



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 247 085**

⑤① Int. Cl.⁷: **A01N 25/32**, A61K 38/43
A61K 38/46, A61K 33/32
A62D 3/00, A01N 63/00
// (A01N 63/00, A01N 61:00
A01N 57:20, A01N 33:12
A01N 31:16)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **01918985 .1**

⑧⑥ Fecha de presentación : **01.02.2001**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1251735**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **30.10.2002**

⑤④ Título: **Sistema de descontaminación química y biológica.**

③⑩ Prioridad: **01.02.2000 US 179499 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2006

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2006

⑦③ Titular/es: **TIAX, L.L.C.**
20 Acorn Park
Cambridge, Massachusetts 02140, US

⑦② Inventor/es: **Conerly, Lisa, L.;**
Ehnholt, Daniel, J.;
Louie, Alan, S. y
Whelan, Richard, H.

⑦④ Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 247 085 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

Sistema de descontaminación química y biológica.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones no corrosivas, no inflamables y no tóxicas eficaces para descontaminar patógenos biológicos, y combinaciones tanto de agentes químicos tóxicos como patógenos biológicos. Estas composiciones son útiles en diversas aplicaciones en las que pueden existir problemas de contaminación tóxica química o biológica. Las presentes composiciones son particularmente adecuadas para la descontaminación de agentes de armas biológicas y combinaciones de agentes de armas químicas y biológicas. Las composiciones son particularmente eficaces para descontaminar el gas nervioso Sarín (GB) y el agente de arma biológica Antrax.

15 Antecedentes de la invención

El posible uso de armas químicas y/o biológicas durante una acción militar o ataque terrorista representa una amenaza continua para el personal militar y la población civil de EE.UU. Los avances en el campo de la biotecnología y la consiguiente facilidad para preparar cantidades significativas de agentes infecciosos y toxinas biológicas han aumentado la amenaza de armas químicas y biológicas.

El ántrax ha sido identificado como una de las amenazas terroristas con armas biológicas más probables. Típicamente, el ántrax se diseminaría como un aerosol en un ataque terrorista. La tasa de mortalidad de los individuos expuestos y no tratados es superior a un 90% y se supone que actuaría en un plazo de 1 a 7 días, produciéndose la mayoría de los fallecimientos en un plazo de 48 horas. Las esporas de ántrax son sumamente resistentes y pueden persistir en el medio ambiente durante más de 50 años. Muchos descontaminantes de agentes de armas biológicas no son eficaces contra las esporas de ántrax.

En caso de un ataque en el que se utilicen armas químicas y/o biológicas, el personal militar de EE.UU o los primeros civiles que respondan a la emergencia pueden quedar expuestos directamente a estos agentes cuando entran en las áreas contaminadas. Actualmente existen varios descontaminantes disponibles. Sin embargo, estos descontaminantes generalmente son por sí mismos materiales peligrosos de manipular y desechar y pueden no ser eficaces contra algunos agentes. Además, los descontaminantes actuales sólo son estables durante períodos de tiempo muy limitados. Por otra parte, los contaminantes actuales típicos son eficaces sólo contra agentes químicos o sólo contra agentes biológicos, pero no contra ambos a la vez. En consecuencia, la protección de poblaciones vulnerables requiere el almacenamiento y distribución de diferentes tipos de agentes protectores para defender a estas poblaciones frente a diferentes ataques.

Recientemente, además de los agentes de armas biológicas típicos, otra amenaza consiste en el uso de microorganismos o toxinas derivadas de microorganismos que provocan enfermedades en personas, plantas o animales. Los descontaminantes anteriores están concebidos específicamente para ser usados contra agentes de armas biológicas y no son adecuados contra muchos otros tipos de patógenos que pueden emplearse.

El documento WO 00/64539 A describe una composición que comprende una mezcla de enzimas y sustratos para la eliminación, descontaminación y neutralización de compuestos OP. La mezcla de enzimas comprende colina-esterasas (ChEs) y/o OP-hidrolasas y reactivadores tales como oximas, incluyendo oximas mono-dicuaternarias. En mediciones de constantes cinéticas, es decir, para medios diagnósticos, se utiliza el MEPQ como compuesto organofosforoso para determinar los sitios activos de ChEs inmovilizado o soluble por titulación.

K.E. LeJeune y col., en *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 62, nº 6, pp. 659-665 (1999), describen el uso de una espuma que contiene enzimas para la destoxificación de armas químicas, en particular neurotoxinas organofosforosas. Se examina la incorporación de OPH en espumas. Se menciona que la OPH tiene una actividad limitada en diversos agentes OP tóxicos y que “esta cuestión se está tratando actualmente mediante la producción de espumas con múltiples enzimas de especificidad variable”.

Existe la necesidad de composiciones no peligrosas que sean eficaces para descomponer agentes de armas químicas y biológicas. También existe la necesidad de composiciones que permanezcan estables durante períodos de tiempo prolongados y que se distribuyan fácilmente sobre grandes áreas superficiales. Además existe la necesidad de una composición única que sea eficaz contra agentes de armas tanto químicas como biológicas. Por otra parte también existe la necesidad de una composición que sea eficaz contra todos los tipos de patógenos, y no sólo agentes de armas biológicas.

60 Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición de descontaminación de armas químicas y biológicas de acuerdo con la reivindicación 1, y un kit para la descontaminación de agentes químicos y patógenos biológicos de acuerdo con la reivindicación 14. Las subreivindicaciones indican realizaciones preferentes.

La presente invención proporciona una composición tal como se indica en la reivindicación 1. La composición es eficaz para descontaminar patógenos biológicos y para descontaminar combinaciones de agentes químicos y patógenos

ES 2 247 085 T3

biológicos. Tal como se utiliza aquí, la expresión “patógeno biológico” incluye cualquier microorganismo o toxina derivada de un microorganismo que provoque enfermedades en personas, plantas o animales, e incluye agentes de armas biológicas. Tal como se utiliza aquí, la expresión “agente químico” incluye sustancias químicas previstas para matar, herir gravemente o incapacitar a personas a través de sus efectos fisiológicos.

5

En las subreivindicaciones 2 a 13 se indican realizaciones preferentes de la invención. La presente invención también proporciona un kit tal como se indica en la reivindicación 14, y las subreivindicaciones 15 ó 26 indican realizaciones preferentes del mismo.

10 Las composiciones de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones en las que puede haber problemas de contaminación tóxica química o biológica. Estas composiciones son particularmente útiles para ser utilizadas contra agentes de armas biológicas y agentes de armas químicas y biológicas combinadas.

15 Las composiciones descontaminantes combinadas de patógenos químicos y biológicos de la presente invención son químicamente compatibles y en general comprenden como mínimo un componente biocida y una enzima activa contra agentes químicos organofosforosos tal como se define en la reivindicación 1. Preferentemente, estas composiciones también incluyen una solución tamponada o un material formador de espuma para facilitar su distribución sobre grandes áreas superficiales, y una proteína de unión a los agentes químicos.

20 El componente biocida comprende un biocida conocido, o preferentemente una mezcla de biocidas conocidos, que se define en la reivindicación 1 y que es eficaz contra bacterias y otros microorganismos presentes en patógenos biológicos. Por ejemplo, los biocidas útiles pueden incluir triclosán, sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio (THPS), cloruro de benzalconio (BAC) y estreptomina. El triclosán es una sustancia química antibacteriana de amplio espectro utilizada en diversos productos comerciales. El THPS es un biocida de amplio espectro aprobado por la EPA utilizado en diversos procesos industriales. El BAC es un biocida de amplio espectro utilizado en desinfectantes comerciales. La estreptomina es un antibiótico basado en su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas. En una realización particularmente preferente, la mezcla de biocidas comprende combinaciones de triclosán, THPS y BAC.

30 Las proteínas de unión actúan uniéndose y preferentemente desnaturalizan o, de otro modo, neutralizan los agentes químicos, y se pueden seleccionar entre las proteínas de unión conocidas en la técnica. Algunas proteínas adecuadas pueden incluir albúmina, por ejemplo seroalbúmina bovina (BSA), acetilcolina-esterasa (AChE), butilcolina-esterasa (BuChE), colina-esterasa (ChE), quimotripsina, tripsina, quimotripsinógeno, tripsinógeno, uroquinasa, esterasa, carboxil-esterasa, trombina, factor VII_A, factor X_A, calicreína, precalicreína, Na/K-ATPasa, papaína y fosfatasa alcalina. Preferentemente, la proteína es seroalbúmina bovina.

40 Se utilizan enzimas activas contra especies organofosforosas. Estas enzimas son conocidas y pueden incluir, por ejemplo, glucosa-oxidasa, enzimas lisantes, lisozima, proteasa, quitinasa, lisostafina, mutanolisina, collagenasa, SynthaseCLEC-GO (Altus, Inc., Cambridge, MA) y PeptiCLEC-TR (Altus, Inc., Cambridge, MA). La quitinasa es una enzima que hidroliza la N-acetal-D-glucosamina de las paredes celulares. La lisozima es una enzima que hidroliza componentes de la pared celular (uniones β -1,4-glucosídicas). La mutanolisina es una enzima específica gram-positiva que hidroliza componentes de la pared celular. Además, la organofosfato-hidrolasa (OPH) y el ácido organofosforoso-anhidrasa (OPAA) son enzimas capaces de destoxificar neurotoxinas organofosforosas. Preferentemente se utilizan OPAA u OPH, siendo especialmente preferente la OPAA.

45

Como material formador de espuma se puede utilizar cualquier espuma de extinción de incendios conocida, por ejemplo espuma Silv-Ex™ (Ansul Incorporated, Marinette, WI), espuma filmógena acuosa (AFFF- Aqueous Film-Forming Foam) y fluoroproteína filmógena (Film-Forming Fluoroprotein - FFFP). También se pueden utilizar otros materiales de espuma, incluyendo, por ejemplo, espumas sólidas como poliuretanos y esponjas. Preferentemente, la presente composición está contenida en una espuma de extinción de incendios Silv-Ex™, que no interfiere en las funciones de unión de las proteínas, en la actividad enzimática contra agentes químicos o en la actividad del biocida o biocidas contra patógenos biológicos, incluyendo células, esporas, virus y parásitos.

