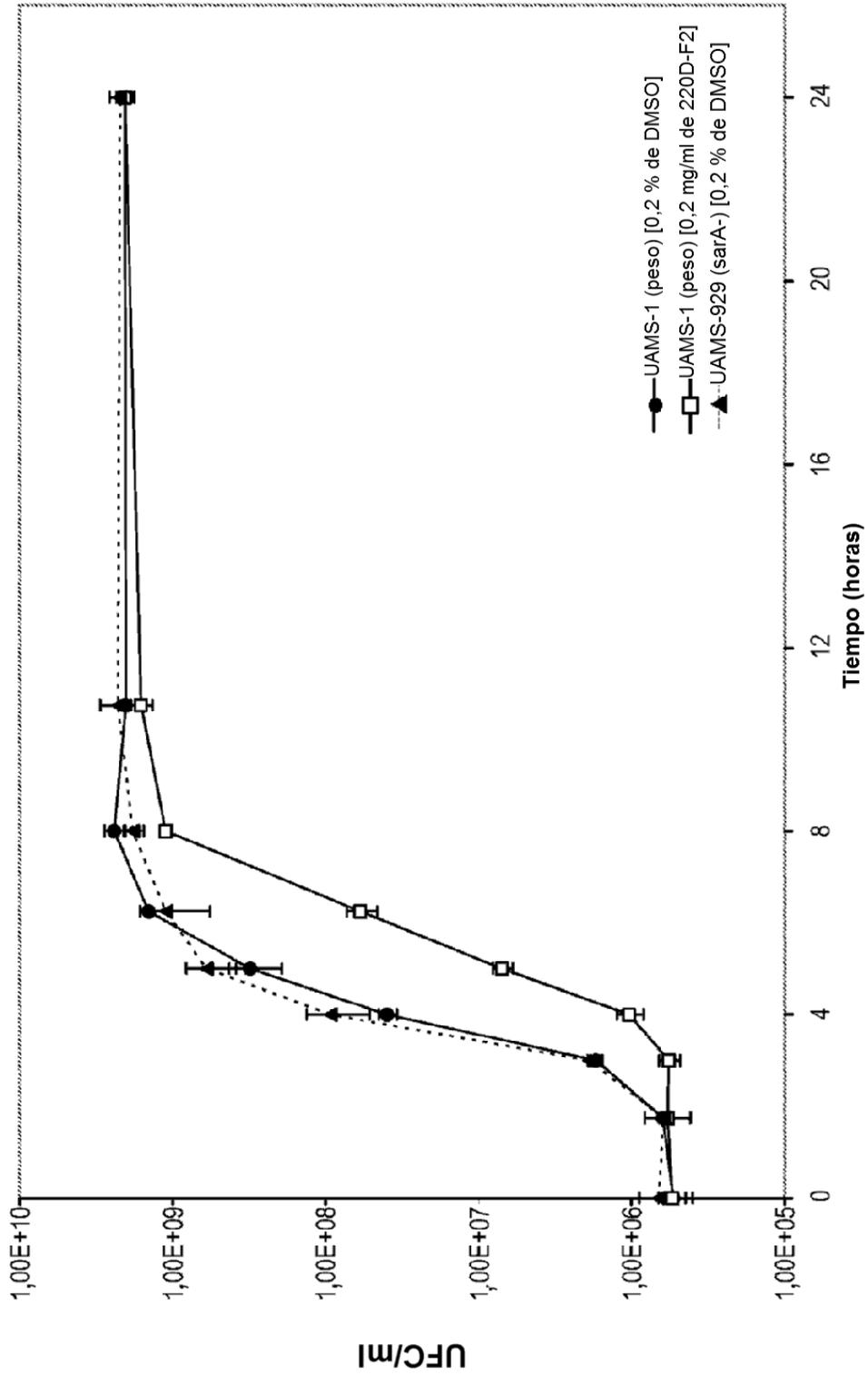
**FIG. 2B**



**FIG. 2C**

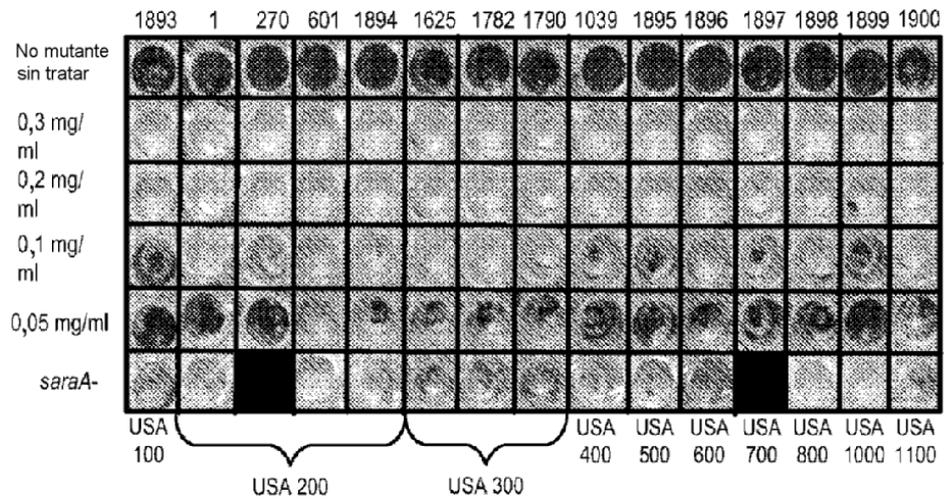


**FIG. 3**

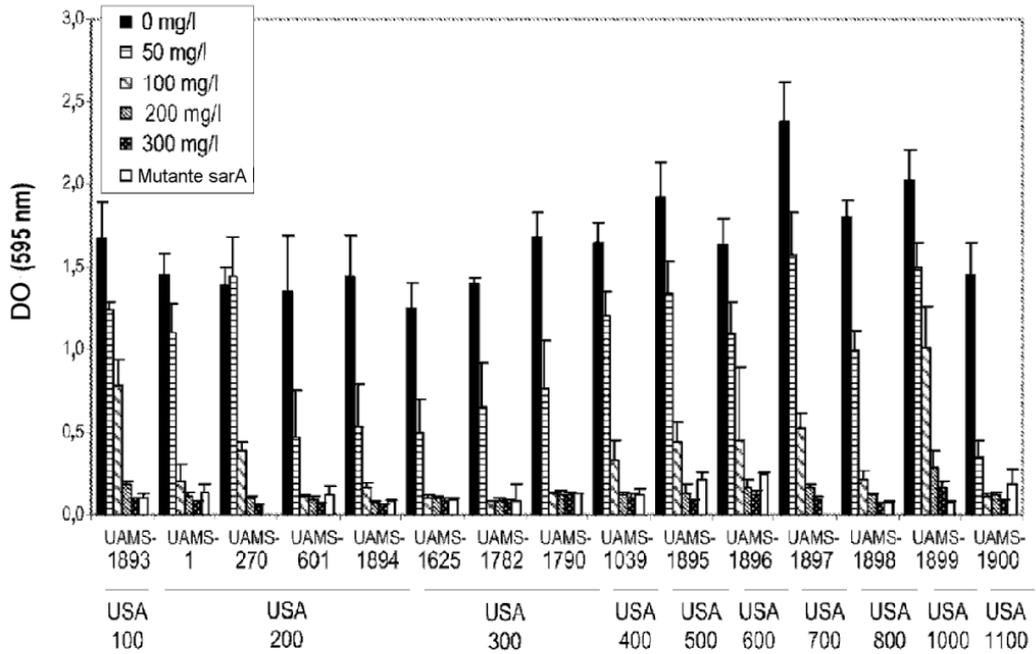


