

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 995**

51 Int. Cl.:

A01N 59/16 (2006.01)

A61L 27/30 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 29/10 (2006.01)

A61L 29/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2004** **E 04817941 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013** **EP 1691614**

54 Título: **Galio que inhibe la formación de biopelículas**

30 Prioridad:

04.12.2003 US 526907 P

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

04.06.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(50.0%)**

2660 University Capitol Centre

IOWA CITY, IA 55242, US y

THE UNITED STATES OF AMERICA, AS

REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF

VETERANS AFFAIRS (50.0%)

72 Inventor/es:

BRITIGAN, BRADLEY, E. y

SINGH, PRADEEP

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 405 995 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

Galio que inhibe la formación de biopelículas

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere, en líneas generales, al campo de la medicina y de la industria. Más particularmente, se refiere a una composición que contiene galio para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelículas e infecciones originadas por las mismas.

2. Descripción de la técnica relacionada

- 10 La contaminación bacteriana de dispositivos médicos normalmente se produce debido a la formación de biopelículas lo que conduce a infecciones tales como infecciones nosocomiales. La neumonía nosocomial es la segunda infección nosocomial más común y está asociada con una mortalidad y morbilidad de las más altas que pueden atribuirse. Por ejemplo, a partir del uso de equipos de respiración mecánica, el riesgo de neumonía nosocomial ha aumentado drásticamente durante los últimos años (Official Statement, American Thoracic Society). A menudo, las infecciones nosocomiales, especialmente las que implican a la corriente sanguínea o a los pulmones, causan la
- 15 muerte.

- Estudios de supervivencia de infecciones nosocomiales, basados en poblaciones, realizados en hospitales de los Estados Unidos, indican un índice o una frecuencia de ataque del 5 % de 5 infecciones por 1.000 pacientes al día (Wenzel y col., 2001). El Sistema de Vigilancia y Control de Patógenos de Importancia Epidemiológica (SCOPE, por las siglas en inglés de *Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance*) de infecciones
- 20 nosocomiales de la corriente sanguínea en hospitales de los Estados Unidos identificó un índice de mortalidad bruto del 27 %, con gran variación de patógenos. Cálculos de la base de datos de SCOPE, sobre infecciones nosocomiales de la corriente sanguínea, indican que un 70 % de estas infecciones se producen en pacientes con catéteres venosos centrales (Wenzel y col., 1999). SCOPE ha identificado que el 49 % de todas las infecciones nosocomiales de la corriente sanguínea se producen en unidades de cuidados intensivos en las que a menudo los
- 25 pacientes tienen un sistema inmunitario debilitado y usan frecuentemente respiradores artificiales y/o catéteres en los que a menudo se forman biopelículas.

- La neumonía nosocomial también se produce normalmente debido al uso de tubos endotraqueales que son vehículos habituales de colonización/contaminación bacteriana que conducen a la formación del crecimiento de biopelículas. El tubo endotraqueal pone en contacto el medio orofaríngeo con el espacio broncoalveolar estéril,
- 30 aumentando significativamente el riesgo de neumonía nosocomial. La formación de biopelículas en el interior de los tubos endotraqueales desempeña un papel en la iniciación de neumonía asociada con respiradores artificiales y puede seleccionar resistencia a antibióticos entre especies bacterianas produciendo dichas infecciones (Sottile y col., 1986; Inglis y col., 1989; Adair y col., 1993; Koerner y col., 1998; Gorman y col., 2001; Adair y col., 1999).

- Los catéteres vasculares contribuyen principalmente a la producción de infecciones nosocomiales de la corriente sanguínea. Se calcula que, anualmente, en los Estados Unidos, se producen aproximadamente 400.000 infecciones de la corriente sanguínea relacionadas con catéteres vasculares (CRBSI, por las siglas en inglés *Catheter-Related Bloodstream Infections*) (Raad, 1998). Otras causas frecuentes de infecciones nosocomiales son las infecciones del tracto urinario (ITU), que constituyen el 34 % de todas las infecciones nosocomiales (Klempner y col., 1998). Las ITU nosocomiales están normalmente asociadas con contaminación de catéteres urinarios.

- 40 Adicionalmente, las infecciones nosocomiales debidas a la formación del crecimiento de biopelículas son complicaciones habituales de procedimientos quirúrgicos, particularmente en pacientes con cáncer e inmunocomprometidos con tejido debilitado e inmunidad disminuida. Las infecciones de heridas quirúrgicas constituyen el 17 % de todas las infecciones nosocomiales (Platt y Bucknall, 1988). Muchas infecciones de heridas quirúrgicas están asociadas con la contaminación bacteriana de suturas.

- 45 Se han utilizado antibióticos y antisépticos para revestir/impregnar dispositivos sobre los cuales pueden crecer bacterias y formar biopelículas, lo que conduce a infecciones tales como infecciones nosocomiales. Sin embargo, aunque estas infecciones pueden controlarse durante muchos años con antibióticos, finalmente las bacterias (*por ejemplo, P. aeruginosa*) forman una película que es resistente al tratamiento con antibióticos haciendo, por lo tanto, que estos agentes terapéuticos sean ineficaces. La durabilidad de los antisépticos existentes en el control de la
- 50 formación de biopelículas también se ha limitado.

- Diversos estudios han examinado el efecto de diversos tipos de tratamiento antimicrobiano en el control de la formación de biopelículas sobre dispositivos. Por ejemplo, el uso de clorhexidina/sulfadiazina de plata impregnando la superficie de catéteres vasculares dio como resultado una actividad limitada contra bacilos gram negativos, tales como *Pseudomonas*. Catéteres impregnados con minociclina y rifampicina fueron algo eficaces en la prevención de
- 55 colonización bacteriana (Darouiche y col., 1999). Anwar y col. (1992) demostraron que el tratamiento con niveles de tobramicina muy superiores a la MIC (concentración inhibitoria mínima) reducía los recuentos celulares de las

biopelículas de *P. aeruginosa* aproximadamente 2 logaritmos, mientras que la misma dosificación proporcionó una disminución >8-log en células planctónicas de este organismo. La adición de metabisulfito sódico a una descarga de heparina-dextrosa eliminó la colonización microbiana de catéteres auriculares (Freeman y Gold (1985). Se observó que, catéteres revestidos con un tensioactivo catiónico (cloruro de tridodecilmetilamonio), que a su vez se usaba para unir cefalosporina a la superficie, eran menos susceptibles a contaminación y desarrollo de biopelículas en comparación con catéteres no tratados (Kamal y col., 1991). Flowers y col. (1989) encontraron que un manguito de fijación subcutánea, que contenía iones de plata insertados después de aplicación local de pomada poliantibiótica, confería un efecto protector en catéteres, dando como resultado índices de contaminación más bajos. Maki (1994) sugirió diversas maneras para controlar biopelículas en catéteres venosos centrales, incluyendo el uso de técnicas asépticas durante el implante, usando antibióticos tópicos, minimizando la duración de la cateterización, usando un filtro en línea para fluidos intravenosos, creando una barrera mecánica para impedir la entrada de organismos incorporando al catéter un manguito implantando quirúrgicamente, revistiendo el lumen interno del catéter con un agente antimicrobiano y eliminando el dispositivo contaminado.