55 Preferentemente, la presente composición se mantiene en niveles de pH adecuados para una descontaminación óptima. Preferiblemente, la composición se mantiene a un nivel de pH entre 6,0 y 8,5. Para ello se puede añadir cualquier tampón adecuado conocido, incluyendo, por ejemplo, tampones fosfato, carbonato, tris, MES, PIPES, ACES, MOPS, TES, HEPES, HEPPS, TRICINA y glicina. Preferentemente se utiliza un tampón fosfato.

60 Además de los componentes arriba indicados también se pueden añadir trazas de metales, por ejemplo MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, CdCl₂, CoCl₂, CuCl₂ o FeCl₂ para incrementar la actividad enzimática. Una traza metálica particularmente preferente es cloruro de manganeso.

65 Preferentemente, la composición se guarda en dos recipientes independientes para lograr una mayor estabilidad antes de su uso. Preferiblemente, un recipiente contiene la mezcla de biocidas. En este recipiente también se añade, preferentemente, un material formador de espuma. Esta mezcla de biocida y material formador de espuma tiene una vida útil en depósito de como mínimo 12 meses a temperatura ambiente. El segundo recipiente contiene preferentemente los componentes enzimáticos y proteicos. El contenido del segundo recipiente es estable durante como mínimo 6 meses a temperaturas de 2-4°C. El contenido de los dos recipientes se puede mezclar para llevar a cabo una des-

contaminación combinada tanto de agentes químicos como de patógenos biológicos, o, si así se desea, el contenido del recipiente de biocida se puede utilizar solo. Una vez mezclado el contenido de los dos recipientes para obtener la composición de la presente invención, la mezcla permanecerá estable durante como mínimo 24 horas a temperatura ambiente.

5

A continuación se describen otros aspectos de la invención.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona una composición eficaz para la descontaminación de agentes químicos y patógenos biológicos.

Las composiciones descontaminantes de patógenos químicos y biológicos combinados de la presente invención son químicamente compatibles y comprenden un componente biocida y una enzima tal como se define en la reivindicación 1. Las composiciones también pueden incluir un material formador de espuma y/o una proteína de unión a los agentes químicos.

15

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar en la descontaminación de agentes químicos y patógenos biológicos, incluyendo: GA, GB, GD, GF, VX y gas mostaza, y ántrax, peste, turalemia, cólera, *E. coli* 0157:H7 y *Shigella*, respectivamente. En particular, la presente composición es eficaz para descontaminar el gas nervioso Sarín (GB) y el agente de arma biológica Ántrax.

20

Se pueden utilizar diversas enzimas, incluyendo, por ejemplo, glucosa-oxidasa, enzimas lisantes, lisozima, proteasa, quitinasa, lisostafina, mutanolisina, colagenasa, SynthCLEC-GO y PeptiCLEC-TR. También se puede utilizar organofosfato-hidrolasa (OPH) y preparaciones de ácido organofosforoso-anhidrasa (OPAA), enzimas conocidas por su actividad contra especies organofosforosas (véase, por ejemplo, DeFrank and Cheng, *Purification and Properties of an Organophosphorous Acid Anhydrase from a Halophilic Bacterial Isolate*, Journal of Bacteriology, pp. 1938-1943 (Marzo de 1991)).

25

Estas enzimas están disponibles en diferentes formas, incluyendo formas específicas que proporcionan una mayor estabilidad en entornos con condiciones rigurosas. Por ejemplo, las enzimas se pueden encontrar en forma de cristales enzimáticos reticulados (CLEC), que contienen matrices de la enzima cristalizada reticuladas para mantener la estructura física, la configuración y la actividad enzimática. Estas enzimas pueden poseer una estabilidad elevada, tanto en almacenamiento como en una matriz activa, y gran resistencia frente a la digestión por otras enzimas.

30

Preferentemente, la enzima es una enzima activa contra agentes químicos organofosforosos.

35

El descontaminante de agentes químicos también puede comprender proteínas que se cree, sin aludir a ninguna teoría en particular, se unen a agentes químicos. Estas proteínas de unión se pueden seleccionar de entre las proteínas de unión conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las siguientes: albúmina, por ejemplo BSA, AChE, BuChE, ChE, quimotripsina, tripsina, quimotripsinógeno, colagenasa, tripsinógeno, uroquinasa, esterasa, carboxil-esterasas, trombina, factor VII_A, factor X_A, calicreína, precalicreína, Na/K-ATPasa, papaína y fosfatasa alcalina.

40

Preferiblemente, estas proteínas no interfieren en la actividad de las enzimas y biocidas de la composición. Por consiguiente, cuando se testen las posibles proteínas es importante analizar no sólo qué proteínas de unión son eficaces para unirse a agentes químicos, sino también qué proteínas no interfieren en la actividad de las enzimas y biocidas de la composición. Algunas proteínas de unión preferentes incluyen albúminas, en particular BSA.

45

El Sarín (GB) es un agente de armas químicas basado en organofosforosos muy conocido. El fluorofosfato de diisopropilo (DFP) es un compuesto organofosforoso menos tóxico y posee propiedades químicas estrechamente relacionadas con el Sarín. Muchos materiales con actividad contra DFP también serán activos contra otros agentes G, como VX, además del Sarín. Por consiguiente, cuando se analizan las enzimas durante las pruebas con frecuencia se utiliza DFP como sucedáneo del Sarín.

50

La estrategia general para descontaminar agentes químicos sigue dos direcciones: (1) descontaminación cuantitativa, inhibición competitiva directa del agente de unión a acetilcolina-esterasa (AChE); y (2) descontaminación catalítica, desactivación y digestión del agente mediante enzimas digestivas. La descontaminación cuantitativa evita la acción de los agentes químicos en humanos, mientras que la descontaminación catalítica conduce a una actividad y una descontaminación catalítica prolongadas en el tiempo.

55

Durante los procedimientos de descontaminación cuantitativa se evaluaron materiales en cuanto a su impacto directo en el sucedáneo de agente de arma química DFP, utilizando el ensayo de Ellman (véase Ellman, G.L., Courtney, D., Andres, Jr., V. y Featherstone, R.M., *A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity*, Biochemical Pharmacology, vol. 7, pp. 88-95 (1960)), para determinar su capacidad para inhibir DFP.

60

Durante los estudios iniciales se ensayaron posibles materiales formadores de espuma, biocidas y proteínas para ver si alguno de estos componentes proporcionaba una inhibición adicional de agentes químicos. Estos estudios

demonstraron que Silv-Ex™, triclosán, THPS y BAC no inhibían el agente químico DFP, mientras que la proteína enlazante seroalbúmina bovina (BSA) proporciona una inhibición de DFP adicional.

Después de los estudios iniciales se evaluaron OPH, preparaciones de OPAA y enzimas colagenasa en cuanto a su inhibición directa de DFP. Adicionalmente se analizó BSA, una posible proteína de unión para utilizarla en la composición, y espuma FFFP, un posible material formador de espuma para utilizarlo en la composición, para determinar si alguno de los dos materiales contribuía a la inhibición de DFP. En base a sus composiciones de fluoroproteína, se cree que la espuma FFFP, como la BSA, podrían proporcionar una actividad protectora similar a la demostrada por la BSA en los estudios iniciales. Los resultados de ensayo, como se exponen en el Ejemplo 3, demuestran que tanto la OPH como la OPAA son capaces de producir una inhibición significativa de DFP. La colagenasa sólo inhibió moderadamente el DFP en concentraciones de 3 mg/ml o superiores. Además, aunque la espuma FFFP no mostró ningún efecto contra DFP, la BSA mostró cierta inhibición de DFP. Los otros materiales ensayados no mostraron ninguna inhibición adicional de DFP. Era de esperar que otros materiales activos produjeran un efecto protector para impedir que el DFP inhibiera la AChE presente en el ensayo de Ellman. Se demostró que la BSA era capaz de una unión cuantitativa a agentes de tipo G. Conjuntamente con métodos de descontaminación enzimáticos, se espera que la BSA desempeñe una serie de funciones, incluyendo la eliminación de agentes químicos residuales por unión directa, estabilización de otros componentes proteínicos y prevención de pérdidas enzimáticas por neutralización superficial.

En la utilización de métodos basados en enzimas son particularmente importantes la eficacia, la estabilidad tanto de almacenamiento como en matriz activa, la compatibilidad con otros descontaminantes y el coste. Además, en el desarrollo de sistemas descontaminantes basados en múltiples enzimas se plantea el problema de la posibilidad de interacción entre los materiales enzimáticos activos, que puede conducir a una autoinactivación. Por consiguiente, en el Ejemplo 4 se analizó una serie de enzimas para determinar el impacto de éstas sobre la acetilcolina-esterasa (AChE). Como se puede observar, la glucosa-oxidasa, la enzima de lisis, la lisozima, la proteasa y la syntaCLEC-GO demostraron un impacto significativo en el ensayo de Ellman en términos de reducción de la actividad enzimática de AChE. La quitinasa, la lisostafina y la mutanolisina también demostraron interferir con la enzima AChE.

Otra cuestión importante en el desarrollo de una espuma descontaminante de patógenos químicos y biológicos multi-componente consiste en el impacto potencial (positivo o negativo) del material formador de espuma en la actividad enzimática. En el Ejemplo 5, las enzimas se analizaron en cuanto a la interferencia debida a la espuma Silv-Ex™. Se demostró que Silv-Ex™ puede interferir potencialmente en la actividad de algunas enzimas, aunque los resultados sugieren que la interferencia se produce principalmente debido a una reducción de la actividad enzimática posible por la precipitación de la enzima. Aunque en los casos de la quitinasa, la enzima de lisis y la mutanolisina se conservó toda la actividad, en los casos de la glucosa-oxidasa, la lisozima, la proteasa y la syntaCLEC-GO sólo se observó una actividad parcial.