**FIG. 4**

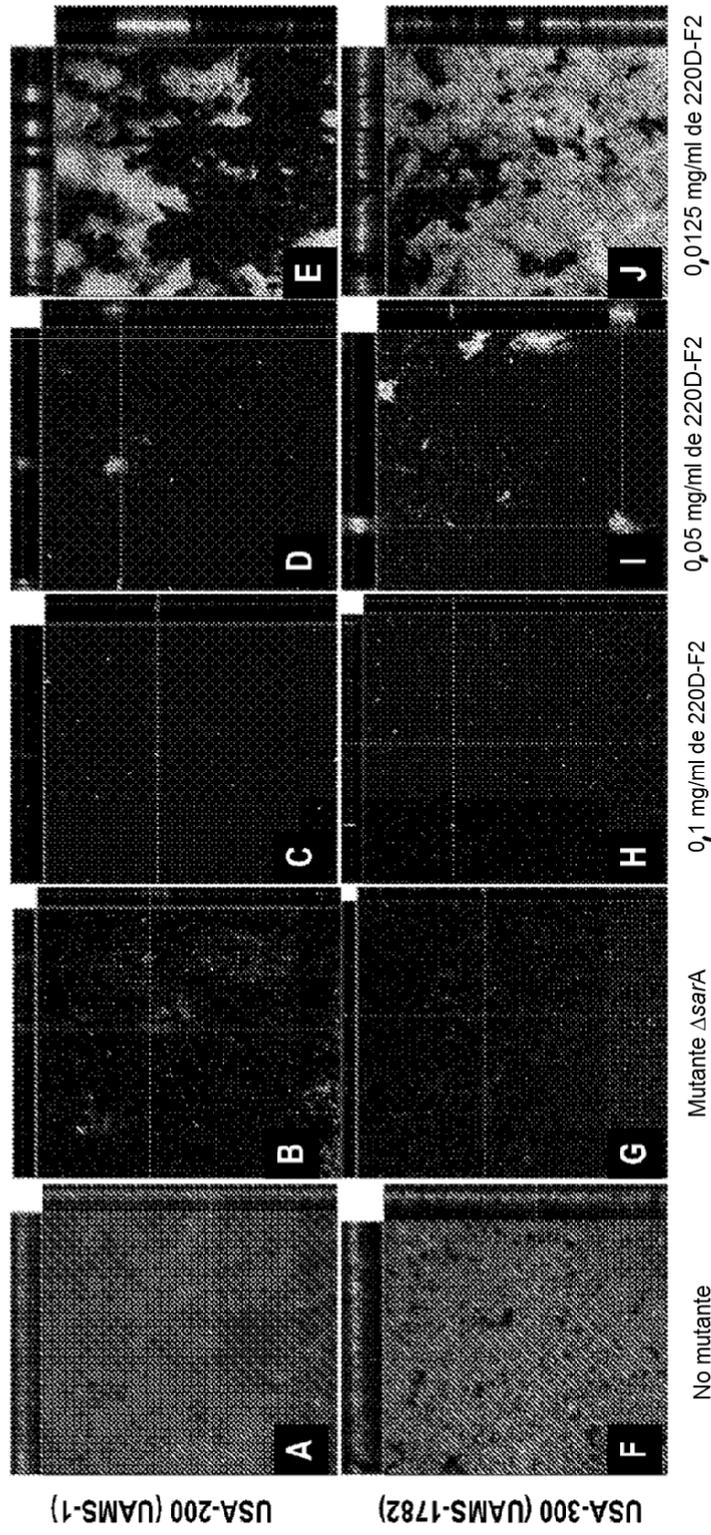
**A**



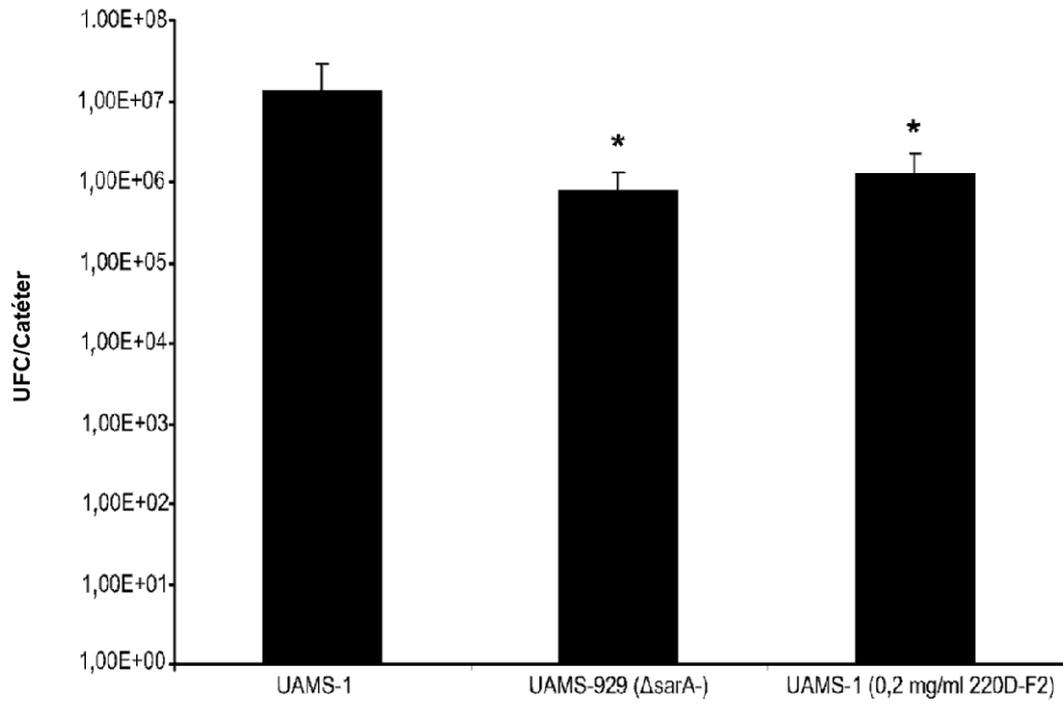
**B**



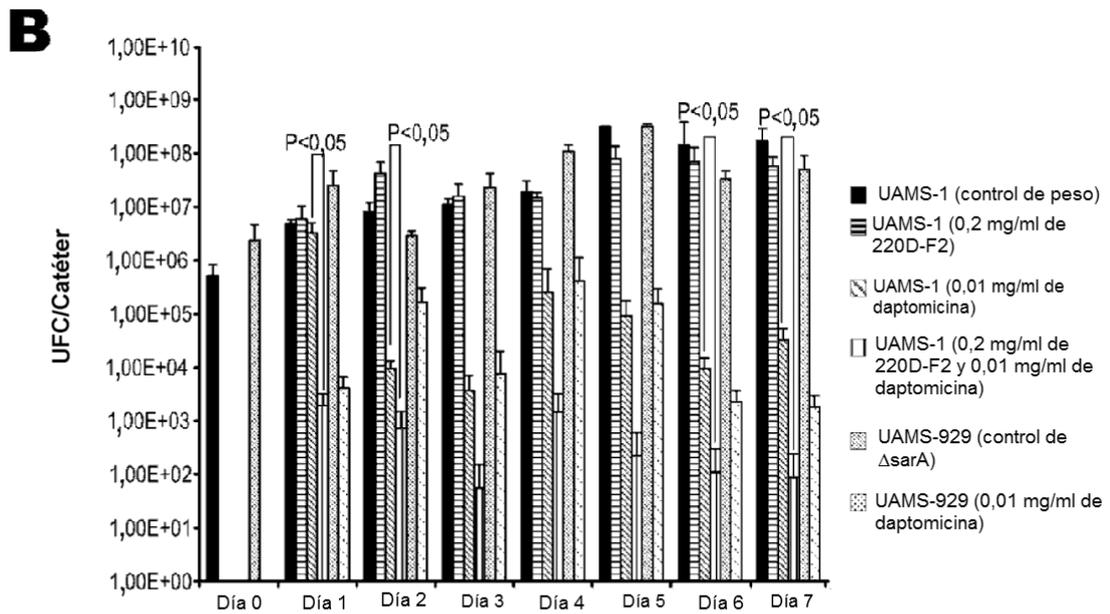