Los antisépticos usados en aplicaciones industriales también han fracasado impidiendo la formación del crecimiento de biopelículas de organismos bacterianos. Por ejemplo, se atribuyeron problemas de contaminación de agua industrial y de salud pública, debidos a un brote de peritonitis por *P. aeruginosa*, a una solución contaminada de poloxámero-yodo, un desinfectante usado para tratar catéteres peritoneales. Se observó que *P. aeruginosa* contaminaba los conductos de distribución y filtros de agua usados en las plantas que fabricaban soluciones de yodo. Una vez que el organismo había madurado en una biopelícula, se volvía resistente a la actividad biocida de la solución yodoform. Por tanto, la formación del crecimiento de biopelículas produce problemas mecánicos en situaciones industriales que, en algunos casos, puede conducir a infecciones en seres humanos.

Anteriormente se han desarrollado otros procedimientos para inhibir la formación de biopelículas en situaciones médicas e industriales usando quelantes metálicos (US 20058014328611). Estos procedimientos han desvelado el uso de quelantes de pequeña molécula, es decir, EDTA, EGTA, deferoxamina, ácido dietilentriamina pentaacético y etidronato para la inhibición de biopelículas. La Patente de Estados Unidos 6.267.979 desvela el uso de quelantes metálicos en combinación con composiciones antifúngicas o antibióticas para impedir la biocontaminación en el tratamiento del agua, elaboración de pasta y papel y en inundaciones de agua en campos petrolíferos. La patente de Estados Unidos 6.086.921 desvela el uso de compuestos que contienen tiol en combinación con metales pesados como biocidas; y la Patente de Estados Unidos 5.688.516 desvela el uso de agentes antimicrobianos no glucopéptidos en combinación con agentes quelantes metálicos divalentes para su uso en el tratamiento y preparación de dispositivos médicos permanentes.

Aunque los métodos actuales usados para controlar la formación del crecimiento de biopelículas han sido un tanto eficaces, la formación del crecimiento de biopelículas continúa siendo problemática en diversas situaciones tales como situaciones médicas e industriales. Por lo tanto, en la técnica se necesitan mejores medios dirigidos contra la formación del crecimiento de biopelículas.

El documento US 2002/068761 A1 se refiere a procedimientos para el uso de complejos de galio de 3-hidroxi-4-pironas en el tratamiento o prevención de infecciones producidas por un procariota del género *Mycobacterium*, incluyendo pero sin limitación, infecciones debidas a *M. tuberculosis* y *M. leprae*.

La solicitud PCT WO 03/088914 A2 se refiere a procedimientos y composiciones para la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas. Los procedimientos se basan en el descubrimiento de que el empobrecimiento de hierro biodisponible estimula la motilidad superficial en bacterias inhibiendo así la posibilidad de que una población bacteriana se desarrolle en una biopelícula.

Sumario de la invención

La presente invención supera las carencias en la técnica en cuanto a la prevención de la formación del crecimiento de biopelículas por organismos bacterianos. Por tanto, la presente invención proporciona dispositivos, tales como dispositivos médicos e industriales, revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas en el dispositivo o en la superficie del dispositivo. En una realización particular, la presente invención proporciona un procedimiento para impedir la formación del crecimiento de biopelículas en un dispositivo que comprende impregnar o revestir el dispositivo o la superficie del mismo con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas. La presente invención contempla cualquier dispositivo médico, tal como un dispositivo médico permanente, que pueda ser un vehículo para la formación del crecimiento de biopelículas y por tanto produzca infecciones nosocomiales tales como neumonías nosocomiales que a menudo se producen debido al uso de aparatos de respiración mecánica. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, se proporcionan dispositivos de respiración revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas.

La formación de biopelículas en el interior de tubos endotraqueales desempeña un papel en la iniciación de neumonía asociada con respiradores artificiales. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan tubos endotraqueales revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una

concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas.

Los catéteres vasculares son contribuyentes importantes a la producción de infecciones nosocomiales de la corriente sanguínea debido a la formación del crecimiento de biopelículas. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan catéteres vasculares revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas. Los catéteres vasculares pueden incluir un catéter del sistema nervioso central, una línea arterial, un catéter de la arteria pulmonar, un catéter central de inserción periférica (CCIP) o un catéter intermedio. El catéter del sistema nervioso central puede ser una derivación intraventricular.

Otro tipo de catéter que normalmente contribuye a infecciones nosocomiales debido a la formación del crecimiento de biopelículas es un catéter urinario. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan catéteres urinarios revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas.

La formación del crecimiento de biopelículas también puede producirse en dispositivos quirúrgicos. Por tanto, en algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan dispositivos quirúrgicos revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas.

Adicionalmente la presente invención contempla otros dispositivos médicos permanentes tales como, pero sin limitación, catéteres epidurales, o catéteres peritoneales revestidos con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas. Otros dispositivos de la presente invención pueden incluir, pero sin limitación, un dispositivo ortopédico; un dispositivo protésico, una endoprótesis, tal como una endoprótesis vascular, endoprótesis biliar, o una endoprótesis urinaria; una cánula; un tubo de nefrostomía, un marcapasos; un implante médico; una lentilla óptica u ocular tal como lentillas de contacto; o un tubo de drenaje. Otros dispositivos médicos que pueden revestirse/impregnarse con la composición que contiene galio de la presente invención incluyen, por nombrar algunos, dispositivos de intercambio de sangre, puertos de entrada vascular, catéteres cardiovasculares, circuitos extracorpóreos, prótesis implantables, injertos vasculares, bombas, válvulas cardíacas y suturas cardiovasculares.

En otras realizaciones de la presente invención, el dispositivo puede ser un dispositivo o un recipiente de administración de fluidos biológicos, tal como, pero sin limitación, una jeringa precargada, una bolsa, un frasco o una ampolla de perfusión intravenosa (IV). En otra realización adicional, el dispositivo de la presente invención puede ser un dispositivo de administración de fármacos tal como un parche. El parche puede ser un dispositivo, un sistema, una composición, un apósito o una tirita que contenga fármaco. En otra realización adicional de la invención, el dispositivo puede ser un dispositivo codificado tal como una microplaca de ordenador.

