

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 082**

51 Int. Cl.:

A01N 25/28 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01N 57/20 (2006.01)

A01N 47/44 (2006.01)

A01N 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2008 PCT/US2008/065047**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09020689**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008 E 08756423 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2184979**

54 Título: **Procedimiento de control de protozoos que albergan bacterias**

30 Prioridad:

08.08.2007 US 835717

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

17.05.2019

73 Titular/es:

BL TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)

5951 Clearwater Drive

Minnetonka, MN 55341, US

72 Inventor/es:

WHITEKETTLE, WILSON KURT y

TAFEL, GLORIA JEAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 713 082 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

Procedimiento de control de protozoos que albergan bacterias

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere a procedimientos para controlar los trofozoítos de protozoos que transportan o albergan bacterias en sistemas acuosos. Más particularmente, las realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos para controlar las bacterias envueltas dentro de protozoos en forma amebode, incluyendo la bacteria *Legionella pneumophila*.

Antecedentes de la invención

10 Los patógenos bacterianos intracelulares, es decir, los patógenos bacterianos que habitan en otras células o microorganismos, son una causa importante de morbilidad y mortalidad humanas. Evadir entornos intracelulares hostiles es una de las formas en que los patógenos pueden vivir dentro de una célula hospedadora, crecer simbiótica o parasitariamente dentro de las células hospedadoras y, sin embargo, no ser destruidos o inhibidos por la célula hospedadora. Estos parásitos han desarrollado formas de interactuar y superar los mecanismos de defensa natural de las células hospedadoras.

15 *Legionella pneumophila*, una bacteria conocida por causar la enfermedad del legionario y la fiebre de Pontiac en seres humanos es un parásito de este tipo. Mientras que las células de *Legionella* se pueden destruir fácilmente si se exponen a ciertos agentes químicos y antibióticos, las *Legionella* también pueden encontrarse envueltas (fagocitadas) dentro de ciertos huéspedes de protozoos. Las *Legionella* se encuentran también a menudo en biopelículas adsorbidas a superficies sólidas en, por ejemplo, sistemas de distribución de agua, torres de enfriamiento, duchas, acuarios, rociadores, spas y baños de limpieza. Los protozoos son raspadores naturales sobre las superficies y envuelven y digieren las bacterias como parte de su ciclo de vida natural. En la mayoría de los casos, los protozoos digieren estas bacterias a través del uso de enzimas digestivas en sus fagosomas (vacuolas digestivas). En el caso de *Legionella*, sin embargo, este no es el caso. Los protozoos no son fácilmente capaces de degradar las células de *Legionella* envueltas, y de hecho, las *Legionella* crecen y aumentan su número mientras que
20 están protegidas dentro de los fagosomas de los protozoos. La legionelosis en los seres humanos se puede contraer respirando aerosoles con *Legionella* que contienen, ya sea las células bacterianas de crecimiento libre, o ya sea inhalando aerosoles de *Legionella* concentrada dentro de protozoos susceptibles. Un agente de control de *Legionella*, por lo tanto, debe ser capaz de destruir las *Legionella* de crecimiento libre, las *Legionella* dentro de protozoos, o los protozoos mismos. Los agentes descritos en la presente invención son capaces de destruir las
25 *Legionella* de crecimiento libre y los protozoos hospedadores. Dos especies de protozoos capaces de albergar *Legionella* infecciosas son *Acanthamoeba* y *Tetrahymena*.

30 Con el fin de controlar con eficacia la *Legionella*, además de destruir las de crecimiento libre o protozoos, se debe tener en cuenta un factor adicional. Ciertos protozoos, particularmente, las formas ameboides, han desarrollado mecanismos para sobrevivir en ambientes hostiles. Ejemplos de ambientes hostiles son la temperatura alta, desecación, presencia de agentes químicos/antibióticos, falta de fuentes de alimentación, etc. Al encontrarse con un ambiente hostil, estos protozoos vuelven a una forma de quiste que es muy difícil de destruir. La forma de quiste se vuelve mucho menos susceptible a los agentes químicos que destruyen fácilmente el mismo organismo cuando está en forma no quística (trofozoíto). La introducción de un agente de control químico para eliminar *Acanthamoeba* en realidad puede proporcionar un ambiente hostil al cual responde el protozoo volviendo a una forma de quiste,
35 volviéndolo invulnerable al agente químico. Cuando el quiste contiene el patógeno *Legionella*, el agente químico ya no puede alcanzar las bacterias envueltas, y el tratamiento químico se vuelve ineficaz. Como ejemplo, la cloración o blanqueo se considera esencial para controlar las *Legionella* en los sistemas de distribución de agua. Las *Legionella* expuestas se destruyen fácilmente con niveles bajos de cloro libre (0,2-0,5 µg/ml).