Durante todos los ensayos de las diversas enzimas, tanto las preparaciones de OPAA como las preparaciones de OPH dieron resultados favorables en su utilización como enzimas descontaminantes. Sin embargo, se comprobó que los biocidas descontaminantes de patógenos biológicos interferían con la actividad de OPH. En consecuencia, las preparaciones de OPAA son enzimas preferentes para ser utilizadas en composiciones descontaminantes de agentes biológicos y químicos que contengan componentes biocidas. Además, debido a los avances técnicos en la expresión de la enzima OPAA, la OPAA puede ser una enzima particularmente preferente para la presente invención.

La enzima utilizada está presente preferentemente en una composición simple en una concentración entre 0,1 y 350 mg/l. Preferentemente, la enzima está presente en una concentración de entre 1,6 y 70 mg/l. En especial, la enzima utilizada está presente en una concentración entre 3,3 y 12 mg/l. Tal como se utiliza aquí, "mg/l" se refiere a miligramos de enzima por litro de solución de espuma de concentración simple. Preferentemente, la proteína de unión se añade a la presente composición en cantidades entre 0,001 y 40 g/l, en especial entre 0,005 y 10 g/l y en particular entre 0,01 y 1,0 g/l. Tal como se utiliza aquí, "g/l" se refiere a gramos de proteína de unión por litro de material formador de espuma de concentración simple.

La composición descontaminante de patógenos biológicos de la presente invención comprende como mínimo un biocida, de forma especialmente preferente una mezcla de biocidas. Actualmente se utiliza una serie de biocidas químicos para eliminar bacterias en aplicaciones comerciales, incluyendo, por ejemplo, cloruro de benzalconio (BAC), sulfato de tetraquihidroximetilfosfonio (THPS), sulfato de tetraquis(hidroximetil)fosfonio, triclosán {2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter}, estreptomycin, Sodium omadine®, diclorofeno y bisticianato de metileno. Todos estos biocidas se pueden utilizar en la composición descontaminante de patógenos biológicos. Los biocidas comerciales ofrecen una serie de ventajas, incluyendo una eficacia de amplio espectro contra diversas clases de bacterias, actividad a niveles de ppm, y registro previo de fabricante para uso por la FDA, la EPA o ambas.

En el desarrollo de descontaminantes de patógenos biológicos, los estudios experimentales se centraron en el ensayo de sucedáneos tanto de esporas de ántrax como de células vegetativas. Aunque reconociendo que las esporas son la principal forma de convertir el ántrax en un arma, se investigó la evaluación de células vegetativas para poder comprender mejor la susceptibilidad de los bacilos. En los primeros intentos de desarrollo de opciones tanto de detección como de descontaminantes contra el ántrax se utilizó *Bacillus globigii* como sucedáneo del ántrax. Esta bacteria sucedánea no es patogénica y forma esporas físicamente similares al *Bacillus anthracis* (ántrax). Adicionalmente, para aumentar la eficacia de los ensayos también se probaron otros sucedáneos biológicos apropiados de ántrax. En consecuencia, los ensayos se ampliaron para incluir una serie de especies de bacilos relacionadas más estrechamente con

el ántrax. Los investigadores de este campo coinciden generalmente en que las dos especies de bacilos relacionadas más estrechamente con el ántrax son el *Bacillus cereus* y el *Bacillus thuringiensis*. El *Bacillus cereus* es un patógeno humano oportunista que requiere una manipulación cuidadosa. El *Bacillus thuringiensis* no es patógeno en humanos, pero se utiliza mucho por su actividad biopesticida contra insectos. Por consiguiente, durante el desarrollo de des-
 5 contaminantes biológicos patógenos se evaluaron en paralelo seis organismos de bacilos diferentes, que se comportan como sucedáneos físicos o biológicos del ántrax:

Bacillus cereus (ATCC 11950)

10 *Bacillus cereus* (ATCC 49063)

Bacillus cereus (ATCC 49064)

15 *Bacillus globigii* (ATCC 51189)

Bacillus subtilis var. *niger* (ATCC 9372)

Bacillus thuringiensis (ATCC 29730)

20 La estrategia general para la descontaminación de agentes químicos arriba descrita también se consideró para descontaminar patógenos biológicos. Era de esperar que la inactivación directa de células vegetativas o esporas evitara la infección de patógenos biológicos en humanos (es decir, descontaminación cuantitativa). Como alternativa, la digestión de patógenos biológicos por enzimas específicas también podría eliminar esta amenaza (es decir, descontaminación catalítica). Sería de esperar que las enzimas utilizadas para descontaminar agentes químicos también mostraran
 25 actividad contra toxinas naturales y otros patógenos biológicos. Por consiguiente, además de los biocidas, una serie de enzimas, incluyendo por ejemplo quitinasa, lisozima y mutanolisina, también pueden presentar una actividad potencial contra patógenos biológicos.

30 Se han llevado a cabo estudios preliminares para determinar el impacto potencial de diversos biocidas, enzimas y proteínas en el ensayo de Ellman. Los estudios han demostrado que el triclosán, el EDTA, la urea, la seroalbúmina bovina (BSA), la espuma Silv-Ex™, la espuma filmógena acuosa (AFFF - Aqueous Film-Forming Foam), y la fluoroproteína filmógena (Film-Forming Fluoroprotein - FFFP) no tienen ninguna repercusión directa en el ensayo. En ausencia de otros biocidas, el THPS reacciona directamente con el reactivo colorimétrico (AChE) utilizado en el
 35 ensayo de Ellman. Sin embargo, cuando se combina con otros biocidas, se comprueba que el THPS no interfiere en el ensayo de Ellman.

Utilizando una provocación microbiológica directa (es decir, sin presencia de espuma), los biocidas arriba indicados se ensayaron en células vegetativas y esporas de *Bacillus globigii* en un caldo de soja tríplico (véase el Ejemplo 6). En todos los ensayos experimentales, los biocidas (es decir, THPS, triclosán y BAC) mostraron los mejores efectos, destruyendo completamente todas las células vegetativas y algunas esporas. De los biocidas ensayados, tanto el THPS como el triclosán tuvieron un efecto bactericida en células y no presentaron ninguna germinación de esporas. El BAC tenía un fuerte efecto bactericida, pero no mostró ningún efecto en la germinación de esporas. Los estudios con mutanolisina contra células vegetativas produjeron un efecto bacteriostático temporal y limitado, reanudándose el crecimiento una vez diluida la mutanolisina en el medio. Los estudios con lisozima suplementada parecieron inhibir
 45 la germinación de esporas activas.

Aunque los métodos con enzimas (particularmente con lisozima suplementada) parecían prometedores, los métodos directos utilizando mezclas de biocidas eran preferibles según una curva log-muerte de células vegetativas y actividad contra esporas. En consecuencia, se analizaron mezclas de triclosán, BAC y THPS en espuma Silv-Ex™. En el Ejemplo 8, donde se utilizaron mezclas que contenían triclosán, BAC, THPS y espuma Silv-Ex™, se variaron y ensayaron diferentes concentraciones relativas de los componentes. Este estudio proporcionó conocimientos sobre el potencial de las mezclas específicas de biocidas para proporcionar actividad contra células vegetativas y esporas.

55 En la selección de una mezcla de biocidas se determinó que era posible que una formulación inhibiera el crecimiento sin destruir las bacterias diana. En estudios en los que se expusieron bacterias a diferentes niveles de BAC solo, se demostró que el BAC poseía actividad bactericida en caso de niveles altos y actividad bacteriostática en caso de niveles bajos. Estos estudios iniciales corroboraron la necesidad de una evaluación continua de la actividad bacteriostática frente a la actividad bactericida de cada formulación de biocida.

60 Una composición intermedia de biocidas combinados, que contenía un 1,0% en peso de Silv-Ex™, 5.000 ppm de triclosán, 240 ppm de BAC y 9.750 ppm de THPS y estaba ajustada a un pH 7,55, se utilizó en provocaciones directas de espuma microbiana contra células vegetativas y esporas de *Bacillus globigii*, células vegetativas de *Bacillus cereus* y esporas de *Bacillus thuringiensis* (véase el Ejemplo 12).

65 Con la continuación de los ensayos se demostró que una composición de biocidas combinados que contenía un 1,4% en peso de espuma Silv-Ex™, un 0,44% en peso de triclosán, 250 ppm de BAC y 8.800 ppm de THPS conservaba toda la actividad biocida en un intervalo de valores pH de 6,0 a 8,5 después de 24 horas de incubación. Por consiguiente, la presente composición preferentemente se mantiene a niveles de pH de 6,0 a 8,5. Para ello se pueden

ES 2 247 085 T3

añadir tampones adecuados conocidos, por ejemplo tampones fosfato, carbonato, tris, MES, PIPES, ACES, MOPS, TES, HEPES, HEPPS, TRICINA y glicina. Preferentemente se utiliza un tampón fosfato, a saber: fosfato de sodio 50 mM (pH 8,0). El tampón fosfato se añade en la medida necesaria para mantener los niveles de pH dentro del intervalo deseado de 6,0 a 8,5.

5 Una mezcla de biocidas preferente de acuerdo con la presente invención contiene hasta un 6,6% en peso de triclosán, hasta un 2,5% en peso de BAC y hasta un 3,0% en peso de THPS. De forma especialmente preferente, la mezcla de biocidas contiene entre un 0,1% en peso y un 1,0% en peso de triclosán, entre un 0,1% en peso y un 2,5% en peso de BAC y entre un 0,1% en peso y un 3,0% en peso de THPS. En particular, en una composición de concentración simple, la mezcla de biocidas preferente contiene un 0,5% en peso de triclosán, un 0,5% en peso de BAC y un 1,5% en peso de THPS.

15 Preferentemente, para lograr una aplicación rápida y fácil de las presentes composiciones sobre grandes áreas superficiales, la composición está contenida en una solución de material formador de espuma, tales como las que se utilizan habitualmente (véase, por ejemplo, Norma R. Lockwood, *Foam Extinguishing Agents and Systems*, Fire Protection Handbook, 16 edición, sección 19, capítulo 4, pp. 32-47 (1986)). Este material formador de espuma puede incluir, por ejemplo, espuma Silv-Ex™, espuma filmógena acuosa (AFFF - Aqueous Film-Forming Foam) y fluoroproteína filmógena (Film-Forming Fluoroprotein - FFFP). También se pueden utilizar otros materiales de espuma, por ejemplo espumas sólidas como poliuretanos y esponjas.