En otra realización particular de la presente invención, se proporciona un procedimiento para impedir la formación del crecimiento de biopelículas en un dispositivo médico que comprende impregnar/revestir el dispositivo o su superficie con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de la biopelícula. La impregnación o revestimiento puede comprender sumergir el dispositivo médico o la superficie del dispositivo en la composición que contiene galio; secar el dispositivo o la superficie del dispositivo; y aclarar el exceso de composición del dispositivo o de la superficie del dispositivo.

En realizaciones particulares adicionales, en aplicaciones no médicas, puede emplearse una composición de la presente invención que contenga galio para acciones anti-formación de biopelícula con galio. La biocontaminación con biopelículas bacterianas es un problema importante en muchas situaciones tales como en equipos dentales, aparatos térmicos y refrigeradores, industrias de servicios alimentarios y de tratamiento de agua y muchas otras. Por tanto, en realizaciones adicionales de la presente invención el dispositivo puede ser un dispositivo dental, tal como un implante dental, pero no se limita al mismo, y puede incluir otros dispositivos o equipos dentales.

En otras realizaciones más, la presente invención proporciona dispositivos industriales revestidos/impregnados con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas en el dispositivo o en su superficie. El dispositivo industrial puede incluir, pero sin limitación, un dispositivo de tratamiento de alimentos, un recolector de alimentos o un aparato que contenga agua. El aparato que contenga agua puede ser una piscina, una bañera, un lavabo, un depósito de almacenamiento, un pozo, una botella o un jacuzzi. En una realización adicional, el dispositivo industrial puede ser un dispositivo de tratamiento de agua, un dispositivo de enfriamiento de agua, un dispositivo de chorro de inyección de agua o un dispositivo para la fabricación de papel y pasta.

En otra realización más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para impedir la formación del crecimiento de biopelículas sobre un dispositivo industrial que comprende impregnar/revestir el dispositivo o su superficie con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para inhibir la formación del crecimiento de las biopelículas. La impregnación o revestimiento puede comprender sumergir el dispositivo industrial o la superficie del dispositivo en la composición que contiene galio; secar el dispositivo o la superficie del dispositivo; y aclarar el exceso de composición del dispositivo o de la superficie del dispositivo.

En la presente invención se contempla que la composición que contiene galio pueda aplicarse a cualquier superficie vulnerable para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelícula. Dichas superficies pueden incluir una encimera, la superficie de una mesa, un suelo, una tabla para cortar, una pared o un techo.

5 En otra realización adicional, la presente invención proporciona un kit para inhibir o impedir la formación del crecimiento de biopelículas que comprende una composición que contiene galio.

La presente invención contempla que la composición que contiene galio descrita en el presente documento puede usarse para inhibir o impedir la formación del crecimiento de biopelículas por una amplia diversidad de organismos tales como, por ejemplo, bacterias gram positivas o gram negativas. En realizaciones particulares, la formación del crecimiento de biopelículas puede producirse por especies de *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*.

10 También se contempla que la composición de la presente invención que contiene galio pueda usarse para impedir la formación de biopelículas en un modelo animal o en sujetos humanos.

Dado que las infecciones bacterianas nosocomiales, debido a la formación del crecimiento de biopelículas, pueden producir enfermedades tales como bacteremia, neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, sinusitis, artritis, infecciones del tracto urinario, tétanos, gangrena, colitis, gastroenteritis aguda, bronquitis, y una diversidad de abscesos, e infecciones oportunistas, la presente invención contempla adicionalmente un procedimiento para 15 impedir dichas enfermedades que comprende proporcionar, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición que contiene galio.

La formación de biopelícula producida por *P. aeruginosa* se ha puesto de manifiesto en infección pulmonar con fibrosis quística. Por tanto, en una realización adicional, la presente invención contempla un procedimiento para 20 impedir la formación del crecimiento de biopelícula en un sujeto que padece fibrosis quística que comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que contiene galio. La composición de la presente invención que contiene galio puede administrarse por vía sistémica, por aerosol, por vía tópica o por cualquiera de los medios conocidos en la técnica para la administración o suministro de un agente terapéutico a un sujeto.

25 La composición de la presente invención que contiene galio también puede aplicarse para impedir la formación del crecimiento de biopelículas producido por infecciones de *P. aeruginosa* en sitios distintos a los pulmones. Por ejemplo, las heridas por quemadura a menudo se infectan con *P. aeruginosa* a partir de la cual puede surgir una invasión letal de la corriente sanguínea y choque séptico. Se considera que estas infecciones implican la formación de biopelículas. Por lo tanto, la aplicación tópica de la composición de la presente invención que contiene galio en 30 las heridas podría impedir el inicio de infección impidiendo o inhibiendo la formación del crecimiento de biopelículas.

En una realización adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para destruir una biopelícula establecida en un dispositivo que comprende exponer el dispositivo a una composición que contiene galio a una concentración suficiente para destruir la biopelícula establecida. En otra realización, se proporciona un 35 procedimiento para destruir una biopelícula establecida en una superficie que comprende exponer la superficie a una composición que contiene galio a una concentración suficiente para destruir la biopelícula establecida.

En otra realización adicional, la presente invención proporciona un kit para destruir una biopelícula establecida que comprende una composición que contiene galio.

La expresión "dispositivo médico permanente" se refiere a cualquier dispositivo médico implantado o insertado en el organismo humano. Dichos dispositivos pueden implantarse o insertarse temporal o permanentemente.

40 Por tanto, la presente invención puede tener un uso en diversas aplicaciones tales como, pero sin limitación, aplicaciones industriales, aplicaciones médicas y aplicaciones en la salud pública. Independientemente de las realizaciones detalladas, la aplicabilidad de la invención no significa que sea limitante.

El uso de la palabra "un" o "uno", "una", cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "un", "uno" o "una", pero también es coherente con el significado de 45 "uno (a) o más", "al menos uno (a)" y "uno (a) o más de uno (a)".

Otros objetos características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

50 La patente o archivo de solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo (dibujos) a color serán proporcionadas por la Oficina tras solicitud y pago de las tasas exigidas.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en

este documento.

FIGURAS 1A - 1H. Imágenes de microscopia confocal de *P. aeruginosa* marcada con GFP en células de flujo de biopelícula perfundidas con medios sin lactoferrina (FIGS. 1A-1D) y con lactoferrina (20 µg/ml) (FIGS. 1D-1H). Las imágenes se obtuvieron 4 h (FIGS. 1A y 1E), 24 h (FIGS. 1B-1F), 3 días (FIGS. 1C-1G) y 7 días (FIGS. 1E-1H) después de inocular las células de flujo. Las FIGS. 1A, 1B, 1E y 1F son vistas superiores (plano x-y); barra de escala, 10 µm. Las FIGS. 1C, 1D, 1G y 1H son vistas laterales (plano x-z); barra de escala, 50 µm. Los resultados son representativos de seis experimentos.