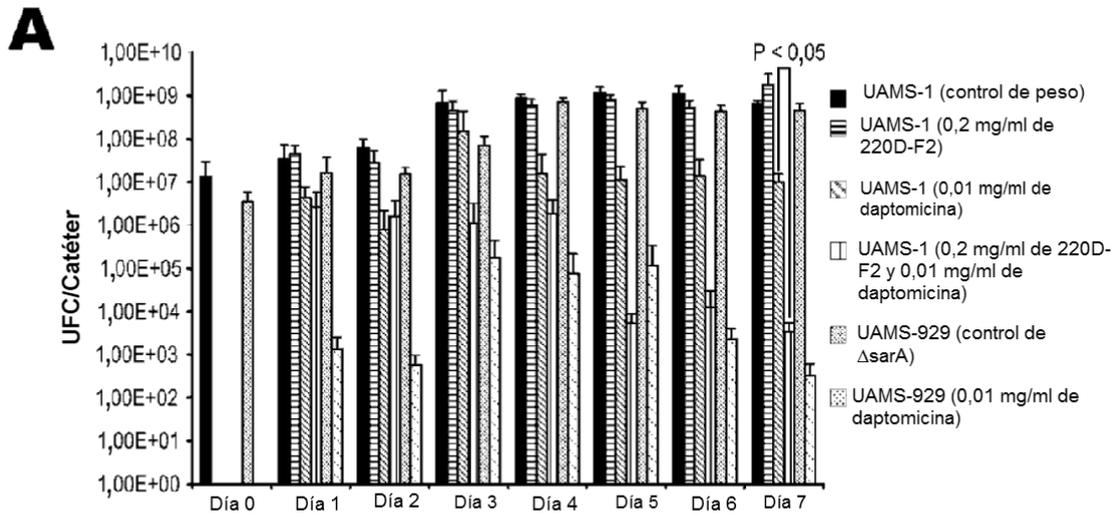
**FIG. 5**



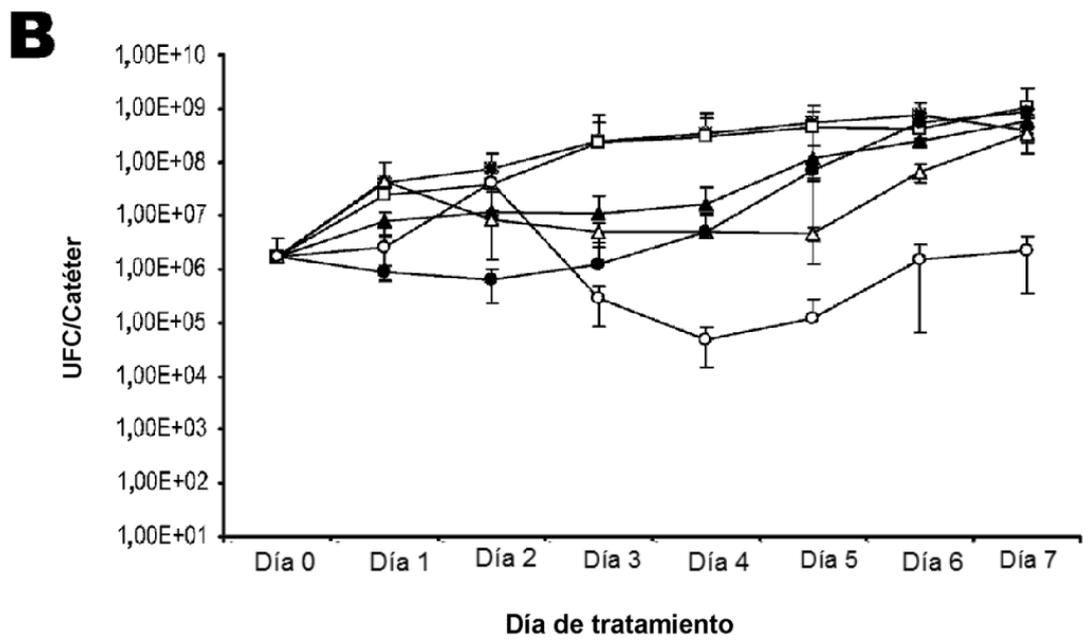
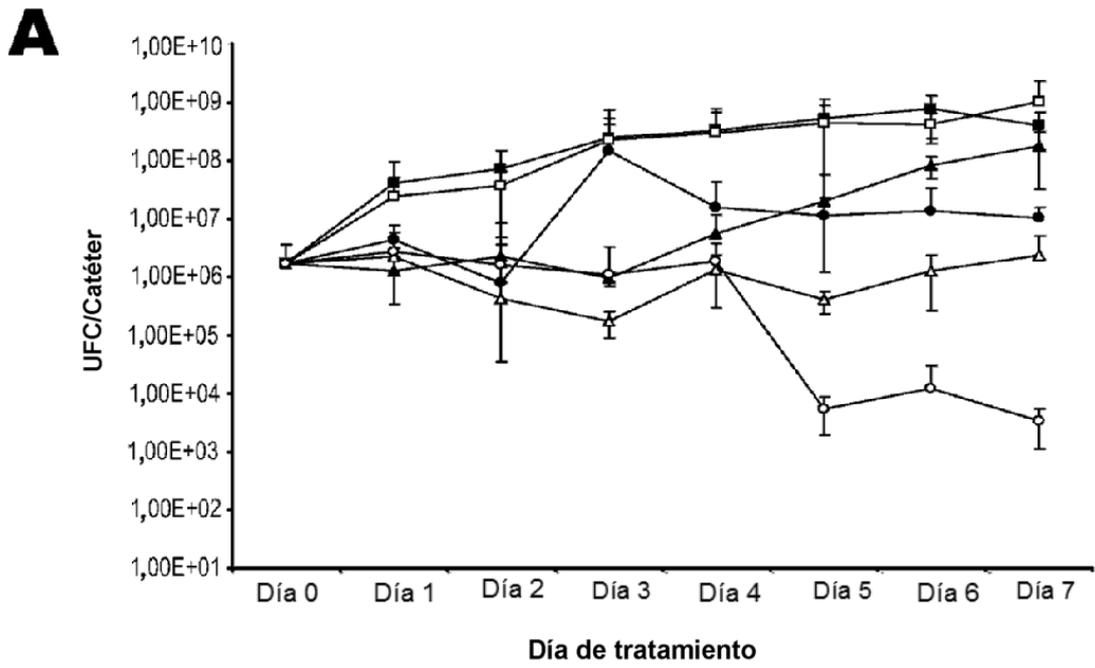
**FIG. 6**