40 *Las Legionella* infecciosas también pueden estar contenidas en los fagosomas de *Acanthamoeba* si estos protozoos están presentes. La *Acanthamoeba*, al detectar la presencia de cloro, vuelve a una forma de quiste, preservando y protegiendo inadvertidamente los parásitos de *Legionella* envueltos en su interior. Los quistes de *Acanthamoeba* tratados con > 500 veces (>100 µg/ml de cloro "libre") la concentración requerida para destruir las formas de trofozoíto no se destruyen en la forma de quiste. Los quistes pueden volver a la forma de trofozoíto activo después de la eliminación del oxidante.

50 Actualmente, existen agentes desactivadores de quistes en uso comercial en este momento. Aunque se conocen los agentes de control o biocidas que destruyen o tratan eficazmente la bacteria *Legionella*, no existe ningún procedimiento actualmente en uso que proporcione los medios para introducir eficazmente los biocidas o agentes de control en los sistemas de agua en los que residen las bacterias *Legionella* y los protozoos que albergan la *Legionella* y los quistes. Los agentes de control que destruyen los protozoos que albergan la *Legionella* proporcionan
55 una herramienta adicional muy necesaria para salvaguardar la salud de los trabajadores y del público contra las neumonías respiratorias que pueden resultar de la inhalación de *Legionella* o quistes de protozoos que contienen la *Legionella*. Por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.579.859 desvela el uso de sales de fosfonio de fórmula general $(R_1)_3P+R_2\ominus X^-$ en la que R_1 es un grupo alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, R_2 es un grupo n-alquilo que da de 8 a

20 átomos de carbono y X es un anión que consiste en un haluro, sulfato, nitrato, nitrito, etc.

La publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/002710 enseña la exposición de los protozoos a sales de amonio cuaternario, mientras que la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0080142 desvela el uso de sales de guanidina o de biguanidina para controlar las bacterias de tipo *Legionella* en el estado de crecimiento libre así como cuando se envuelven en forma de trofozoíto o *Acanthamoeba* en forma de quiste.

Sin embargo, el procedimiento de introducir estos agentes en las bacterias *Legionella* ha sido una barrera, particularmente, bajo condiciones de trabajo reales. Por lo tanto, existe la necesidad de un medio para tomar los agentes biocidas conocidos, tales como aquellos citados anteriormente, y ponerlos en contacto con las bacterias *Legionella* de una manera que es eficiente y eficaz, y que será de uso comercial.

10 **Sumario de la invención**

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento para destruir trofozoítos de protozoos de acuerdo con la reivindicación 1.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos para controlar los trofozoítos de protozoos que transportan o albergan bacterias en sistemas acuosos. Más particularmente, las realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos para controlar las bacterias envueltas dentro de protozoos en forma ameboide, incluyendo la bacteria *Legionella pneumophila*.

La comprensión del solicitante subyacente a la invención es que, puesto que las bacterias *Legionella* se envuelven y protegen dentro de los fagosomas de los protozoos, un agente destructor, biocida o agente de control de *Legionella*, debe colocarse dentro de los protozoos, muy cerca de las células de *Legionella* sin causar que los protozoos crezcan en una fase de quiste. Los "biocidas" pretenden incluir, pero sin limitación, biocidas, composiciones de biocidas, agentes destructores, agentes de control y combinaciones de los mismos.

Una realización proporciona un procedimiento para controlar los trofozoítos de los protozoos que comprende encapsular un biocida, agente destructor o agente de control en una microcápsula o nanocápsula, y después introducir la microcápsula o nanocápsula en un sistema acuoso en cantidades eficaces. Las microcápsulas o nanocápsulas se producen y aplican en tamaños eficaces, es decir, de un tamaño para ser fagocitado por los protozoos, tal como de aproximadamente 0,025 a aproximadamente 10 micrómetros. La microcápsula o nanocápsula se produce de manera que tenga una composición exterior adaptada para la digestión por dichos protozoos. Los sistemas acuosos incluyen, pero sin limitación, sistemas de distribución de agua, torres de enfriamiento, duchas, acuarios, rociadores, spas y baños de limpieza. El biocida o agente se contiene dentro de un núcleo de liposoma acuoso o atrapado dentro de las capas lipídicas hidrófobas. Posteriormente, los liposomas se introducen en un sistema acuoso. Los liposomas son los cuerpos encapsulantes que contienen el biocida, o dichos liposomas que contienen el biocida pueden ser ellos mismos encapsulados adicionalmente, por ejemplo, por una cubierta fina de material protector. En este último caso, la cubierta puede, por ejemplo, estar compuesta para proporcionar una cobertura protectora temporal adicional para el liposoma, tal como una piel degradable, que mejora la vida útil del liposoma en el sistema de agua aunque se disuelve, se descompone o se deshace después de un cierto tiempo o bajo ciertas condiciones, liberando los liposomas que pueden actuar después en los organismos objetivo.