FIGS. 2A-2B. Efecto de la conalbúmina sobre la susceptibilidad microbiana de biopelículas de *P. aeruginosa* frente a la tobramicina (FIG. 2A) y H₂O₂ (FIG. 2B). Los datos son la media ± ETM, n = 6 de tres experimentos diferentes.

FIGS. 3A-3B. Bajas concentraciones de Ga(NO₃)₃ inhiben el crecimiento de *M. tuberculosis* en condiciones fisiológicas de Fe; la inhibición del crecimiento se impide en presencia de exceso de Fe. (FIG. 3A) La *M. tuberculosis* Erdman (10⁶/ml) se incubó en medio 7H9 sin añadir OADC ni Fe en presencia de las concentraciones de Ga(NO₃)₃ indicadas. En momentos definidos, en frascos BACTEC 12B duplicados, se inocularon alícuotas de suspensiones bacterianas y posteriormente se determinó el índice de crecimiento. Se muestran los datos acumulativos a las concentraciones de Ga(NO₃)₃ indicadas a las 24, 48 y 72 h y representan la media ± ETM de tres experimentos independientes. (FIG. 3B) La *M. tuberculosis* Erdman (10⁶/ml) se incubó en medio 7H9 sin añadir OADC ni Ga, al cual se añadió Ga(NO₃)₃ 10 µM y concentraciones en aumento de citrato-Fe. A las 72 h se inocularon suspensiones bacterianas en frascos BACTEC 12B, y posteriormente se determinó el índice de crecimiento. Los resultados mostrados (media ± DT) son de un experimento representativo (n = 2). También se encontró que el Fe invertía el efecto inhibitor del crecimiento del Ga(NO₃)₃ en *M. tuberculosis* Erdman y MAC cuando los experimentos se realizaron en frascos BACTEC (medio que contiene alta concentración de Fe) (datos no mostrados).

FIGS. 4A-4B. La captación de hierro por *M. tuberculosis* se inhibe notablemente en presencia de galio, mientras que la captación de galio se inhibe a solo un pequeño grado por exceso de hierro. La *M. tuberculosis* Erdman (2 x 10⁷ ml) se incubó durante 6 h en medio 7H9 (sin añadir Fe ni OADC) con citrato de ⁵⁹Fe 500 nM (FIG. 4A) o citrato de ⁶⁷Ga (FIG. 4B) en ausencia o en presencia de las concentraciones de metal de competencia frío indicadas. Después, se lavaron las bacterias repetidamente, y se determinaron los niveles de ⁶⁷Ga o ⁵⁹Fe asociados con las bacterias. Los resultados se muestran como la cantidad de metal adquirido en función de concentraciones en aumento del metal de competencia frío. Se realizaron grupos experimentales por triplicado y los datos mostrados representan tres experimentos independientes (media ± ETM).

FIGS. 5A-5B. Ga(NO₃)₃ inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos de una manera dependiente de la concentración. Se añadieron micobacterias (Erdman, H37Ra y *M. tuberculosis* MDR) a monocapas de macrófagos derivados de monocitos (MDM) humanos o de macrófagos alveolares humanos (MAH) a multiplicidades (bacteria/macrófago) que variaban de 1:1 a 5:1 (los resultados fueron idénticos). Después de 2 h, las monocapas se lavaron, y se añadió medio de reposición. Se añadieron las concentraciones indicadas de Ga(NO₃)₃ 24 h después. Las monocapas de control estaban desprovistas de Ga(NO₃)₃. El día 3, se registraron las lecturas del índice de crecimiento de sobrenadantes combinados y lisados celulares de los pocillos por duplicado o triplicado con las concentraciones indicadas de Ga(NO₃)₃. En la FIG. 5A se muestra un experimento representativo usando los MDM (media ± DT). En la FIG. 5B se expresan datos acumulativos como el porcentaje de control (media ± ETM, n = 2 a 5). Los resultados obtenidos usando los MAH (n = 2) fueron los mismos que los obtenidos usando los MDM.

FIG. 6. Ga-transferrina inhibe la adquisición de Fe por *M. tuberculosis* en fagosomas de macrófagos de una manera dependiente de la concentración. Se añadió transferrina ⁵⁹Fe (10 µM) a los MDM que contenían *M. tuberculosis* en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones indicadas de Ga-transferrina durante 24 h. Los MDM se lisaron y los lisados se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (tamaño de poro). En el filtro se determinó la radioactividad asociada con *M. tuberculosis* (expresada en cpm (cuentas por minuto)). Se muestran los valores cpm en función de la concentración de Ga añadido de un experimento representativo. El gráfico insertado muestra los resultados de la media ± ETM de tres experimentos distintos representado como el porcentaje de control de adquisición de ⁵⁹Fe.

FIG. 7. Se inoculó *P. aeruginosa* a una DO (A600) de aproximadamente 0,010 en medio succinato solo o con complementación de FeCl₃ +/- a los quelados de Ga. Después, el crecimiento se controló como el cambio de A600 a lo largo de 6 h de incubación a 37 °C. Incubaciones más prolongadas usando Ga(NO₃)₃ mostraron un efecto similar (datos no mostrados).

FIG. 8. Efecto del galio sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Las bacterias se inocularon en medio TSB resistente 1:100 con las concentraciones de galio indicadas y se cultivaron con agitación a 37 °C. El cultivo se controló como el cambio en A600 durante 15 h.

FIG. 9. Imágenes de microscopía confocal de *P. aeruginosa* marcada con GFP en células de flujo de biopelícula perfundidas con medio de control (parte superior) y medio que contenía Ga(NO₃)₃ 0,3 µM (parte central) y ceftazidima 0,25 µg/ml (parte inferior). Las imágenes se obtuvieron 1, 2 y 4 días después de inocular las células de flujo. Las imágenes son vistas de arriba a abajo (plano x-y).

FIGS. 10A-10D. El galio destruye biopelículas establecidas. Se expusieron biopelículas de tres días de antigüedad a galio a concentraciones de 10 μ M, 100 μ M y 1000 μ M. La viabilidad de las biopelículas se evaluó con yoduro de propidio y se registraron observaciones a las 12 horas (FIG. 10A), 24 horas (FIG. 10B), 48 horas (FIG. 10C) y 72 horas (FIG. 10D). Las FIGS. 10A-10D muestran que el galio destruye biopelículas establecidas de una manera dependiente del tiempo y de la concentración y lo hace a concentraciones con niveles máximos conseguidos clínicamente (140-700 mM).