20 Preferentemente la presente composición está contenida en la espuma de extinción de incendios Silv-Ex™, que ha demostrado no tener ningún efecto negativo sobre la actividad enzimática o biocida. El sistema de distribución de espuma puede ser de cualquiera de los tipos utilizados en este campo, y preferentemente está diseñado para añadir un sólo concentrado de espuma al aparato de distribución, cargar el aparato (aumentar su presión) y distribuir la espuma. En algunas aplicaciones también es conveniente que el sistema de distribución de espuma esté diseñado para añadir agua con el fin de diluir la formulación de concentración simple.

25 Preferentemente, la presente composición contiene aproximadamente entre un 0,5 y un 5% en peso de material formador de espuma. En especial, el material formador de espuma está presente en una cantidad entre un 1,0 y un 3,0% en peso. En particular, el material formador de espuma está presente en una cantidad entre un 1,5 y un 2,5% en peso. No obstante, la concentración de material formador de espuma presente en la composición descontaminante se puede modificar ligeramente sin que ello influya negativamente en la eficacia de descontaminación frente a los agentes químicos o patógenos biológicos.

30 Además de la composición arriba indicada, también se pueden añadir sales metálicas en trazas, por ejemplo $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $CdCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$ o $FeCl_2$, para incrementar la actividad enzimática. Por ejemplo, se ha comprobado que el manganeso, añadido como cloruro de manganeso ($MnCl_2$), es particularmente útil en la presente composición cuando se utiliza enzima OPAA. Preferentemente, las trazas de sales metálicas se añaden en cantidades entre 0,5 y 2,5 mM. En especial, las trazas de sales metálicas se añaden en cantidades entre 0,5 y 1,5 mM.

35 La composición de descontaminación de agentes químicos y patógenos biológicos preferente de la presente invención comprende: (1) una mezcla de biocidas, preferentemente una mezcla de triclosán, THPS y BAC; (2) una proteína de unión a agentes químicos, preferentemente seroalbúmina bovina; y (3) una enzima activa contra compuestos organofosforosos, preferentemente OPAA. Preferiblemente, la composición incluye además un material formador de espuma, tal como Silv-Ex™, que tiene un tampón, tal como un tampón fosfato, para mantener el pH de la composición entre 6,0 y 8,5. También se pueden añadir trazas de metales, preferiblemente manganeso en forma de cloruro de manganeso.

40 Preferentemente, una formulación de concentración simple se formula aproximadamente de la siguiente manera: hasta un 6,6% en peso de triclosán, hasta un 2,5% en peso de BAC, hasta un 3,0% en peso de THPS, de 0,5 a 2,5 mM cloruro de manganeso, entre 1,6 y 70 mg/l de enzima OPAA, entre 0,01 y 40 mg/ml de seroalbúmina bovina, de 1 a 200 mM de tampón fosfato y entre un 0,5 y un 5% en peso de Silv-Ex™.

45 En especial, la formulación comprende entre un 0,1% en peso y un 1,0% en peso de triclosán, entre un 0,1% en peso y un 2,5% en peso de BAC, entre un 0,1% en peso y un 3,0% en peso de THPS, entre 0,5 y 1,5 mM de cloruro de manganeso, entre 3,3 y 12 mg/l de enzima OPAA, entre 0,01 y 1,0 mg/ml de seroalbúmina bovina, de 10 a 100 mM de tampón fosfato y entre un 1,5 y un 3,0% en peso de Silv-Ex™.

50 Una formulación de concentración simple particularmente preferente comprende aproximadamente un 0,5% en peso de triclosán, un 0,5% en peso de BAC, un 1,5% en peso de THPS, 1 mM de cloruro de manganeso, 7 mg/l de enzima OPAA, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 50 mM de tampón fosfato sódico y un 2,0% en peso de Silv-Ex™.

55 Se ha comprobado que el almacenamiento de la composición en dos recipientes independientes antes del uso aumenta la estabilidad. Preferentemente, en un recipiente se guarda una mezcla del material formador de espuma y los biocidas, y en el otro recipiente se guarda una mezcla de los componentes enzimáticos y proteínicos. Si se utiliza un tampón, éste se añade preferentemente a ambos recipientes. La mezcla de material formador de espuma y biocida tiene una vida útil en depósito de como mínimo 12 meses a temperatura ambiente. La mezcla de enzima y proteína se puede mantener estable durante como mínimo 6 meses a temperaturas de 2-4°C. El contenido de los

dos recipientes individuales se puede mezclar para formar una composición capaz de descontaminar tanto agentes químicos como patógenos biológicos. Si así se desea, los contenidos de los dos recipientes también se pueden utilizar individualmente.

5 Si se utiliza la composición preferente arriba indicada, los dos recipientes individuales contendrían preferentemente lo siguiente: (1) un recipiente contendría preferentemente un concentrado 10x de espuma que incluye un 5% en peso de triclosán, un 5% en peso de BAC, un 15% en peso de THPS, 10 mM de cloruro de manganeso, 500 mM de tampón fosfato (pH 8,0) y un 20% en peso de Silv-Ex™; y (2) el segundo recipiente contendría un concentrado 100x que incluye 700 mg/l de enzima OPAA, 10 mg/ml de seroalbúmina bovina y 50 mM de tampón fosfato (pH 8,0).

10 Para utilizar la composición de la presente invención, el contenido de los dos recipientes se combina preferentemente en el aparato de distribución de espuma. Una vez mezclado el contenido de los dos recipientes para obtener la composición de la presente invención, la mezcla permanecerá estable durante como mínimo 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, la espuma simplemente se pulveriza sobre una superficie y se deja que se pose y actúe sobre el agente químico y/o biológico. Después de que haya transcurrido un tiempo suficiente para asegurar la descontaminación adecuada de los agentes, normalmente como mínimo una hora, el residuo se limpia.

15 La presente invención también incluye kits que comprenden una primera mezcla, que incluye un material espumante y como mínimo un biocida, y una segunda mezcla, que incluye una enzima activa contra compuestos organofosforosos y una proteína de unión a agentes químicos. Los kits de la invención también pueden incluir un aparato de distribución de espuma, preferentemente empaquetado con instrucciones por escrito para el uso de las composiciones y otros componentes del kit.

20 Las composiciones de la presente invención se ilustran adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos, que están previstos para ayudar a entender la presente invención pero que no han de ser interpretados como una limitación de ésta.

Ejemplo 1

30 *Procedimientos para generar espuma*

35 Como indicadores preliminares del rendimiento en la generación de espuma se utilizaron unidades de extinción de incendios comerciales. Se emplearon dos extintores a presión pequeños (7,57 l o 9,4635 l [2 ó 2,5 galones]) y un extintor de boquilla aspiradora Amerex Modelo 252. Los resultados de este estudio se utilizaron para determinar una concentración de espuma tensioactiva preliminar para estudios de laboratorio.

40 Para la generación de espuma en laboratorio se utilizó una botella de aerosol de laboratorio (Airspray International, 30-100 ml de capacidad; Nalgene P/N 2430-0200). El cabezal de pulverización de esta unidad se modificó con un tubo de distribución de acero inoxidable de pared delgada con un calibre 11 para mejorar la distribución de espuma.

Ejemplo 2

Prueba superficial de la eficacia descontaminante de la espuma

45 Para evaluar la estabilidad de las células vegetativas y esporas sobre portaobjetos de vidrio, los portaobjetos se recubrieron directamente con aproximadamente 200 cfu (unidades formadoras de colonias) de *Bacillus globigii* (células vegetativas o esporas), *Bacillus cereus* (células vegetativas) y *Bacillus thuringiensis* (células vegetativas o esporas). Los portaobjetos se dejaron secar y se frotaron periódicamente con un tampón para recuperar bacterias (intervalos: 10 minutos, 1 hora, 3 días y 7 días). Se obtuvieron bacterias viables tanto de células vegetativas como de esporas en todos los portaobjetos durante 7 días de almacenamiento.

50 En las pruebas iniciales de descontaminación de espuma expandida, los portaobjetos de vidrio se recubrieron directamente con esporas de *Bacillus globigii* y células vegetativas de *Bacillus cereus*. Sobre la superficie de los portaobjetos se aplicó una preparación de una mezcla de biocidas que contenía aproximadamente 240 ppm de BAC y aproximadamente 5.000 ppm de triclosán, con un pH 7,50, utilizando un pulverizador manual de espuma. Diez minutos después, la superficie de vidrio se frotó utilizando un algodón estéril. Las muestras frotadas se dispusieron en placas para evaluar el crecimiento bacteriano. Se comprobó que las esporas de *Bacillus globigii* se destruían con eficacia. En ensayos directos sobre caldos se comprobó que se inhibían las células vegetativas de *Bacillus cereus* (es decir, después de diluir las células en caldo libre de descontaminante, las células reanudaban su propagación). Después de 24 horas de incubación con espuma, los mismos portaobjetos se frotaron de nuevo con un algodón, observándose un crecimiento adicional de células vegetativas de *Bacillus cereus*.

65 Se llevó a cabo un estudio para determinar si una espuma de mezcla de biocidas descontaminante, que contenía aproximadamente 240 ppm de BAC, aproximadamente 9.750 ppm de THPS y aproximadamente 5.000 ppm de triclosán, con un pH 7,55, era eficaz durante la primera hora de exposición. La mezcla de biocidas se pulverizó sobre portaobjetos de vidrio tal como se describen y preparan más arriba. Una hora después se recuperaron bacterias viables de todos los portaobjetos. Después de 24 horas de exposición se había destruido el *Bacillus globigii* y el *Bacillus thuringiensis* (el *Bacillus cereus* seguía siendo viable, como se esperaba).

ES 2 247 085 T3

Sobre la base de estos y otros resultados se identificaron tres formulaciones de mezclas de biocidas prometedoras, indicadas más abajo, para su posterior evaluación. Los portaobjetos de vidrio recubiertos de bacterias se trataron utilizando la unidad de generación de espuma de laboratorio y cada una de las soluciones. Esta unidad y las soluciones de Silv-Ex™ al 2% parecieron ser óptimas para el desarrollo de espumas descontaminantes expandidas. Los resultados indicaban que, si bien las bacterias permanecían activas después de 10 ó 30 minutos de exposición, todas las bacterias quedaban destruidas (incluyendo el *Bacillus cereus*) en 1 hora de exposición utilizando cada una de las tres composiciones de ensayo.