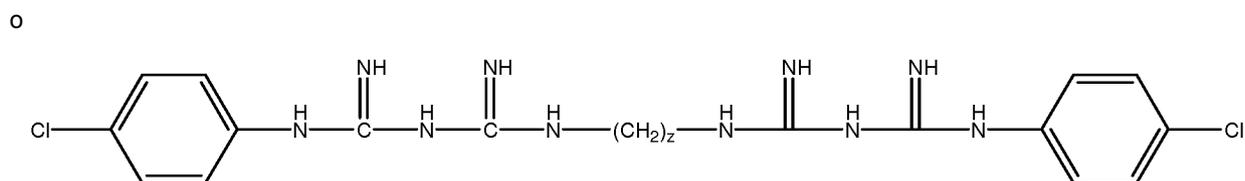
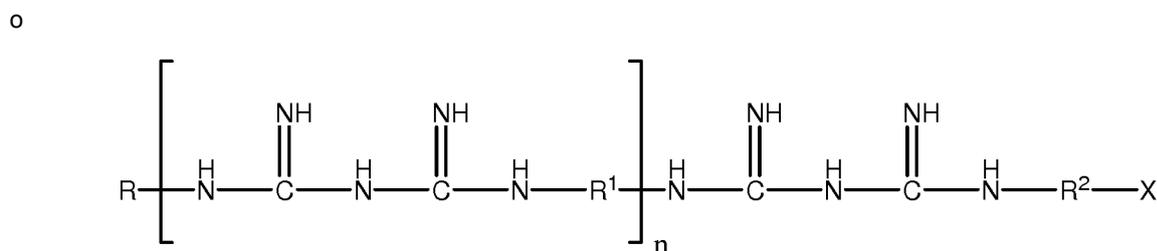
Las cantidades eficaces de la microcápsula o liposoma que contiene el biocida se introducen en un sistema acuoso que contiene protozoos infectados. Los protozoos activos, la fase de trofozoíto, después raspa las microcápsulas o liposomas, confundiendo los con las células bacterianas. Una vez incorporados en las células protozoarias, es decir, una vez que se han fagocitado, la descomposición enzimática natural de la microcápsula o liposoma que contiene el biocida por los protozoos dará como resultado la liberación del biocida, agente destructor o agente de control en alta concentración en los protozoos, en proximidad directa con la *Legionella* envuelta. La muerte rápida de la *Legionella* ocurrirá a continuación. La estructura de la superficie benigna del liposoma es adicionalmente ventajosa porque, a diferencia de un agente de control tradicional, no debe inducir la formación de quistes, lo que crea más barreras al tratamiento. En general, se espera que la capacidad de los agentes de control encapsulados para ser absorbidos específicamente y dirigirse a los protozoos, permita que se agregue una concentración relativamente baja de material de tratamiento a un sistema de fluido y que sea más eficaz que el uso de biocida libre, cuya eficacia depende de su nivel en el fluido como un conjunto. Las cantidades eficaces de microcápsula o liposoma que contiene el biocida dependerá del biocida o agente incorporado en el mismo. Sin embargo, cantidades eficaces incluyen de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 500 microgramos por mililitro, o alternativamente, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 microgramos por mililitro.

Este procedimiento conducirá también a la destrucción de los protozoos hospedadores por el biocida o agente. En el caso de que los protozoos estén ya en la fase de quiste, la adición de liposomas o microcápsulas preparadas con tamaño de las células bacterianas y las características de la membrana adecuadas puede inducir a los quistes a desenquistarse o volver a la fase de trofozoíto activo para aprovechar la nueva fuente de alimentación. En ese momento, ocurrirá a continuación el raspado y envoltura de los liposomas por los protozoos como se ha expuesto

anteriormente.

Los liposomas, que son sistemas en los cuales se agregan los lípidos a un tampón acuoso para formar vesículas, estructuras que encierran un volumen, pueden fabricarse mediante un procedimiento conocido. Dichos procedimientos pueden emplear, pero sin limitación, inyección, extrusión (por ejemplo, extrusión por presión de un biocida acuoso a través de una membrana porosa en el cuerpo lipídico o viceversa), sonicación, procesadores de microfluidos y mezcladores de rotor-estator. Los liposomas que contienen el biocida deberían producirse en tamaños que imitan las células bacterianas, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 15 μ, o alternativamente, de aproximadamente 0,1 a 10,0 μ. De manera similar, el agente puede ser encapsulado dentro de otras fases de aceite o similares a aceite mediante procedimientos de encapsulación conocidos, con el fin de tener una o más capas externas protectoras que definen la vida útil de la microcápsula, las características de administración y el entorno de utilización.