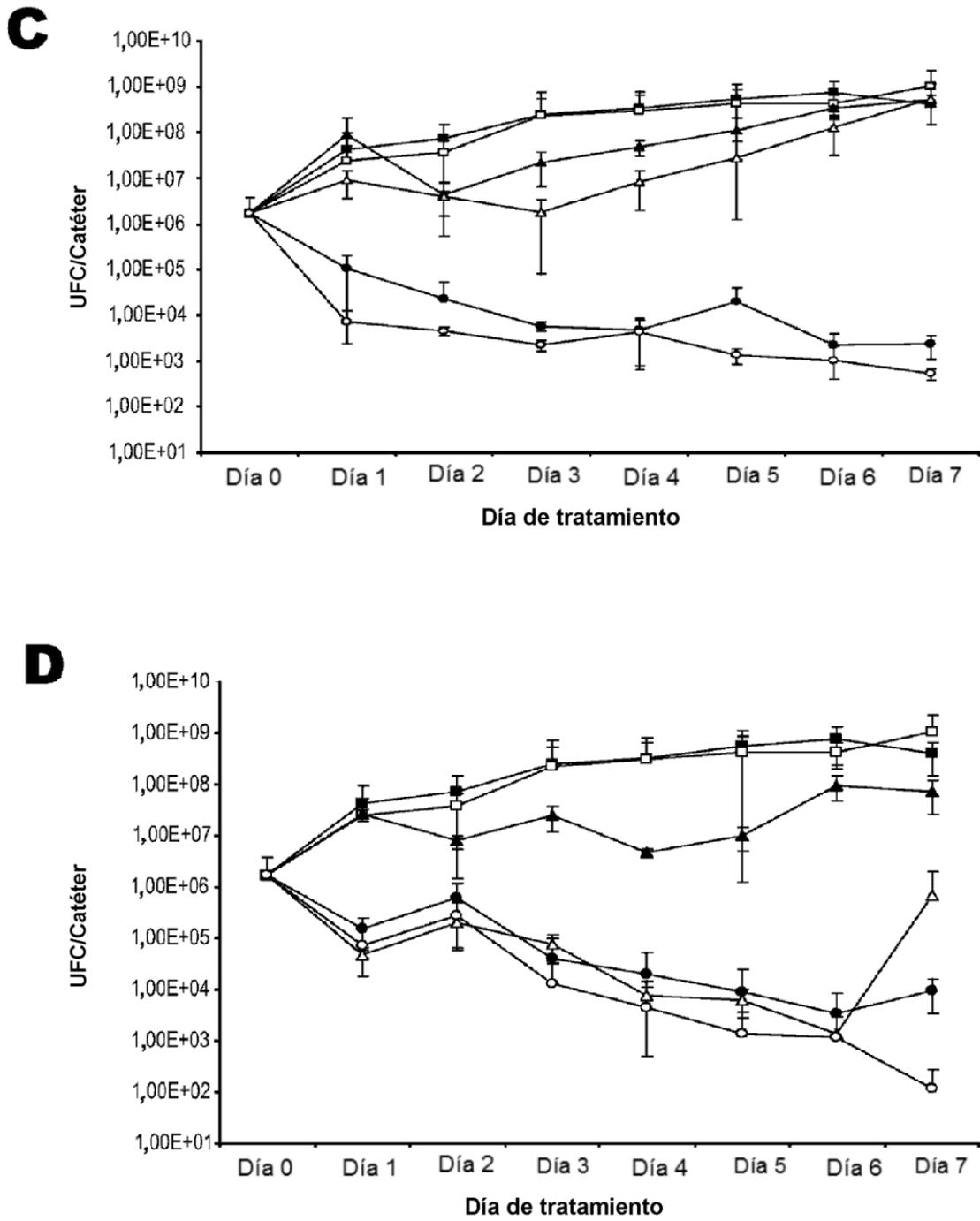
**FIG. 7**



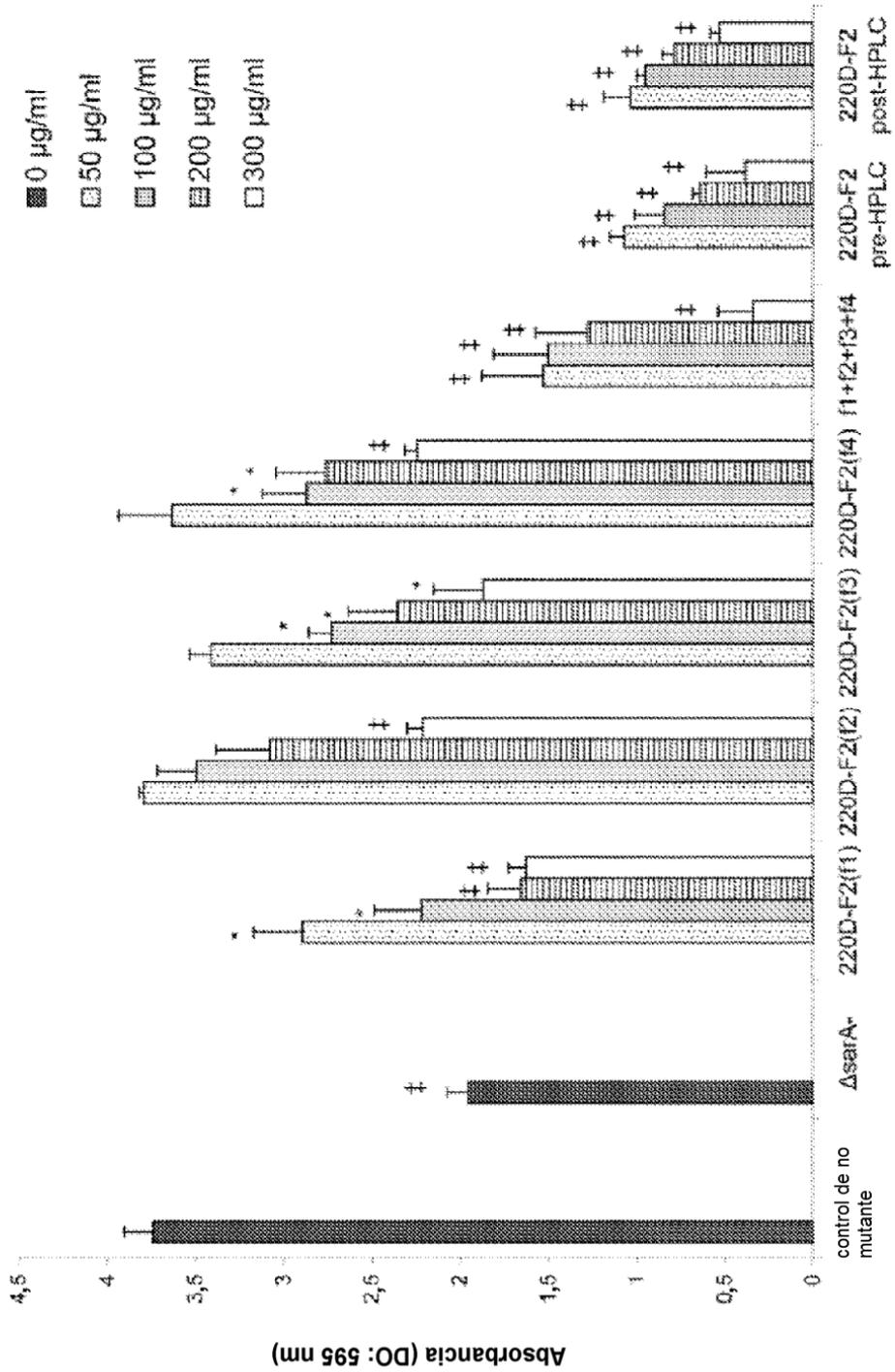
**FIG. 8**