Composición 1

2,0% Silv-Ex™
0,5% triclosán
2,5% cloruro de benzalconio
3,0% THPS
1 mM cloruro de magnesio
660 mg/l enzima OPAA
1,0 mg/ml seroalbúmina bovina
en 50 mM de tampón fosfato, pH 8,0

Composición 2

2,0% Silv-Ex™
0,5% triclosán
05% cloruro de benzalconio
1,5% THPS
1 mM cloruro de magnesio
660 mg/l enzima OPAA
1,0 mg/ml seroalbúmina bovina
en 50 mM de tampón fosfato, pH 8,0

Composición 3

2,0% Silv-Ex™
1,0% triclosán
0,5% cloruro de benzalconio
1 mM cloruro de magnesio
660 mg/l enzima OPAA
1,0 mg/ml seroalbúmina bovina
en 50 mM de tampón fosfato, pH 8,0

Las composiciones se prepararon añadiendo el cloruro de manganeso, la enzima OPAA y la seroalbúmina bovina inmediatamente antes de su uso. En consecuencia, las composiciones se prepararon de la siguiente manera:

1. A 100 ml de solución preparada que contiene Silv-Ex™, triclosán, cloruro de benzalconio, THPS y tampón, se añaden
 - 100 µl de cloruro de manganeso (1M)

ES 2 247 085 T3

- 66 μ l de enzima OPAA (100 mg/ml)
- 1 ml de seroalbúmina bovina (100 mg/ml)

2. La mezcla se remueve a alta velocidad a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. La solución se agita bien antes de su uso.
4. Se pulveriza por bomba Prime Nalgene™ (preferentemente aproximadamente 50 veces)

Ejemplo 3

En este ejemplo se ensayó la actividad de una serie de materiales contra fluorofosfato de diisopropilo (DFP). El DFP se ha elegido como sucedáneo del gas nervioso Sarín (GB) por sus similares propiedades físicas y químicas. Estudios experimentales han demostrado que muchos materiales con actividad contra DFP también presentarán actividad contra el Sarín y también otros agentes G y posiblemente VX. Todos los materiales se evaluaron en cuanto a su impacto directo sobre el DFP utilizando el ensayo Ellman, véase Ellman, G.L., Courtney, D., Andres, Jr., V. y Featherstone, R.M., *A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity*, Biochemical Pharmacology, vol. 7, pp. 88-95 (1960) y su capacidad para provocar DFP. En el ensayo de Ellman, la demostración de la actividad de la seroalbúmina bovina (BSA) contra el DFP requiere la preincubación de BSA con DFP antes de la adición del sustrato colorimétrico.

TABLA 1

Ensayos con DFP	
Condiciones de ensayo	Resultado
Solución de espuma FFFP, sin preincubación	Ningún efecto
Solución de espuma FFFP, 5 min. preincubación	Ningún efecto
Solución de espuma FFFP, 10 min. preincubación	Ningún efecto
3 mg/ml BSA, pH 7,5, con tampón, sin preincubación	Ningún efecto
1 mg/ml BSA, pH 7,5, tamponada, 5 min. preincubación	Inhibición mínima de DFP
2 mg/ml BSA, pH 7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
5 mg/ml BSA, pH 7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
10 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
20 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
30 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
40 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 5 min. preincubación	"
5 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 10 min. preincubación	"
5 mg/ml BSA, pH7,5, tamponada, 15 min. preincubación	"
3 mg/ml colagenasa, sin preincubación	Inhibición mínima de DFP
1 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	"
2 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	"
3 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	Inhibición moderada de DFP
10 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	"
20 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	"

ES 2 247 085 T3

TABLA 1 (continuación)

	Condiciones de ensayo	Resultado
5	30 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 5 min. preincubación	”
	10 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 10 min. preincubación	”
10	10 mg/ml colagenasa, pH 7,5, 15 min. preincubación	”
	OPH-CLEC, 7,5 mg, 5 min. preincubación	> 80% inhibición de DFP
	OPAA, 5 mg, 5 min. preincubación	> 80% inhibición de DFP
15	OPAA, 5 mg, 5 min. preincubación	> 80% inhibición de DFP

Como se puede observar, una preincubación de 5 minutos permitió que 1 mg/ml de BSA inhibiera ligeramente el efecto del DFP. También se comprobó que ni un aumento de los niveles de BSA ni un aumento de la preincubación incrementaban la actividad de BSA contra el DFP. La inhibición directa del DFP también se observó en el caso de la colagenasa. La actividad de la colagenasa era considerablemente superior a la del BSA, y no era necesario preincubar la colagenasa para observar un efecto. Al aumentar los niveles de colagenasa de 1 mg/ml a 3 mg/ml se observó un incremento de la actividad contra el DFP. Sin embargo, un mayor aumento de la colagenasa por encima de 3 mg/ml no mostró ningún incremento en la actividad contra el DFP. La actividad óptima utilizando colagenasa se obtuvo con una concentración de 3 mg/ml con un período de preincubación de 5 minutos. También se demostró la inhibición de DFP utilizando OPH-CLEC (cristales de enzima reticulados de OPH disponibles de Altus, Inc., Cambridge, MA) y dos preparaciones de OPAA. Además se demostró que la solución de espuma FFFP no inhibía el DFP.

Ejemplo 4

Se analizó una serie de posibles enzimas descontaminantes en cuanto a su impacto sobre la acetilcolina-esterasa (AChE) utilizando el ensayo de Ellman. Uno de los principales problemas en el desarrollo de una composición descontaminante basada en múltiples enzimas consiste en la posibilidad de una interacción entre los materiales activos, que resulta en una potencial autoinactivación. Es de esperar que la inhibición competitiva directa del agente de unión a AChE impida la acción del agente en humanos. Simultáneamente, la desactivación, y probablemente la digestión, del agente por enzimas digestivas conducirá a una descontaminación catalítica de actividad prolongada en el tiempo. Los materiales se ensayaron en soluciones acuosas.

TABLA 2

Resultados de ensayo Ellman con acetilcolina-esterasa			
Material de Ensayo	Concentración de enzima (3 ml volumen de reacción total)	Pendiente	Comentarios
Silv-Ex™	0%	0,248	Ningún efecto
	0,1%	0,251	
	0,5%	0,237	
	1,0%	0,247	
Glucosa-oxidasa	0 mg/ml	0,251	Interferencia con AChE dependiente de la concentración
	0,225 mg/ml	0,241	
	0,225 mg/ml (5 min. preinc. con AChE)	0,223	
	0,45 mg/ml	0,205	
	1,13 mg/ml	0,118	
Lisozima	0 mg/ml	0,260	Interferencia con AChE dependiente de la concentración
	3,3 mg/ml	0,252	
	6,6 mg/ml	0,231	
	16,7 mg/ml	0,193	

ES 2 247 085 T3

TABLA 2 (continuación)

Material de Ensayo	Concentración de enzima (3 ml volumen de reacción total)	Pendiente	Comentarios
Enzima de lisis	0 mg/ml 0,33 mg/ml 0,66 mg/ml 1,65 mg/ml	0,260 0,239 0,217 0,167	Interferencia con AChE dependiente de la concentración
Proteasa (pronasa)	0 mg/ml 0,33 mg/ml 1,65 mg/ml 3,30 mg/ml	0,260 0,240 0,199 0,168	Interferencia con AChE dependiente de la concentración
Quitinasa	0 mg/ml 0,2 mg/ml 0,4 mg/ml 1,0 mg/ml	0,253 0,266 0,268 0,276	Ningún efecto
Lisostafina	0 unidades/ml 58 unidades/ml 116 unidades/ml 292 unidades/ml	0,253 0,342 0,279 0,273	Ningún efecto
Mutanolisina	0 unidades/ml 360 unidades/ml 720 unidades/ml 2.100 unidades/ml	0,253 0,265 0,267 0,264	Ningún efecto
Syntha CLEC-GO	~0,23 mg/ml	0,072	Interferencia con AChE dependiente de la concentración
Pepti-CLEC-TR	3,3 mg/ml	0,143	No concluyente

Ejemplo 5

Un segundo problema planteado en el uso de enzimas consiste en el impacto potencial del agente tensioactivo Silv-Ex™ en la actividad enzimática. La Tabla 3 muestra el efecto de Silv-Ex™ acuoso al 0,1%, siendo el 0,1% la concentración final, en diversas enzimas.

TABLA 3

Efecto de SILV-EX™ al 0,1% y enzimas descontaminantes en el ensayo de Ellman con acetilcolina-esterasa (AChE)			
Material de Ensayo	Concentración de enzima	Pendiente	Comentarios
AChE Control	N/A	0,250	
Silv-Ex Control	N/A	0,235	No se observa ningún efecto significativo
Glucosa-oxidasa	0,225 mg/ml	0,171	Se observa actividad reducida

ES 2 247 085 T3

TABLA 3 (continuación)

Material de Ensayo	Concentración de enzima	Pendiente	Comentarios
Lisozima	3,3 mg/ml	0,133	Formación de precipitado. Se observa actividad reducida después de la sedimentación
Enzima de lisis	0,33 mg/ml	0,214-0,221	No se observa ningún efecto significativo
Proteasa (pronasa)	3,3 mg/ml	0,133	Formación de precipitado. Se observa actividad reducida después de la sedimentación
Quitinasa	0,2 mg/ml	0,221	No se observa ningún efecto significativo
Mutanolisina	360 unidades/ml	0,226	No se observa ningún efecto significativo
Syntha CLEC-GO	~0,23 mg/ml	0,149	No concluyente debido a interferencia de suspensión de precipitado

Los ensayos demuestran que la espuma Silv-Ex™ pueden interferir potencialmente en la actividad de algunas enzimas. Se ha demostrado que en los casos de la quitinasa, la enzima de lisis y la mutanolisina se conservaba toda la actividad, mientras que en los casos de la glucosa-oxidasa, la lisozima, la proteasa y la synthaCLEC-GO se conservaba una actividad parcial. No obstante, los resultados sugieren que la interferencia se produce principalmente a través de la reducción de la actividad enzimática por precipitación.