Descripción de realizaciones ilustrativas

I. La presente invención

La presente invención supera las carencias en la técnica en cuanto a impedir la formación del crecimiento de biopelículas. Dentro de las biopelículas se ha descubierto que las bacterias son intrínsecamente más resistentes a la destrucción por antibióticos y otras toxinas exógenas, tales como peróxido de hidrógeno (Costerton y col., 1999; Stewart y col., 2000; Elkins y col., 1999; Drenkard y col., 2002; Mah y col., 2001), en comparación con las células planctónicas, debido a las tasas de transporte de masa de las moléculas antimicrobianas más bajas en las células asociadas a la biopelícula (Suci y col., 1994) o debido a que las células de la biopelícula difieren fisiológicamente de las células planctónicas (Evans y col., 1991). Las concentraciones antimicrobianas, suficientes para inactivar organismos planctónicos, son generalmente inadecuadas para inactivar los organismos de las biopelículas, especialmente los que están inmersos en el interior de la biopelícula, posiblemente seleccionando subpoblaciones resistentes. La formación del crecimiento de la biopelícula también resulta difícil para las células fagocíticas huésped para obtener acceso y destruir a los microorganismos. Por tanto, se desarrollan agentes que impiden y/o alteran la formación de biopelículas producidas por organismos tales como *P. aeruginosa*.

Los autores de la presente invención han demostrado que la biodisponibilidad del hierro (Fe) es crítica en diversas etapas en la patogénesis de infección por *P. aeruginosa* que conduce la formación de biopelículas por estos organismos. El galio (Ga), puede competir con el Fe para la captación y sustitución celular de galio por Fe en enzimas que contienen Fe volviéndolas inactivas. Datos sustanciales generados por los autores de la presente invención también demuestran que el galio puede alterar la estrategia de adquisición de Fe de *M. tuberculosis*, mediada por sideróforos, una estrategia muy parecida a la empleada por *P. aeruginosa*. Datos preliminares obtenidos fueron coherentes con un efecto inhibidor similar del galio sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*. Cabe destacar, que los datos indican que el galio impide eficazmente la formación de biopelículas *in vitro* por *P. aeruginosa* a concentraciones que no inhiben el crecimiento bacteriano y que están muy por debajo de las que se sabe que pueden conseguirse en seres humanos cuando se les administra el galio con otros fines. Los datos sugieren que el galio puede alterar el metabolismo del Fe de *P. aeruginosa*, alterando por tanto etapas clave en el establecimiento de biopelículas por este organismo.

Los autores de la presente invención también han demostrado que el galio destruye eficazmente biopelículas establecidas de una manera dependiente del tiempo y de la concentración, y que lo hace a concentraciones dentro de niveles máximos conseguidos clínicamente.

Por tanto, la presente invención proporciona dispositivos o superficies de los mismos revestidos/impregnados con una composición que contiene galio para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelículas. La presente invención también proporciona un procedimiento para impedir la formación del crecimiento de biopelículas en un dispositivo o en su superficie. En realizaciones preferidas, la composición que contiene galio se utiliza para impedir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* en dispositivos tales como tubos endotraqueales, respiradores artificiales u otros dispositivos mecánicos, o en dispositivos industriales por revestimiento/impregnación del dispositivo con la composición. También se contempla que la composición de la presente invención que contiene galio pueda usarse para impedir que otros organismos, que al igual que *P. aeruginosa* dependen del Fe, formen biopelículas. La composición de la presente invención que contiene galio también puede emplearse para impedir la formación del crecimiento de biopelículas, tal como en pacientes con fibrosis quística y otros pacientes infectados por *P. aeruginosa*. Adicionalmente, la composición de la presente invención que contiene galio puede usarse para destruir biopelículas establecidas en un dispositivo o en una superficie.

II. Organismos bacterianos y formación de biopelículas

La formación del crecimiento de biopelículas se produce cuando los microorganismos se adhieren irreversiblemente a una superficie sumergida y producen polímeros extracelulares que facilitan la adhesión y proporcionan una matriz estructural. Esta superficie puede ser un material inerte, no vivo, o tejido vivo. Los microorganismos asociados a biopelículas se comportan de manera diferente a los organismos planctónicos (libremente suspendidos) con respecto a las tasas de crecimiento. Adicionalmente, las biopelículas se caracterizan por su capacidad para volverse progresivamente resistentes a tratamientos antimicrobianos (de 1000 a 1500 veces menos susceptibles). En algunos casos, las biopelículas pueden estar compuestas por unas pocas especies o por múltiples especies, dependiendo del dispositivo y de su duración de su uso en, o por, un paciente.

Se piensa que la resistencia de las biopelículas a agentes antimicrobianos se debe a la matriz extracelular en la que se encuentran las células bacterianas, proporcionando una barrera contra la penetración de biocidas (Costerton y

col., 1999). Sin embargo, también es posible que una gran cantidad de las células en una biopelícula estén en un estado de crecimiento lento, privadas de nutrientes, y por lo tanto no tan susceptibles a los efectos de los agentes antimicrobianos. Adicionalmente, la resistencia a agentes antimicrobianos puede deberse a que, en una biopelícula, las células adoptan un fenotipo biopelicular distinto y protegido, por ejemplo, por expresión elevada de bombas de salida de fármacos.

Las biopelículas pueden estar constituidas por bacterias, hongos, levaduras, protozoos y otros microorganismos. Se ha observado que las biopelículas más comunes son las biopelículas bacterianas. Tanto las bacterias gram positivas como las gram negativas pueden formar biopelículas. Son ejemplos de bacterias gram positivas que pueden formar biopelículas las que incluyen, pero sin limitación, *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos, tales como *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus pyogenes* (grupo A), especies de *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *S. bovis*, especies de *Streptococcus* (especies anaerobias), *Streptococcus pneumoniae* y especies de *Enterococcus*. Otros bacilos gram positivos incluyen *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* y especies de *Corynebacterium* que son dipteroides (aerobios y anaerobios), *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani* y *Clostridium difficile*. Son ejemplos de bacterias gram negativas que pueden formar biopelículas las especies de los géneros *Escherichia coli*, especies de *Enterobacter*, *Proteus mirabilis* y otras especies, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* y *Campylobacter jejuni*, *Neisseria* y *Branhamella catarrhalis*.

Otros organismos que pueden formar biopelículas pueden incluir dermatofitos (*Microsporum canis* y otros *M. spp.*; y *Trichophyton spp.* tales como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*), levaduras (por ejemplo, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, u otras especies de *Candida* incluyendo especies de *Candida* resistentes a fármacos), *Epidermophyton floccosum*, *Malassezia furfur* (*Pityrosporon orbiculare*, o *P. ovale*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* y otros *Aspergillus spp.*, *Zygomycetes* (*Rhizopus*, *Mucor*), *hyalohyphomycosis* (*Fusarium Spp.*), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Sporothrix schenckii*.