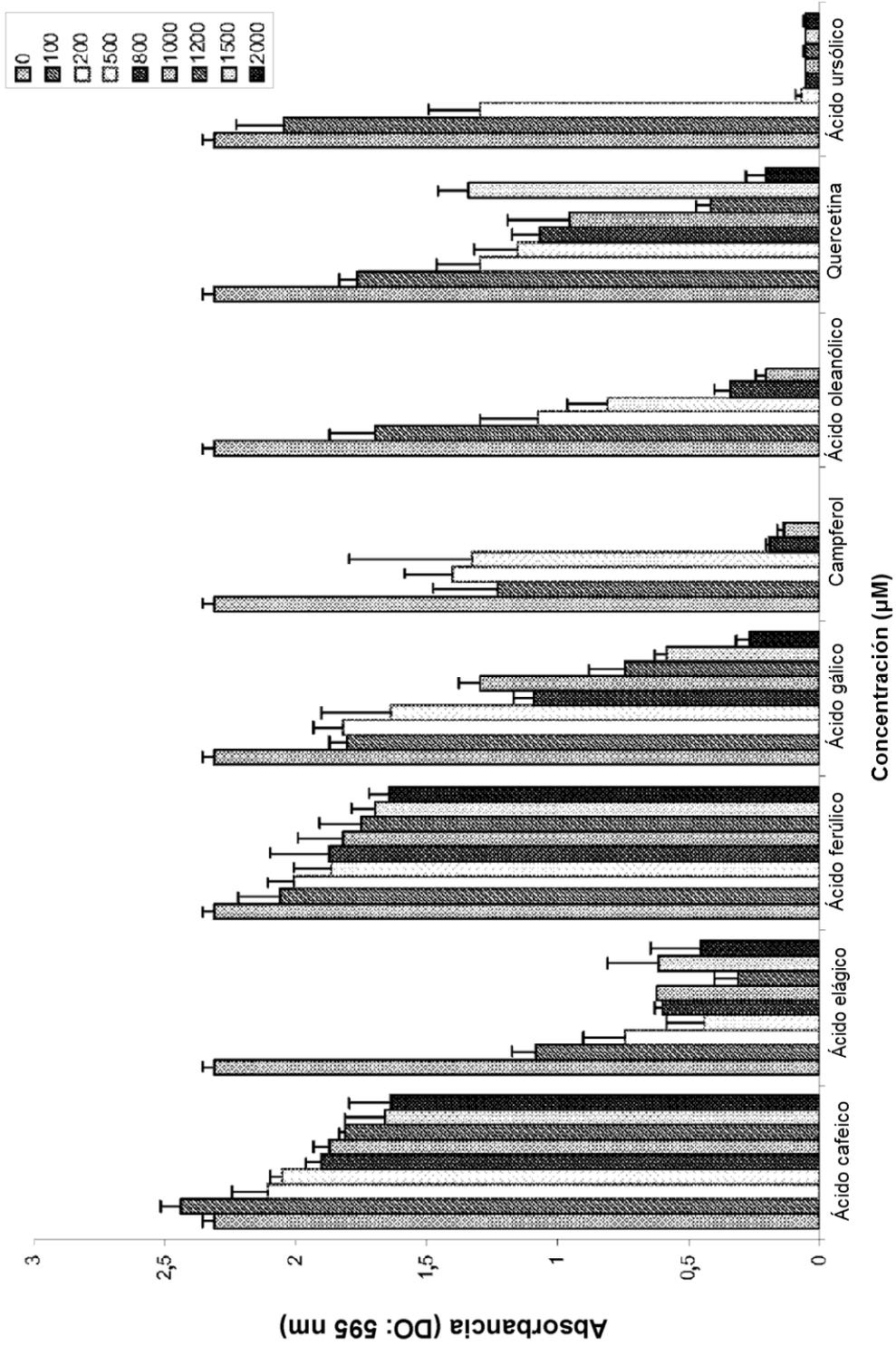
**FIG. 9**



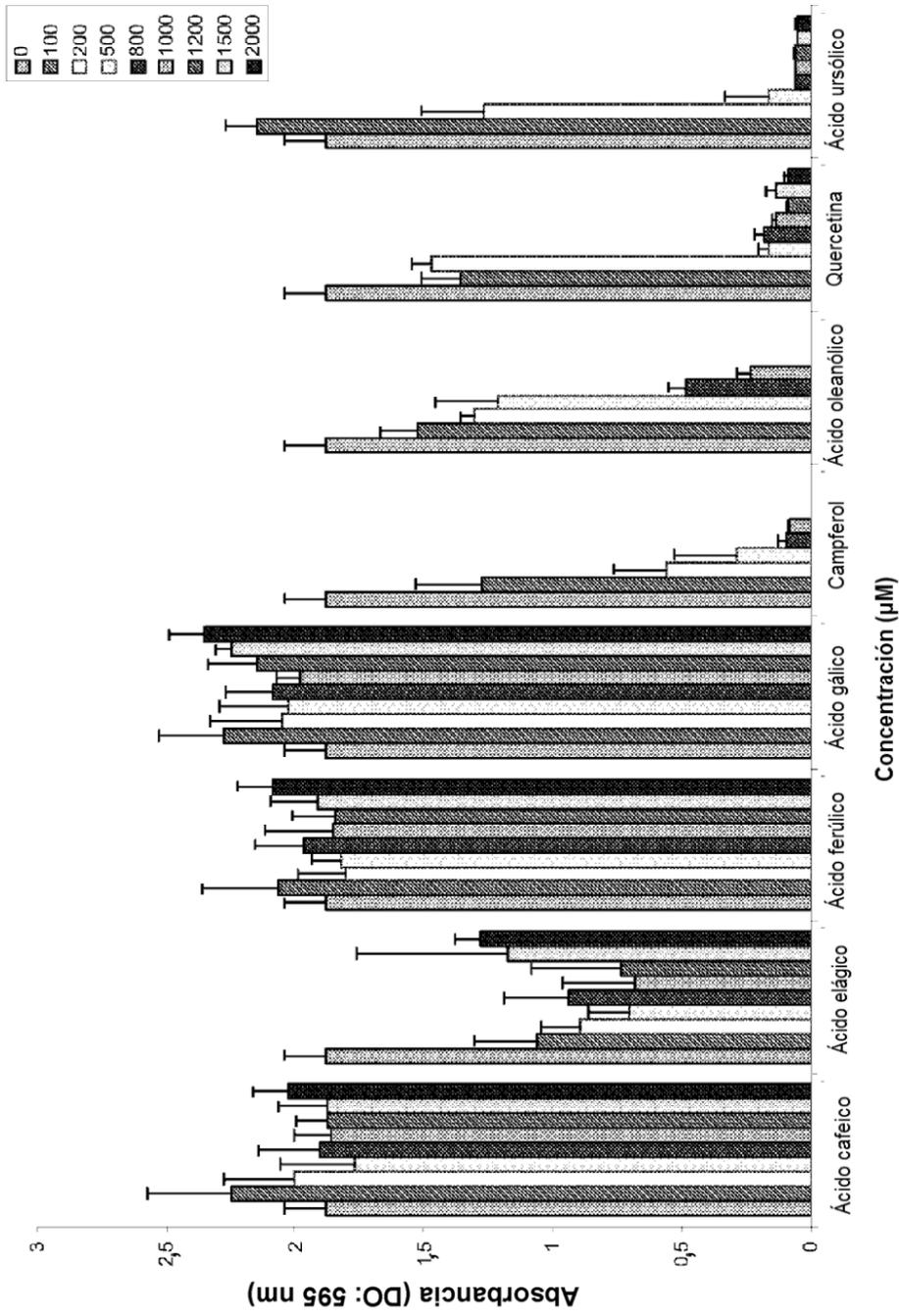
**FIG. 9**



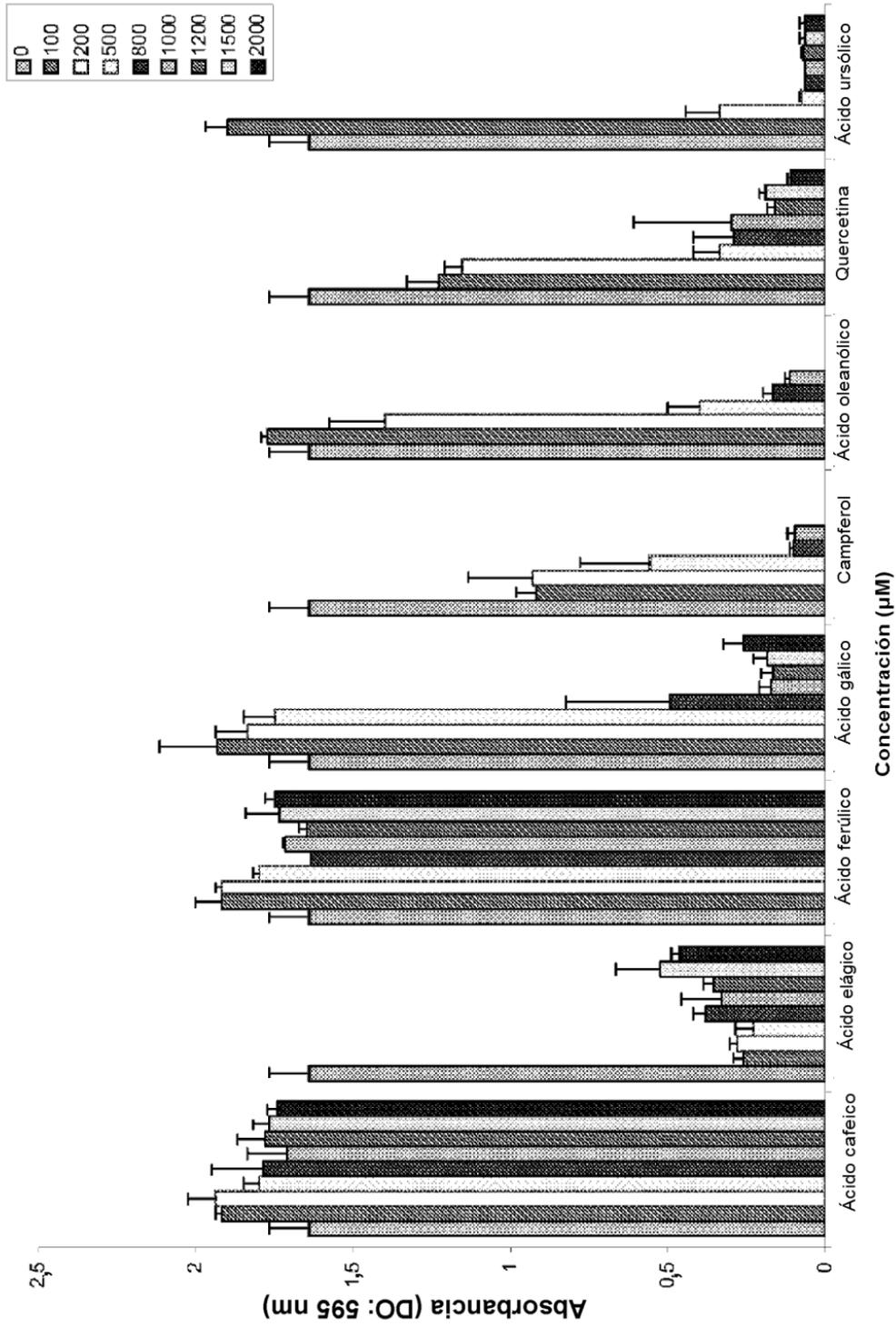