Ejemplo 6

Se ensayó la provocación microbiológica directa (es decir, sin presencia de espuma), de materiales en células vegetativas y esporas de *Bacillus globigii*, con los resultados presentados en la Tabla 4.

Se ha demostrado que el tratamiento químico utilizando urea aumenta la susceptibilidad de las esporas a la lisozima (Gould *et al.*, 1970) y, en consecuencia, se ensayó en combinación con lisozima en estos estudios. También se ha demostrado que el tratamiento químico previo utilizando EDTA (ácido etilendiaminotetracético) modifica la capa de esporas de una cepa de *Bacillus subtilis* y, por consiguiente, se analizó en combinación con lisozima en cuanto a su efecto potencial sobre el ántrax.

TABLA 4

Ensayos microbiológicos utilizando células vegetativas y esporas de <i>Bacillus globigii</i> en caldo de soja tréptico (TSB)		
Adición de ensayo	Resultado (Células)	Resultado (Esporas)
THPS, 7.500 ppm	Bactericida	No se observa germinación de esporas
Cloruro de benzalconio	Bactericida a 10 ⁸	No se observan cambios
Triclosán 5.000 ppm	Bactericida	No se observa germinación de esporas
Quitinasa	Morfología modificada	No se observan cambios
Lisozima	No se observan efectos	No se observan cambios

ES 2 247 085 T3

TABLA 4 (continuación)

Adición de ensayo	Resultado (Células)	Resultado (Esporas)
Mutanolisina	Bactericida	Germinación reducida de esporas
Estreptomicina	No se observan efectos	Germinación reducida de esporas
Mutanolisina y estreptomicina	Bactericida	Germinación reducida de esporas
1,7 M urea + lisozima	No se observan efectos	No se observa germinación de esporas
1,7 M urea	No se observan efectos	Ligera reducción de la velocidad de crecimiento
270 mM EDTA + lisozima	Se observa una reducción de la velocidad de crecimiento 1,5 log	No se observa germinación de esporas
270 mM EDTA	No se observan efectos	No se observan cambios

Ejemplo 7

Se ensayó la descontaminación de esporas utilizando espuma Silv-Ex™, los resultados se muestran más abajo en la Tabla 5.

TABLA 5

Ensayo de descontaminación con espuma utilizando esporas de <i>Bacillus globigii</i> en placas de agar de soja tríptico	
Condiciones de ensayo	Resultado
Pulverización de espuma FFFP	Esporulación inducida
Pulverización de espuma Silv-Ex™ al 0,1%	Sin efectos. Se observa una germinación normal
Espuma Sily-Ex™ al 0,1% + 2.700 ppm de triclosán	Inhibición de la germinación. Esporas viables

Ejemplo 8

Ensayos de mezclas de biocidas

Se ensayaron las capacidades de descontaminación de distintas mezclas de biocidas contra diversas bacterias, variando el pH, los niveles de Silv-Ex™ y las composiciones de la mezcla de biocidas. Se prepararon organismos en placas de Agar de Soja Tríptico (TSA) y se provocaron directamente contra espuma expandida utilizando mezclas de biocidas individuales. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

ES 2 247 085 T3

TABLA 6

Provocación microbiana de mezclas de biocidas descontaminantes en placas de TSA

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Componentes	Concentración	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i> 51189	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i> 51189 esporas	<i>Bacillus thuringiensis</i> 29730 bacterias	<i>Bacillus thuringiensis</i> 29730 esporas	<i>Bacillus cereus</i> 49063 bacterias
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,47% 800 ppm 2,5% 1,9% 7,02	N	N	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,53% 800 ppm 2,0% 1,2% 7,14	N	N	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,80% 280 ppm 1,0% 0,8% 7,03	N	S	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,87% 280 ppm 0,5% 0,5% 2,32	N	N	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,80% 280 ppm 1,0% 0,5% 2,16	N	N	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,40% 1.120 ppm 2,5% 0,5% 2,13	N	N	N	N	N
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH	0,80% 280 ppm 1,0% 0,5% 7,60	C	C	C	C	C
Silv-Ex™ BAC THPS Triclosán pH Colagenasa	0,80% 280 ppm 1,0% 0,5% 7,16 0,3 mg/ml	C	C	C	C	C

"C" - Bactericida; "S" - Bacteriostático; "N" - Sin Efectos.

ES 2 247 085 T3

Ejemplo 9

Se dispusieron sobre membranas colonias individuales de células vegetativas y esporas de *Bacillus globigii* y se ensayaron utilizando espumas y espumas suplementadas para examinar el impacto de la lisozima suplementada sobre la actividad bacteriana.

TABLA 7

Ensayos microbiológicos utilizando esporas de <i>Bacillus globigii</i> en membranas	
Condiciones de ensayo	Resultado
Pulverización de espuma Silv-Ex™ al 0,1%	Sin efectos. Se observa una germinación normal.
Silv-Ex™ al 0,1% + urea + lisozima	No se observa germinación de esporas. Parece bactericida.
Silv-Ex™ al 0,1% + EDTA + lisozima	No se observa germinación de esporas. Parece bactericida.

Los ensayos verificaron que la espuma Silv-Ex™ no parecía influir negativamente sobre la actividad enzimática. Además, también se demostró que al añadir lisozima no se observaba ninguna germinación de esporas.

Ejemplo 10

Se ensayó la estabilidad del concentrado de espuma Silv-Ex™ y la mezcla de biocidas a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran más abajo.

TABLA 8

Ensayos de estabilidad de almacenamiento de la preparación de biocidas			
Temperatura	Duración	Resultado	Estabilidad T.A. Extrapolada
-20°C	48 horas	Estable	N/A
4-6°C	2 meses	Estable	N/A
T. ambiente (T.A.)	3 meses	Estable	3 meses
60°C	4 semanas	Estable	13 meses

Ejemplo 11

Para ensayar las composiciones descontaminantes se desarrollaron protocolos experimentales específicos basados en intentos similares IITRI (Illinois Institute of Technology Research Institute) realizados para Sandia National Laboratories (SNL).

El protocolo IITRI permitió evaluar 3 formulaciones diferentes descontaminantes de patógenos biológicos. Se analizaron muestras con y sin THPS para obtener mezclas de biocida alternativas. A temperaturas superiores a 160°C, el THPS se descompone formando fosfina y óxidos de fósforo, lo que hace que el THPS sea poco conveniente para utilizarlo en situaciones de incendio reales.

Los resultados de estos estudios mostraron que una serie de mezclas de biocida sin THPS tenían capacidad de actividad bactericida contra todos los organismos sucedáneos de BW ensayados.

Los resultados de las pruebas en los que se utilizó la formulación de concentración simple preferente, que comprenden de aproximadamente un 0,5% de triclosán, un 0,5% de BAC, un 1,5% de THPS, 1 mM cloruro de manganeso, 7 mg/l de enzima OPAA, 0,1 mg/ml de seroalbúmina bovina, 50 mM de tampón fosfato de sodio y un 2,0% de Silv-Ex™, indicaban una reducción de los niveles de esporas de ántrax de 7×10^7 cfu (unidades formadoras de colonias) hasta niveles no detectables, logrando una destrucción superior a 7-logmuerte. Los resultados de ensayo también muestran que la espuma es activa contra el Sarín y puede eliminar más de un 99% del Sarín presente en un plazo de 60 minutos.

ES 2 247 085 T3

Ejemplo 12

Se prepararon soluciones de biocidas combinados que contenían Silv-Ex™ al 1,0%, 5.000 ppm de triclosán y diferentes ppm de THPS y BAC, ajustadas a un pH de 7,45 a 7,55. Estas soluciones se utilizaron en provocaciones directas de espuma microbiana contra células vegetativas y esporas de *Bacillus globigii*, células vegetativas de *Bacillus cereus* y células vegetativas y esporas de *Bacillus thuringiensis*, que habían sido aplicadas y secadas sobre portaobjetos de vidrio tal como se describe en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

TABLA 9

PROVOCACIÓN MICROBIANA EN CALDO DE MEZCLAS DE BIOCIDAS DESCONTAMINANTES SOBRE PORTAOBJETOS DE VIDRIO						
	Concentración (vol. final) Silv-Ex™ 1,0%	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i> 51189 bacterias	<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>globigii</i> 51189 esporas	<i>Bacillus thuringiensis</i> 29730 bacterias	<i>Bacillus thuringiensis</i> 29730 esporas	<i>Bacillus cereus</i> 49063 bacterias
BAC THPS Triclosán pH 7,50	240 ppm 4.875 ppm 5.000 ppm	S	S	S	S	S
BAC THPS Triclosán pH 7,45	60 ppm 9.750 ppm 5.000 ppm	S	S	C	S	N
BAC THPS Triclosán pH 7,55	240 ppm 9.750 ppm 5.000 ppm	C	C	C	C	S
BAC THPS Triclosán pH 7,50	240 ppm NADA 5.000 ppm	S	N	S	S	N

"C" - Bactericida; "S" - Bacteriostático; "N" - Sin Efectos

Ejemplo 13

Se realizaron ensayos adicionales para determinar la eficacia de la formulación contra las siguientes dianas utilizando los siguientes procedimientos de ensayo:

A. *Escherichia coli* O157:H7 (American Type Culture Collection (ATCC) 43895) - Bacterias

Primera Ejecución de Prueba

Tratamientos de los portaobjetos (tomados a los 15, 30 y 60 minutos): Los portaobjetos de vidrio se impregnaron por separado con aproximadamente 10.000.000 cfu de *E. coli* O157:H7 en cada caso. Los portaobjetos se dejaron secar durante 24 horas con una humedad relativa de un 34% a 24°C, y después se aplicaron soluciones de biocida (aproximadamente 2,0 ml) en forma de películas espumosas uniformes. Los portaobjetos se frotaron con un algodón después del secado de la aplicación de biocida bajo una bio-campana. Unas placas de agar nutriente se frotaron con un algodón para determinar el crecimiento después de 24 - 48 horas. El residuo de espuma del tratamiento también se dispuso sobre placas para determinar la presencia de organismos viables en la espuma.