Cualquier biocida o agente destructor disponible podría usarse en los presentes procedimientos, que incluyen, pero sin limitación, sales de guanidina o de biguanidina, sales de amonio cuaternario y sales de fosfonio. Ejemplos de sales de guanidina o de biguanidina de fórmulas generales:



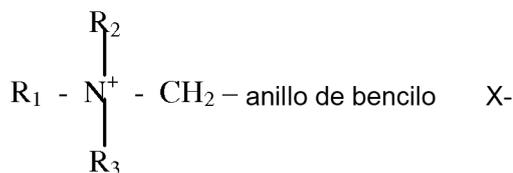
en la que R, R¹, R² son independientemente H, alquilo (lineal o ramificado) o arilo C₁-C₂₀ sustituido o no sustituido, X es un ácido orgánico o inorgánico, n es 0-20 y z es 1-12.

Los ejemplos de fórmula general de las sales de fosfonio aceptables comprenden (R₁)₃P+R₂X⁻ en la que R₁ es un grupo alquilo de 1 a 8 átomos de carbono, R₂ es un grupo n-alquilo que da de 8 a 20 átomos de carbono y X es un anión que consiste en un haluro, sulfato, nitrato, nitrito y combinaciones de los mismos.

Una fórmula alternativa proporciona que R₁ es un grupo alquilo que tiene de 1-8 carbonos, R₂ es un grupo n-alquilo que tiene 6-20 grupos de carbono y X⁻ es un anión tal como haluros, sulfatos, nitratos, nitritos y mezclas de los mismos. Preferentemente, X⁻ es cloruro, bromuro, yoduro, SO₄²⁻, y NO₃⁻, NO₂⁻ o mezclas de los mismos.

Otra realización proporciona que R₁ y R₂ son grupos hidroxialquilo que tienen de 1-4 carbonos y X⁻ es un anión tal como haluros, sulfatos, nitratos, nitritos y mezclas de los mismos. Preferentemente, X⁻ es cloruro, bromuro, yoduro, SO₄²⁻, y NO₃⁻, NO₂⁻ o mezclas de los mismos.

Las sales de amonio cuaternario son otro ejemplo de un biocida o agente que puede encapsularse o fabricarse en un núcleo de liposoma, y son de fórmula general



en la que R₁ es un grupo n-alquilo de longitud de cadena C₈-C₁₈; R₂ y R₃ son CH₃ o un grupo n-alquilo de longitud de cadena C₂-C₈ y X⁻ es un anión tal como haluros, sulfatos, nitratos, nitritos y mezclas de los mismos.

5 Una realización alternativa de la presente invención proporciona un procedimiento para controlar otras especies bacterianas o protozoos portadores de infecciones, que incluyen, pero sin limitación, aquellos que dan como resultado la disentería amebiana, malaria, giardiasis, tricomoniasis, Criptosporidiosis y otros protozoos patógenos. Además, los liposomas o microcápsulas que contienen el biocida pueden usarse en una medida de solución de problemas o proactiva, tratando los sistemas acuosos no infectados para que estén listos para atacar tan pronto como los protozoos infectados comienzan a aparecer en números infectivos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de destrucción de trofozoítos de protozoos que comprende encapsular al menos un biocida o al menos una composición de biocida en una microcápsula o nanocápsula que tiene una composición exterior adaptada para la digestión por dichos protozoos, e introducir las microcápsulas o nanocápsulas que contienen el biocida en un sistema acuoso en una cantidad eficaz de 0,05 a 500 microgramos por mililitro, que comprende fabricar un liposoma que incorpora un biocida en su núcleo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos protozoos contienen bacterias de tipo *Legionella*.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el biocida se selecciona del grupo que consiste en sales de guanidina o de biguanidina, sales de amonio cuaternario y sales de fosfonio.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cantidad eficaz del biocida introducido en el sistema acuoso es de 0,1 a 100 microgramos por mililitro.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sistema acuoso se selecciona entre el grupo que consiste en sistemas de distribución de agua potable y no potable, torres de enfriamiento, duchas, acuarios, rociadores, spas, tuberías y baños de limpieza.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las cápsulas se producen y aplican en tamaños de 0,025 a 10 micrómetros.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los liposomas se producen y aplican en tamaños de diámetro de 0,025 a 10 micrómetros.