**FIG. 10**



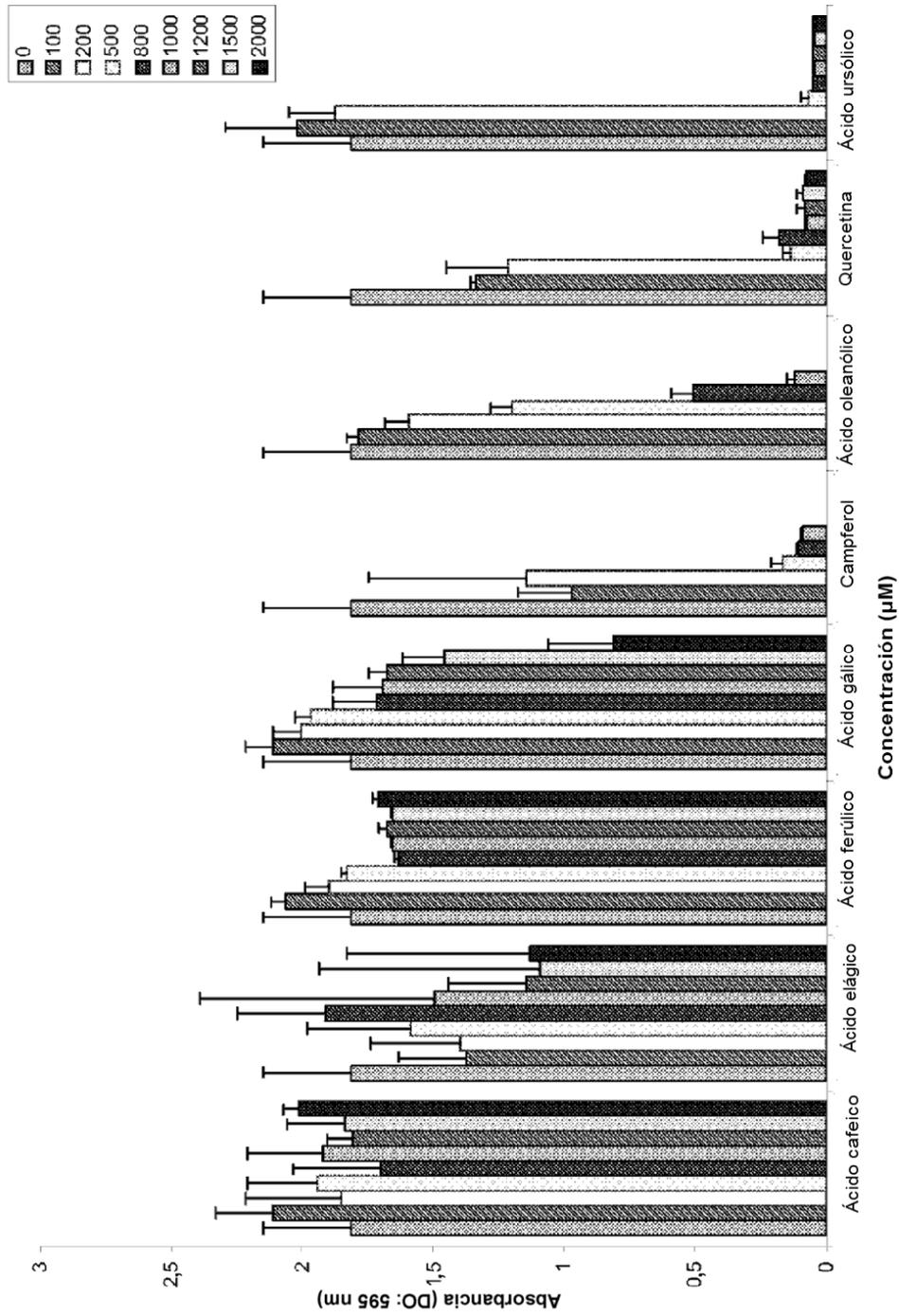
**FIG. 11A**



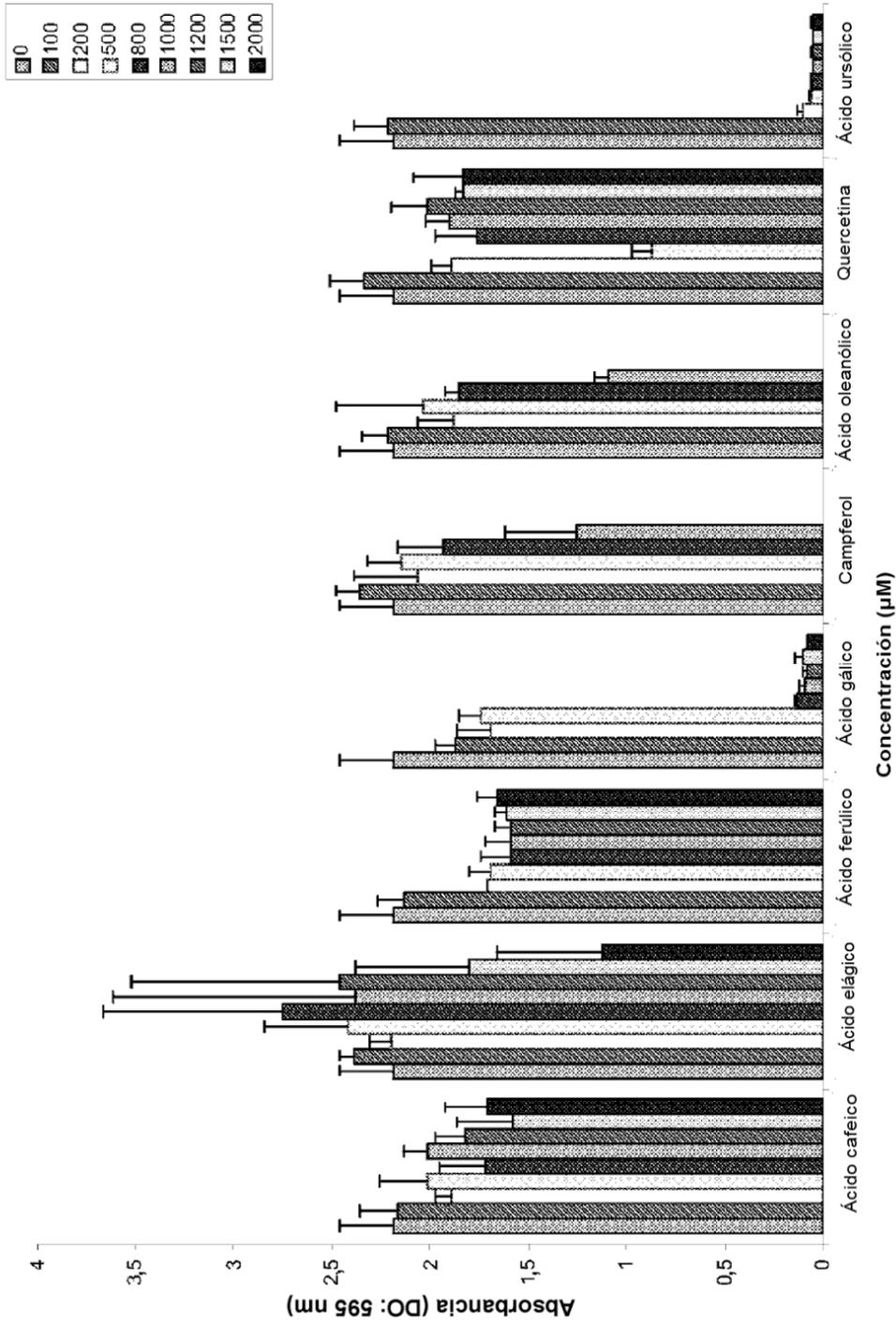