Resultados Preliminares

Después de 48 horas de incubación no se detectó ningún crecimiento en las placas de agar ni en la espuma residual. La solución era eficaz y completamente bactericida a los 15 minutos.

ES 2 247 085 T3

Preparación final y ensayo

1. Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo hasta una densidad óptica correspondiente a 10^9 cfu/ml de organismos.
2. Se depositan 100 μ l de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio esmerilado por triplicado (25 x 75 mm) y se secaron al aire bajo condiciones asépticas durante 24 horas. (Humedad: 34%)
3. Los portaobjetos se disponen en vasos para análisis de vidrio de 1.000 ml independientes.
4. En un vaso para análisis de vidrio independiente se pulverizan 100 ml de espuma y ésta se vierte sobre cada portaobjetos individual.
5. Después de cada período de exposición, los portaobjetos se retiran y se disponen en agua estéril con una barra agitadora durante dos horas.
6. La espuma se recoge para analizar la viabilidad de los organismos.
7. El lavado de la espuma y los portaobjetos (100 μ l) se dispone sobre placas de agar nutriente en diluciones en serie de 10^0 - 10^{-5} y se incuba durante tres días a 37°C.
8. Las placas se someten a recuento y se comparan con cantidades de control.

B. *Salmonella choleraesuis (enteriditis) (ATCC 49214) - Bacterias*

Primera Ejecución de Prueba

Tratamientos de los portaobjetos (tomados a los 15, 30 y 60 minutos): Los portaobjetos de vidrio se impregnaron por separado con aproximadamente 10.000.000 cfu de *Salmonella Choleraesuis* en cada caso. Los portaobjetos se dejaron secar durante 24 horas (temperatura: 24°C; humedad relativa: 34%). Después se aplicaron soluciones de biocida (aproximadamente 2,0 ml) en forma de películas espumosas uniformes y se dejaron secar en un armario de seguridad biológica. Los portaobjetos secos se frotaron con un algodón para determinar el crecimiento en placas de agar nutriente después de 24-48 horas. El residuo de espuma del tratamiento también se dispuso sobre placas para determinar la presencia de organismos viables en la espuma.

Resultados Preliminares

Después de 48 horas de incubación no se detectó ningún crecimiento en las placas de agar ni en la espuma residual. La solución era eficaz y completamente bactericida a los 15 minutos.

Preparación final y ensayo

1. Las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo hasta una densidad óptica correspondiente a 10^9 cfu/ml de organismos.
2. Se depositan 100 μ l de la suspensión sobre portaobjetos de vidrio esmerilado por triplicado (25 x 75 mm) y se secaron al aire bajo condiciones asépticas durante 24 horas. (Humedad: 34%)
3. Los portaobjetos se disponen en vasos para análisis de vidrio de 1.000 ml independientes.
4. En un vaso para análisis de vidrio independiente se pulverizan 100 ml de espuma y ésta se vierte sobre cada portaobjetos individual.
5. Después de cada período de exposición, los portaobjetos se retiran y se disponen en agua estéril con una barra agitadora durante dos horas.
6. La espuma se recoge para analizar la viabilidad de los organismos.
7. El lavado de la espuma y los portaobjetos (100 μ l) se dispone sobre placas de agar nutriente en diluciones en serie de 10^0 - 10^{-5} y se incuba durante tres días a 37°C.
8. Las placas se someten a recuento y se comparan con cantidades de control.

ES 2 247 085 T3

C. *Bacillus cereus* bacteriófago (ATCC 12826-B1) - Virus bacteriano

Primera Ejecución de Prueba

5 El fago de *Bacillus cereus* se recuperó de una placa de agar nutriente (aproximadamente 0,4°C). Este fago es lítico contra su huésped (*Bacillus cereus*, ATCC 12826). Para iniciar el desarrollo del bacteriófago en el caldo (10 ml) que contenía el huésped se utilizó una parte alícuota (100 µl de una solución de caldo nutriente 1,0 mg/ml). El bacteriófago se desarrolló durante 19 horas a 30°C en un baño de agua. Después de la incubación, el caldo se centrifugó y se trató con cloroformo para eliminar las bacterias vivas residuales de la solución con contenido en bacteriófagos. Después se
10 recogió el sobrenadante y se ensayó una parte alícuota contra un huésped en placa para determinar el número de fagos activos. Un ml de la solución de bacteriófagos se dispuso sobre un portaobjetos y se secó durante la noche (temperatura 24°C; humedad relativa: 34%). Después se dispuso 1 ml de biocida espumoso sobre el portaobjetos y se dejó secar durante diversos períodos de tiempo (15, 30 y 60 minutos). Después de la exposición, los portaobjetos se lavaron con agua destilada y sobre la parte superior de los mismos se dispuso una capa delgada (0,5 ml) de agar que contenía la
15 bacteria huésped para recontar los fagos activos que pudieran quedar. También se realizaron pruebas de control y se compararon los resultados.

Preparación final y ensayo

20 El protocolo de ensayo final no varió con respecto al ensayo inicial.

D. *Staphylococcus aureus* - α-hemolisina (obtenido de Sigma) - Toxina

Primera Ejecución de Prueba

25 La toxina [0,1 mg proteína] se suspendió en 1 ml de caldo nutritivo. Una pequeña parte alícuota (10 µl) de toxina se provocó con diferentes cantidades de biocida (10 µl, 100 µl, 1 ml y 5 ml) a dos temperaturas de incubación (4°C y 37°C). Después del proceso de mezcla, las mezclas toxina:espuma se incubaron durante diversos períodos de tiempo (15, 30, 60 y 300 minutos). Después de la incubación se retiraron partes alícuotas de 10 µl, se dispusieron sobre
30 células sanguíneas de conejo y se ensayaron en cuanto a la actividad de lisis (37°C durante 30 minutos, 4°C durante 30 minutos). Los resultados cualitativos se determinaron mediante evaluación visual de la hemólisis de las células sanguíneas de conejo dentro del agar (visibles en forma de zonas claras).

Resultados Preliminares

35 La cantidad más eficaz consistía en 5 ml de biocida contra 10 µl de toxina.

Preparación final y ensayo

40 El protocolo de ensayo final no varió con respecto al ensayo inicial.

E. *Aspergillus niger* (ATCC 16404) - Esporas fúngicas

Primera Ejecución de Prueba

45 Tratamientos de los portaobjetos (tomados a los 15, 30 y 60 minutos): Los portaobjetos de vidrio se impregnaron por separado con aproximadamente 100.000 esporas de *Aspergillus niger* en cada caso. Los hongos se dejaron esporular después de disponerlos sobre placas de agar Sabouraud. Las esporas se desarrollaron después de 8 días y diversos tratamientos de cambio de incubación caliente/frío. Las esporas se recogieron utilizando cinta scotch, se suspendieron
50 en agua estéril, se filtraron para su conteo y después se resuspendieron en agua estéril. Las esporas fúngicas recogidas se dispusieron sobre portaobjetos y se dejaron secar durante 24 horas a una humedad relativa de un 34% a 24°C, y después se aplicaron las soluciones de biocida (aproximadamente 2,0 ml) en forma de películas espumosas uniformes. Los portaobjetos se frotaron con un algodón después los períodos de exposición de la aplicación de biocida secada bajo una bio-campana. Las placas de agar Sabouraud se frotaron con un algodón para determinar el crecimiento después
55 de 24 a 96 horas. El residuo de espuma después del tratamiento también se dispuso sobre placas para determinar la posible presencia de esporas viables en la espuma.

Resultados Preliminares

60 Después de 48 horas de incubación no se detectó ningún crecimiento en las placas de agar ni en la espuma residual. La solución parecía eficaz y completamente bactericida a los 30 minutos.

Preparación final y ensayo

- 65
1. Las esporas de *Aspergillus* se lavaron y suspendieron en agua desionizada estéril (concentración aproximada: $5,6 \times 10^5$ esporas/ml).
 2. Se depositan 100.000 esporas en agua sobre portaobjetos de vidrio esmerilado por triplicado (25 x 75 mm)

ES 2 247 085 T3

y se secan al aire bajo condiciones asépticas durante 24 horas (temperatura: 24°C; humedad relativa: 34%). Los portaobjetos se disponen en vasos para análisis de vidrio de 1.000 ml independientes.

3. En un vaso para análisis de vidrio independiente se disponen 100 ml de espuma y ésta se vierte sobre cada portaobjetos individual.
4. Después de la exposición, los portaobjetos se retiran y se disponen en agua estéril con una barra agitadora durante dos horas.
5. La espuma se recoge para analizar la viabilidad de las esporas.
6. Las esporas del lavado de la espuma y los portaobjetos (200 μ l) se dispone sobre placas de agar Sabouraud en diluciones en serie de 10^0 - 10^2 y se incuba durante siete días a una temperatura de 35 a 37°C.
7. Las placas se someten a recuento y se comparan con cantidades de control.

F. *Giardia intestinalis* (ATCC 30957) - Protozoos/parásitos

Primera Ejecución de Prueba

Tratamientos de los portaobjetos (tomados a los 15, 30 y 60 minutos): Los portaobjetos de vidrio se impregnaron por separado con aproximadamente 3.000 quistes de *Giardia intestinalis* en cada caso. Después de ajustar diversos requisitos de desarrollo para optimizar las condiciones de crecimiento, se permitió que los parásitos formaran quistes durante dos semanas. Los quistes se suspendieron en caldo nutritivo y se cuantificaron mediante microscopía óptica. Los quistes recogidos se dispusieron sobre portaobjetos y se dejaron secar durante 24 horas (temperatura: 24°C; humedad relativa: 34%). Después se aplicaron soluciones de biocida (aproximadamente 2,0 ml) en forma de películas espumosas uniformes. Los portaobjetos se dispusieron en caldo nutritivo para determinar el crecimiento después de 24 a 96 horas.

Resultados Preliminares

De acuerdo con la microscopía óptica y los cambios generales de turbidez, la aplicación de la espuma parecía ligeramente eficaz para eliminar quistes de *Giardia* a los 30 minutos, observándose una mayor actividad después de 60 minutos de exposición.