Los organismos que producen la formación del crecimiento de biopelículas más comúnmente aislados de dispositivos permanentes incluyen especies de *Staphylococcus* tales como *S. epidermidis* y *S. aureus*; especies de *Candida* tales como *Candida albicans*; especies de *Enterococcus* tales como *Enterococcus faecalis*, especies de *Streptococcus*; *P. aeruginosa*; *K. pneumoniae*; y dipteroides. Estos organismos pueden originarse en la piel de pacientes o de personal sanitario, en el agua corriente cuyos puertos de entrada están expuestos, o otras fuentes en el medio, específicamente en una instalación sanitaria.

La predilección de *Pseudomonas aeruginosa* para formar biopelículas es un factor principal de contribución a los problemas de formación del crecimiento de biopelículas en situaciones médicas e industriales. *P. aeruginosa* está muy asociada con el crecimiento de biopelículas y con la obstrucción de catéteres. Por ejemplo, se han aislado biopelículas de *P. aeruginosa* de implantes médicos, tales como catéteres permanentes uretrales, venosos o peritoneales (Stickler y col., 1998).

P. aeruginosa es también la causa más común de neumonía en pacientes que se someten a respiración mecánica (Lode y col., 1992; Adair y col., 1999) y esta es una infección que se encuentra entre las más devastadoras que afectan gravemente a enfermos (Chastre y col., 2002; Bergmans y col., 1998). Recientes trabajos indican que un factor clave en el desarrollo de neumonía asociada con respiración mecánica es la colonización de los tubos endotraqueales u orofaríngeos por bacterias que habitan en las biopelículas (Inglis y col., 1989; Koerner, 1997; Levine y col., 1991; Sottile y col., 1986; Bauer y col., 2002). *P. aeruginosa* es también una causa de neumonía extrahospitalaria en pacientes en fases avanzadas de SIDA (Shepp y col., 1994; Schuster y col., 1994). Estos pacientes frecuentemente se vuelven susceptibles a infecciones debido a la formación del crecimiento de biopelículas procedente de bacterias (Meynard y col., 1999).

Además de estas infecciones agudas, *P. aeruginosa* produce infecciones crónicas pulmonares en pacientes con fibrosis quística (FC) o bronquiectasia crónica (Fick y col., 1989; Marshall y col., 1991; Pollack y col., 2000) debidas a la formación del crecimiento de biopelículas (Costerton y col., 1999). La lesión pulmonar, asociada con infección persistente por *P. aeruginosa*, es normalmente la causa principal de muerte en la FC (Fick y col., 1989).

Por tanto, en una realización adicional, la presente invención contempla un procedimiento para impedir la formación del crecimiento de biopelículas en un sujeto que padece fibrosis quística que comprende proporcionar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de galio. La composición de la presente invención que contiene galio puede administrarse por vía sistémica, por aerosol, por vía tópica o por cualquiera de los medios conocidos en la técnica para la administración o suministro de un agente terapéutico a un sujeto.

La composición de la presente invención que contiene galio también puede aplicarse para impedir infecciones de *P. aeruginosa* en sitios distintos a los pulmones. Por ejemplo, las heridas por quemadura a menudo se infectan con *P. aeruginosa* a partir de la cual puede surgir una invasión letal de la corriente sanguínea y choque séptico. Se considera que estas infecciones implican la formación de biopelículas. Por lo tanto, la aplicación tópica en las heridas, de la composición de la presente invención que contiene galio, podría impedir el inicio de infección impidiendo o inhibiendo la formación de biopelículas.

Las biopelículas, tales como las formadas por *P. aeruginosa*, también plantean un problema de interés industrial (Bitton, 1994; Steelhammer y col., 1995). En la biopelícula, estos organismos crecen en un estado agregado, lo que ocasiona problemas en muchas plantas de tratamiento de agua.

III. Composiciones que contienen galio y sus usos.

El galio es un metal de transición del grupo IIIa que se ha usado en medicina nuclear como un medio para localizar neoplasmas y sitios inflamatorios. El galio localiza estos sitios por su predilección por parte de determinadas células neoplásicas e inflamatorias. Los efectos biológicos y terapéuticos del Ga^{3+} parecen estar relacionados con su capacidad de sustituirse por Fe^{3+} en muchos procesos biomoleculares, alterándolos de este modo (Chitambar y col., 1988; Hubbard y col., 1986). El Ga^{3+} , al igual que el Fe^{3+} , entra en las células de mamífero, incluyen macrófagos, mediante mecanismos de captación de hierro dependientes e independientes de transferrina (Chitambar y col., 1987; Olakanmi y col., 1994). En células tumorales que se dividen rápidamente (a diferencia de las células diferenciadas definitivamente, tales como macrófagos), el galio interfiere con la replicación del ADN celular por su capacidad de sustituirse por hierro en la ribonucleótido reductasa, dando como resultado la inactivación de la enzima debido al hecho de que el galio, al contrario que el hierro, no puede experimentar ciclado redox (Chitambar y col., 1988).

El galio también se ha usado terapéuticamente en neoplasmas cancerosos e hipercalcemia asociada con cáncer (Foster, y col., 1986; Todd y col., 1991; Jonkoff y col., 1993; Chitambar y col., 2003). También se sabe que el galio puede acumularse en células de origen mononuclear en el hígado, riñón, bazo y sistema linfático. La experiencia clínica en pacientes con hipercalcemia relacionada con cáncer indica que el nitrato de galio se tolera bien, produciendo pocos efectos secundarios clínicamente relevantes (Todd, y col., 1991; Leyland-Jones, 1991; Chitambar y col., 2003). El galio, en forma de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, está actualmente autorizado para administración intravenosa en seres humanos para el tratamiento de hipercalcemia de malignidad. Una formulación oral de galio, en forma de maltolato de galio, está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de próstata metastásico, mieloma múltiple resistente, cáncer de vejiga metastásico y linfoma resistente. Este fármaco se está desarrollando en Titan Pharmaceutical (San Francisco, CA).

También se ha observado que los compuestos que contienen galio y nitrato de galio inhiben patógenos intracelulares que producen infecciones pulmonares crónicas (véase, por ejemplo, el documento WO 98/09622 y las Patentes de Estados Unidos 5.997.912 y 6.203.822).