**FIG. 11B**



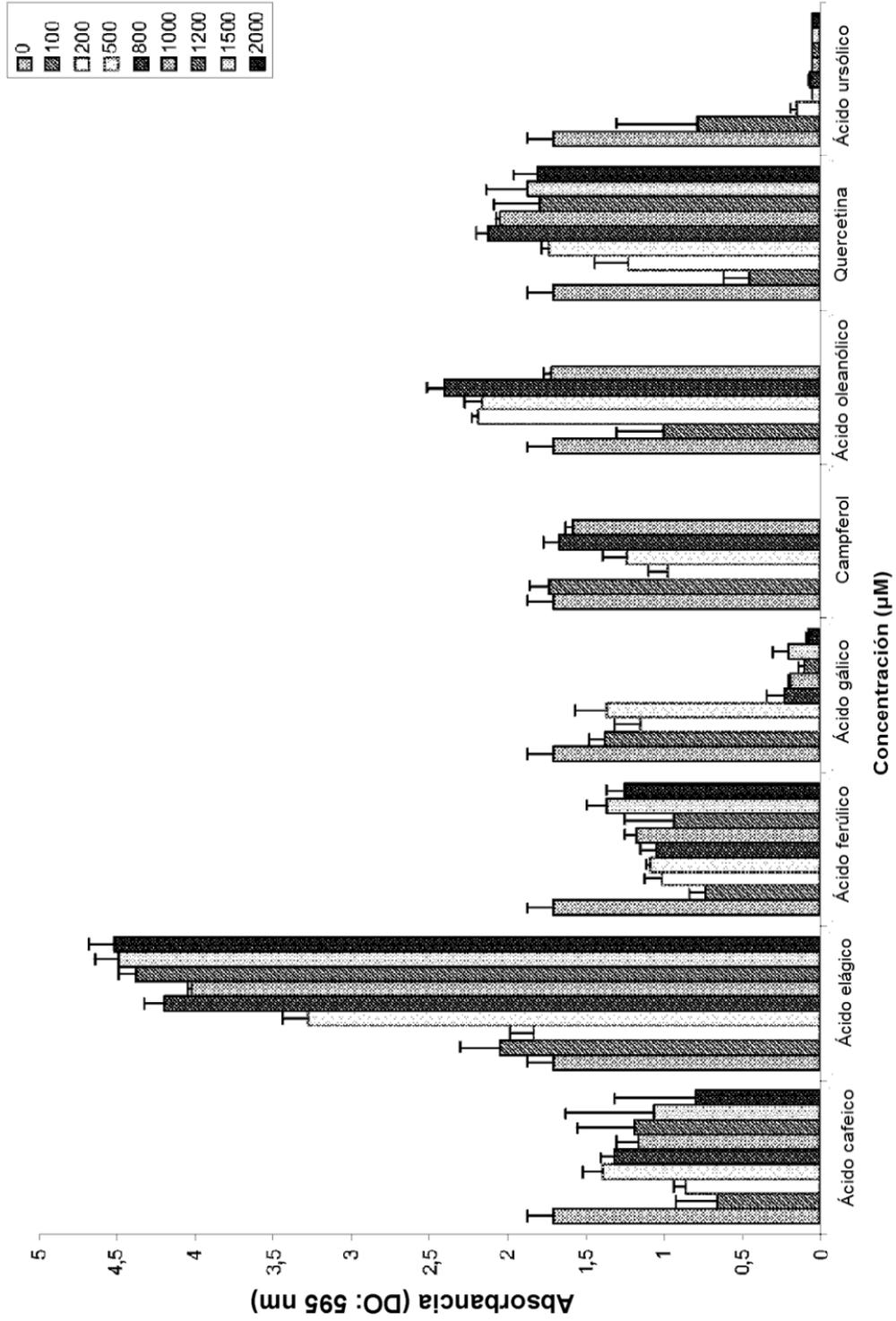
**FIG. 11C**



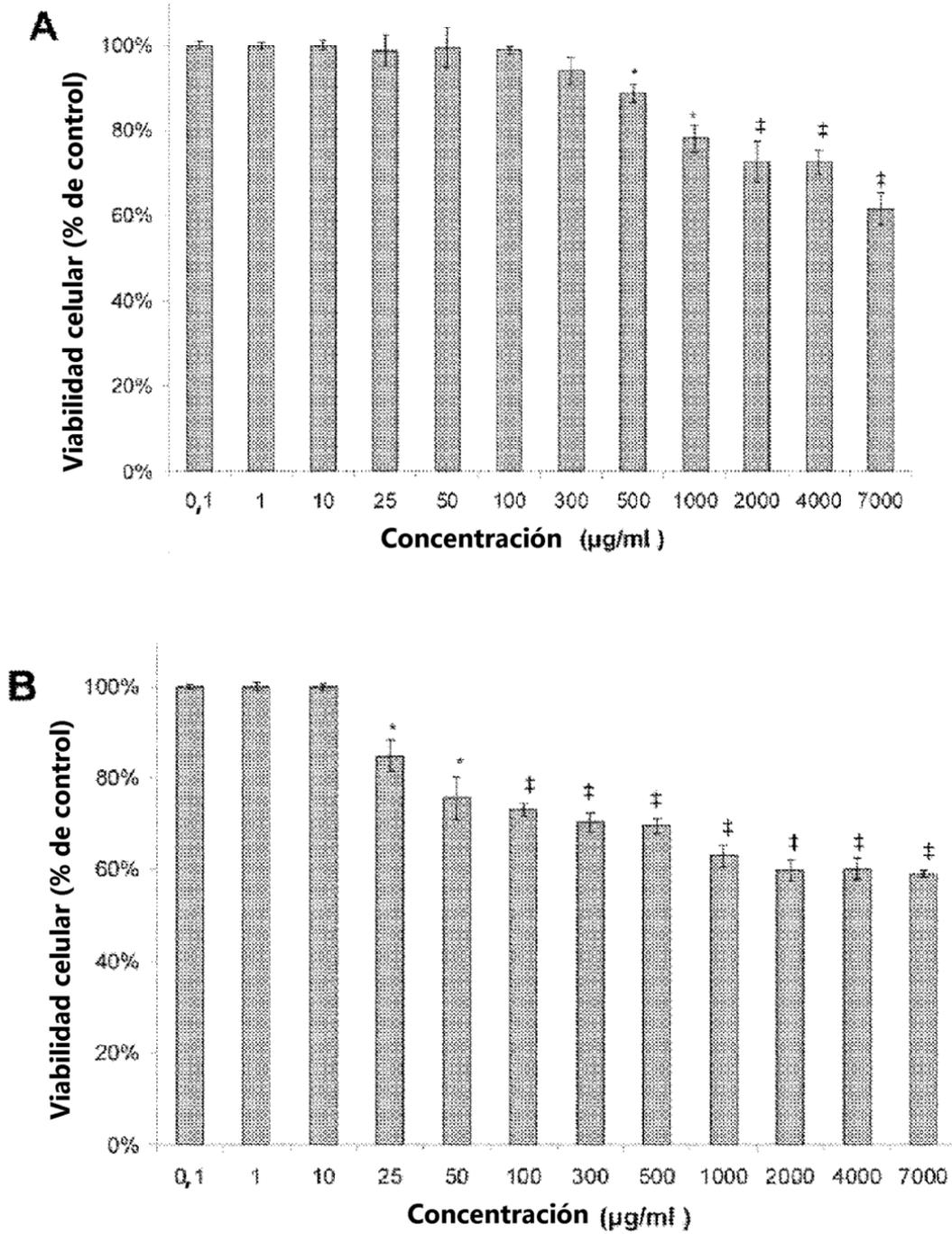