Preparación final y ensayo

1. Los quistes se suspendieron en agua desionizada estéril (concentración aproximada: 3×10^3 esporas/ml).
2. Los quistes en agua se depositan sobre portaobjetos de vidrio esmerilado por triplicado (25 x 75 mm) y se secan al aire bajo condiciones asépticas durante 24 horas - humedad 34%.
3. Los portaobjetos se disponen en vasos para análisis de vidrio de 1.000 ml independientes.
4. En un vaso para análisis de vidrio independiente se disponen 100 ml de espuma y ésta se vierte sobre cada portaobjetos individual.
5. Después de un período de exposición, los portaobjetos se retiran y se disponen en agua estéril con una barra agitadora durante dos horas.
6. La espuma se recoge para analizar la viabilidad de las esporas. Se toma una parte alícuota del lavado y se dispone en agar nutritivo para la activación de los quistes. Los resultados de actividad de quistes se verifican mediante microscopía óptica.

La formulación era eficaz contra estos otros materiales biológicos en ensayos tanto de la formulación de espuma descontaminante completa (incluyendo enzima hidrolizante de Sarín) como de componente biocida solo. La Tabla 10 muestra un resumen de los resultados.

TABLA 10

RESUMEN DE ENSAYOS EN PORTAOBJETOS					
Organismo biológico ensayado	Cantidad ensayada	Cantidad de provocación de biocida	Actividad de espuma		
			5 min	30 min	1 hora
<i>E. coli</i> O157:H7	2,3x10 ⁸ cfu	100 ml	E	E	E
<i>Salmonella</i> spp.	3,1x10 ⁸ cfu	100 ml	E	E	E
<i>B. cereus</i> bacteriófago	73 pfu	100 ml	NE	E	E
<i>Staphylococcus aureus</i> - α-hemolisina	1,0 μg	5 ml	NE	NE	E(>4 h)
<i>Aspergillus niger</i>	1x10 ⁵ esporas	100 ml	PE	E	E
<i>Giardia</i> spp. quistes	~1x10 ³ quistes	100 ml	NE	PE	E
Biocida: 100 ml p/ 17 μl OPAA (a no ser que se indique de otro modo) E - (Eficaz) Actividad biológica eliminada. PE - (Parcialmente Eficaz) Reducción significativa de la actividad biológica. NE - (No Eficaz) Actividad biológica inalterada.					

En base a los ensayos contra diversos materiales biológicos se demostró que la composición descontaminante es eficaz contra un amplio espectro de amenazas biológicas potenciales.

Como se demuestra, la composición descontaminante es eficaz contra células vegetativas y se ha demostrado una eficacia específica contra dos patógenos destacados transmitidos a través de la alimentación, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella choleraesuis*, en un plazo de 15 minutos desde la aplicación.

Como se demuestra mediante la utilización del bacteriófago *B. cereus* como sistema modelo para virus, la composición descontaminante es eficaz contra los virus en un plazo de 30 minutos desde su aplicación.

La composición descontaminante es eficaz contra hongos y se ha demostrado una eficacia específica contra los hongos comunes, *Aspergillus niger*, en un plazo de 30 minutos desde la aplicación.

La composición descontaminante es eficaz contra organismos parásitos, tal como se demuestra mediante la utilización de quistes de *Giardia*. La composición descontaminante fue eficaz contra quistes de *Giardia* en un plazo de 60 minutos desde la aplicación. Este patógeno, que se transmite a través del agua, se reconoce como un patógeno particularmente resistente a la descontaminación tradicional mediante luz UV.

La composición descontaminante muestra un determinado efecto contra toxinas biológicas tal como se demuestra mediante la reducción de la actividad de toxina contra *Staphylococcus aureus*-α-hemolisina después de como mínimo 4 horas de exposición.

Aunque se han descrito realizaciones preferentes de la invención utilizando términos específicos, dicha descripción sólo tiene fines ilustrativos y se ha de entender que se pueden realizar cambios y variaciones sin salirse del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Composición de descontaminación de agentes de armas químicas y biológicas que comprende:

5 como mínimo un biocida seleccionado entre cloruro de benzalconio (BAC), sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio (THPS), sulfato de tetraquis(hidroxiometil)fosfonio, triclosán {2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter}, estreptomycin, sodium omadine, diclorofeno y bisticianato de metileno; y

10 como mínimo una enzima activa contra compuestos organofosforosos,

donde la composición posee una actividad descontaminante contra agentes de armas químicas, incluyendo Sarín, y agentes de armas biológicas, incluyendo esporas de ántrax.

15 2. Composición según la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un material formador de espuma.

3. Composición según la reivindicación 2, en la que el material formador de espuma es una espuma de extinción de incendios.

20 4. Composición según la reivindicación 2 ó 3, en la que el material formador de espuma está presente en una cantidad entre un 1,5 y un 3% en peso.

5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que adicionalmente comprende un tampón para mantener la composición en un pH entre 6,0 y 8,5, preferentemente un tampón fosfato.

25 6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que adicionalmente contiene como mínimo un metal en trazas, preferentemente manganeso.

30 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el biocida o los biocidas consisten en una mezcla de triclosán, sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio y cloruro de benzalconio.

35 8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el biocida o los biocidas comprenden hasta un 6,6% en peso de triclosán, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 1,0% en peso de triclosán, en particular un 0,5% en peso de triclosán; hasta un 3% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 3% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio, en particular un 1,5% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio; y hasta un 2,5% en peso de cloruro de benzalconio, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 2,5% en peso de cloruro de benzalconio, en particular un 0,5% en peso de cloruro de benzalconio.

40 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que adicionalmente comprende como mínimo una proteína de unión a agentes químicos.

45 10. Composición según la reivindicación 9, en la que la proteína de unión a agentes químicos se selecciona entre seroalbúmina bovina, AChE, BuChE, ChE, quimotripsina, tripsina, quimotripsinógeno, colagenasa, tripsinógeno, uroquinasa, esterasa, carboxil-esterasas, trombina, factor VII_A, factor X_A, calicreína, precalicreína, Na/K-ATPasa, papaína y fosfatasa alcalina.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que la proteína de unión a agentes químicos comprende seroalbúmina bovina presente en una cantidad de 0,01 a 1 mg/ml.

50 12. Composición según la reivindicación 1, en la que la enzima se selecciona entre glucosa-oxidasa, enzima de lisis, lisozima, proteasa, quitinasa, lisostafina, mutanolisina, colagenasa, SynthaCLEC-GO, PeptiCLEC-TR, organofosfato-hidrolasa (OPH) y ácido organofosforoso-anhidrasa (OPAA).

55 13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la enzima está presente en una cantidad de 3,3 a 12 mg/l.

14. Kit para descontaminar agentes químicos y patógenos biológicos que incluye:

60 una primera composición que comprende al menos un biocida seleccionado entre cloruro de benzalconio (BAC), sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio (THPS), sulfato de tetraquis(hidroxiometil)fosfonio, triclosán {2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter}, estreptomycin, sodium omadine, diclorofeno y bisticianato de metileno, teniendo la primera composición actividad descontaminante contra agentes de armas biológicas, incluyendo esporas de ántrax; y

65 una segunda composición que comprende como mínimo una enzima, teniendo la segunda composición actividad descontaminante contra agentes de armas químicas, incluyendo Sarín;

ES 2 247 085 T3

caracterizado porque cuando se combinan la primera composición y la segunda composición se forma una composición de descontaminación de agentes de armas químicas y biológicas que posee actividad descontaminante contra agentes de armas biológicas, incluyendo esporas de ántrax, y actividad descontaminante contra agentes de armas químicas, incluyendo Sarín.

5

15. Kit según la reivindicación 14, en el que la primera composición comprende adicionalmente un material formador de espuma y/o un metal en trazas.

10

16. Kit según la reivindicación 15, en el que el material formador de espuma es una espuma de extinción de incendios.

17. Kit según la reivindicación 15 ó 16, en el que el material formador de espuma está presente en una cantidad entre un 1,5 y un 3% en peso.

15

18. Kit según la reivindicación 14, en el que la primera composición y/o la segunda composición comprende adicionalmente un tampón, preferentemente un tampón fosfato.

19. Kit según la reivindicación 15, en el que el metal en trazas es manganeso.

20

20. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que el biocida o los biocidas consisten en una mezcla de uno o más de los siguientes biocidas: triclosán, sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio y cloruro de benzalconio.

25

21. Kit según la reivindicación 20, en el que el biocida o los biocidas comprenden hasta un 6,6% en peso de triclosán, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 1,0% en peso de triclosán, en particular un 0,5% en peso de triclosán; hasta un 3% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 3% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio, en particular un 1,5% en peso de sulfato de tetraquishidroximetilfosfonio; y hasta un 2,5% en peso de cloruro de benzalconio, preferentemente entre un 0,01% en peso y un 2,5% en peso de cloruro de benzalconio, en particular un 0,5% en peso de cloruro de benzalconio.

30

22. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, en el que la segunda composición comprende adicionalmente como mínimo una proteína de unión a agentes químicos.

35

23. Kit según la reivindicación 22, en el que la proteína de unión a agentes químicos se selecciona entre seroalbúmina bovina, AChE, BuChE, ChE, quimotripsina, tripsina, quimotripsinógeno, colagenasa, tripsinógeno, uroquinasa, esterasa, carboxil-esterasas, trombina, factor VII_A, factor X_A, calicreína, precalicreína, Na/K-ATPasa, papaína y fosfatasa alcalina.

40

24. Kit según la reivindicación 23, en el que la proteína de unión a agentes químicos comprende seroalbúmina bovina presente en una cantidad de 0,01 a 1 mg/ml.

45

25. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, en el que la enzima se selecciona entre glucosa-oxidasa, enzima de lisis, lisozima, proteasa, quitinasa, lisostafina, mutanolisina, colagenasa, SynthaCLEC-GO, PeptiCLEC-TR, organofosfato-hidrolasa (OPH) y ácido organofosforoso-anhidrasa (OPAA).

50

26. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 25, en el que la enzima está presente en una cantidad de 3,3 a 12 mg/l.

55

60

65