La presente invención proporciona una composición que contiene galio a una concentración eficaz para inhibir o impedir la formación del crecimiento de biopelículas. La cantidad de galio necesaria para inhibir la formación del crecimiento de biopelículas es menor que la necesaria para destruir o inhibir el organismo bacteriano. Por tanto, en algunas realizaciones, la concentración del galio puede ser de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 μM o mayor. En otras realizaciones de la presente invención, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM , de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 15 μM , de aproximadamente 4 μM a aproximadamente 12 μM , de aproximadamente 5 μM a aproximadamente 20 μM , de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 30 μM , de aproximadamente 15 μM a aproximadamente 40 μM , de aproximadamente 20 μM a aproximadamente 50 μM o mayor. En algunas realizaciones preferidas, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 16,25 μM a aproximadamente 100 μM . La concentración del galio de la presente invención puede depender de la cantidad de hierro disponible en la composición dado que el galio tiene la capacidad de sustituirse por hierro. Un experto habitual en la técnica sabría cómo determinar la concentración del galio basándose en la disponibilidad del hierro.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una composición que contiene galio a una concentración eficaz para destruir biopelículas establecidas. En algunas realizaciones, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 1000 μM . En otras realizaciones de la presente invención, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 140 μM a aproximadamente 700 μM . En otras realizaciones, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 10 μM a aproximadamente 100 μM . En otras realizaciones, la concentración del galio puede ser de aproximadamente 100 μM a aproximadamente 1000 μM . La concentración del galio de la presente invención puede depender de la cantidad de hierro disponible en la composición dado que el galio tiene la capacidad de sustituirse por hierro. Un experto habitual en la técnica sabría cómo determinar la concentración del galio basándose en la disponibilidad del hierro.

IV. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica han de apreciar que las técnicas desveladas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por el autor de la invención que funcionan bien en la realización práctica de la invención, y por tanto puede considerarse que constituyen modos preferidos de esta realización práctica.

Ejemplo 1

Disponibilidad del Fe y formación del crecimiento de biopelículas de *P. aeruginosa*

En la técnica se sabe bien que *P. aeruginosa* forma biopelículas mediante un proceso cuidadosamente regulado. Se ha demostrado que la formación de biopelículas está regulada por un sistema de percepción de quórum de *P. aeruginosa* (Davis y col., 1998). Trabajos previos realizados por los autores de la invención han demostrado que la disponibilidad del Fe desempeña una función crítica en la fase de establecimiento de una biopelícula por *P. aeruginosa*. Adicionalmente, los autores de la invención han demostrado que el galio puede alterar el metabolismo bacteriano dependiente de Fe. Se descubrió que el galio, a concentraciones sub-inhedoras, impedía *in vitro* la formación de biopelículas por *P. aeruginosa*.

Estudios preliminares demostraron que, concentraciones de la proteína lactoferrina (LF) de unión a Fe, que no alteraban el crecimiento de *P. aeruginosa*, inhibían intensamente la formación de biopelículas por *P. aeruginosa*, determinado microscópicamente en un modelo de célula de flujo de formación de biopelículas anteriormente desarrollado (Singh y col., 2002; FIGS. 1A-1H). La presencia de Fe invirtió este efecto y se duplicó, como se muestra en las FIGS. 2A-2B, usando los quelantes de Fe, deferoxamina y conalbúmina (Singh y col., 2002). Los resultados llevan a la conclusión de que la formación de biopelículas por *P. aeruginosa* era más sensible a niveles de Fe ambientales en comparación con el crecimiento bacteriano.

La limitación del Fe también conduce a un aumento de susceptibilidad de destrucción de *P. aeruginosa* por tobramicina o H_2O_2 (Singh y col., 2002; FIGS. 2A-2B) más probablemente debido a la formación de biopelícula alterada por la LF. Sin embargo, una vez establecida la biopelícula, la LF no pudo alterar la biopelícula. Otros trabajos demuestran que el efecto de la limitación de Fe sobre la formación de biopelícula se correlaciona con una alteración en la motilidad de *P. aeruginosa* – motilidad espasmódica estimulada por una baja disponibilidad del Fe, que supuestamente sirve para impedir que el organismo se desarrolle desde un estado planctónico hasta la iniciación de una biopelícula (Singh y col., 2002).

Estos datos sugieren que factores distintos de los quelantes de Fe que alteran la disponibilidad del hierro para su uso por *P. aeruginosa*, o que alteran sus sistemas de señalización, de tal manera que esta crea que está en un medio limitado de Fe, darán como resultado una menor predilección del organismo para formar una biopelícula.

Ejemplo 2

Actividad antimicrobiana del galio contra micobacterias patógenas

Los autores de la presente invención han demostrado previamente que el galio inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* y del Complejo Mycobacterium Avium (MAC) extracelularmente y dentro de macrófagos humanos (Olanmi y col., 2000). Se incubaron micobacterias en frascos de cultivo en caldo BACTEC 12B en ausencia o en presencia de $Ga(NO_3)_3$. El sistema BACTEC controla el crecimiento micobacteriano ya que libera el $^{14}CO_2$ generado durante la incorporación bacteriana de $[^{14}C]$ palmitato en la pared celular micobacteriana. Con $Ga(NO_3)_3$ se observó una inhibición del crecimiento, dependiente de la concentración, de cada cepa micobacteriana (Olanmi y col., 2000). El sistema BACTEC se empleó debido a su sensibilidad y velocidad. Sin embargo, su medio contiene hasta Fe hasta 1,6 mM (ensayo ferrozina). En comparación, la concentración de Fe extracelular *in vivo* es de 5-10 μM . Cuando *M. tuberculosis* Erdman se expuso a galio en caldo 7H9 preparado sin complemento de Fe (Fe 2 μM), como se esperaba, se observó inhibición significativa del crecimiento de *M. tuberculosis* a una concentración de galio mucho más baja (FIG. 3A). El valor CI_{50} fue de aproximadamente 1,25-2,5 μM a las 72 h de exposición a galio. La inhibición del crecimiento mediada por galio se invirtió a concentraciones de $Fe^{3+} \geq$ concentraciones Ga^{3+} (FIG. 3B).

Estos datos sugieren que el galio media sus efectos antimicrobianos en parte alterando la adquisición de Fe por parte de las micobacterias. Sorprendentemente, según se evaluó usando ^{67}Ga o ^{59}Fe , las bacterias parecen tener una mayor capacidad de acumulación de Fe que de Ga. Finalmente, mientras que el galio fue muy eficaz compitiendo por la adquisición de ^{59}Fe en *M. tuberculosis*, el Fe fue relativamente ineficaz bloqueando la adquisición de ^{67}Ga (FIG. 4; Olanmi y col., 2000).