**FIG. 11D**



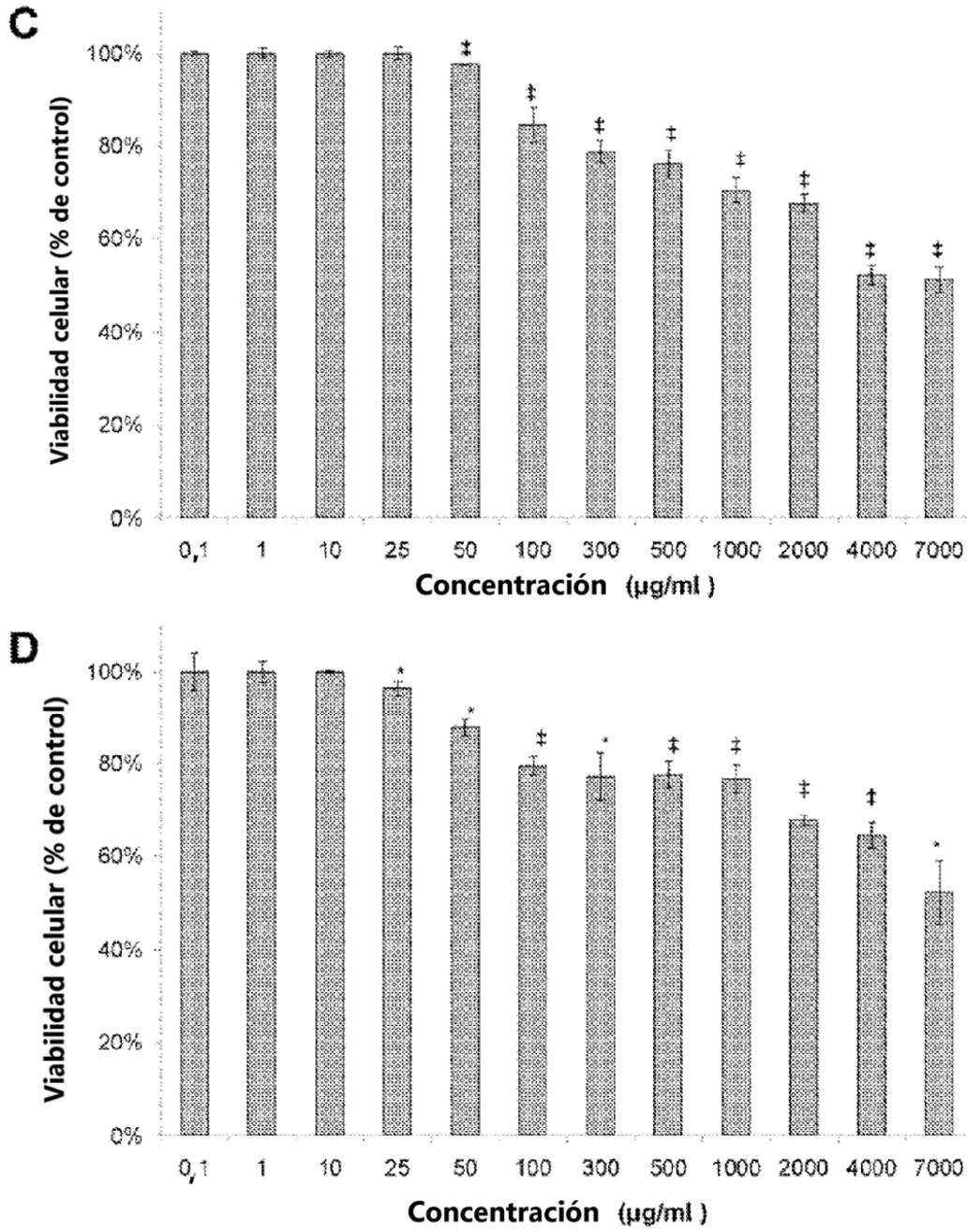
**FIG. 11E**



**FIG. 11F**



**FIG. 12**



**FIG. 12**