Ejemplo 3

Actividad antimicrobiana del galio contra micobacterias patógenas dentro de macrófagos

El sitio crítico de crecimiento de micobacterias *in vivo* es dentro de macrófagos huéspedes. Se ha descubierto que el Ga inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* dentro de estas células (Olanmi y col., 2000; FIG. 5A). El $NaNO_3$ no tuvo efecto sobre el crecimiento micobacteriano, lo que confirma que el galio fue responsable de esto. Aunque el crecimiento micobacteriano se inhibió hasta el 50 % a las 24 h, se observó una inhibición más espectacular (>70 %) después de 48 h (FIG. 5B). Esto puede relacionarse con el tiempo requerido para la captación y tránsito del galio en el interior de macrófagos y después en las bacterias. El efecto del galio no se debió a la pérdida de la monocapa de macrófagos derivada de monocitos (MDM). De hecho, el galio impidió la pérdida de monocapas a lo largo del tiempo debido a la multiplicación de *M. tuberculosis*.

Cuando el $Ga(NO_3)_3$ se administra por vía intravenosa, la transferrina (TF) sérica, produce la quelación de la mayoría del galio (Seligman y col., 1992; Bernstein, 1998). Se descubrió que el Ga-TF era tan eficaz como el $Ga(NO_3)_3$ inhibiendo el crecimiento micobacteriano tanto en medios líquidos como en el interior de macrófagos humanos (Olanmi y col., 2000). El galio fue bactericida para *M. tuberculosis* extracelularmente e incluso lo fue más

cuando las bacterias se desarrollaban intracelularmente en macrófagos (Olakanmi y col., 2000).

Ejemplo 4

El galio disminuye la adquisición de Fe por parte de *M. tuberculosis* intracelular

Se ha observado que el Fe-TF es la forma principal de Fe extracelular y de transporte de TF exógenamente añadida a los fagosomas de macrófagos humanos que contienen *M. tuberculosis* (Clemens y col., 1996). Por lo tanto se realizó la hipótesis de que el galio competía con las bacterias que se dividían dentro del fagosoma por la captación de Fe. Los autores de la invención utilizaron un ensayo desarrollado en su laboratorio, para demostrar que *M. tuberculosis*, localizada dentro de un fagosoma de macrófago, obtiene ^{59}Fe extracelular unido a TF (Olakanmi y col., 2000). Sin embargo, la presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 10 μM disminuyó notablemente la adquisición de ^{59}Fe por *M. tuberculosis* intrafagosómica (FIG. 6; Olakanmi y col., 2000). Esto no se debió a diferencias en el ^{59}Fe total en MDM.

En dos experimentos recientes preliminares, monocapas MDM se cargaron previamente con ^{59}Fe o ^{67}Ga o ambos (pulso/captura, 24 h cada uno). Después se añadió *M. tuberculosis* Erdman. Después de 48 h, las bacterias aisladas del fagosoma se evaluaron con respecto al hierro o galio asociado. Cada metal podría encontrarse específicamente asociado con las bacterias. Cuando tanto el galio como el hierro se añadieron, la adquisición de hierro se inhibió al 71 % y 67 % (n=2); a diferencia, la adquisición de galio aumentó de manera variable (52 % y 22 %).

Ejemplo 5

Efecto del galio sobre la proteína IdeR reguladora represora de Fe

El elemento regulador del hierro, IdeR regula la producción de catalasa, SOD y sideróforos en micobacterias (Dussurget y col., 1996) de manera análoga a la proteína Fur (ferric uptake regulator) de *P. aeruginosa*. Para que se produzca la unión del ADN, la IdeR debe formar un complejo con un metal divalente tal como Fe^{2+} o Ni^{2+} . Se examinó el efecto del $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ sobre la unión (ensayo de desplazamiento de movilidad en gel) de la IdeR usando la región promotora *HisE* de *M. tuberculosis* que contenía un sitio de unión a IdeR de alta afinidad (Schmitt y col., 1995). El galio (200 μM) no condujo a la unión de IdeR con este fragmento de ADN, mientras que se observó unión con Ni^{2+} 200 μM . El galio no interfirió con la activación de unión de IdeR a Ni^{2+} o Fe^{2+} . La IdeR no parece ser una diana para el galio, lo cual no es sorprendente dado que la proteína IdeR se une selectivamente a metales divalentes y el galio es trivalente (Schmitt y col., 1995). Basándose en estos hallazgos, se expresa una ausencia similar de unión de Ga^{3+} a la proteína Fur de *P. aeruginosa*.

Ejemplo 6

El galio inhibe la actividad de la ribonucleótido reductasa en *M. tuberculosis*

A continuación se realizó la hipótesis de que la internalización del galio por parte de las bacterias podría conducir a la alteración de la actividad metabólica dependiente de Fe tal como ocurre con la ribonucleótido reductasa (RR). Coherente con esto, otros investigadores han descubierto que el galio es un fuerte inhibidor de la actividad de la RR; se utilizó un ensayo de reducción de CDP radiomarcada con respecto a la actividad de la RR y de la RR de *M. tuberculosis*, una RR de tipo II (Yang y col., 1994; 1997). El galio 450 μM inhibió la actividad de la RR al 50 % (n=2), lo que sugería que el galio podía inhibir la enzima desplazando directamente al Fe desde el sitio activo de la enzima. La fuerza del galio en este ensayo es 10 veces mayor que la de la hidrourea (Cl_{50} =3-5 mM), un agente convencional usado experimentalmente para inhibir la RR (Yang y col., 1997). Como se ha indicado anteriormente, se ha descrito que *P. aeruginosa* es mucho más susceptible a la inhibición de su crecimiento y a la producción de ADN por hidroxihidrourea que otras especies bacterianas (Gale y col., 1964). Aunque no existen datos sobre la Cl_{50} del galio para la RR de mamífero purificada, se ha descrito que se necesitó galio a una concentración de 16 mM (aproximadamente 35 veces mayor que la Cl_{50} del galio para la RR de *M. tuberculosis*) para disminuir el pico característico de EPR del radical tirosilo de la RR al 50 % en un extracto acelular de células L1210 de mamífero (Narasimhan y col., 1992). La concentración de galio necesaria para inhibir la RR en el contexto de bacterias intactas puede ser mucho menor que la necesaria para inhibir la enzima purificada usada en estos estudios.

Ejemplo 7

Efecto del galio sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*

Los datos anteriores sugieren que el galio altera eficazmente el metabolismo del hierro de las micobacterias impulsando a examinar el posible impacto del galio sobre el metabolismo del hierro del crecimiento de *P. aeruginosa* en medios con succinato. El crecimiento de *P. aeruginosa* es dependiente de la adición de Fe exógeno (FIG. 7). La inclusión de 1 μM de FeCl_3 a la cepa PA01 de *P. aeruginosa* en medio con succinato produjo un aumento de >10 veces en la concentración de *P. aeruginosa* (A600) durante 6 h, mientras que se observó un incremento insignificante cuando no se añadía hierro. Cuando el galio, tanto en forma $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ como Ga-TF, se añadió al medio con succinato complementado con hierro a concentraciones $\geq 1 \mu\text{M}$, se observó una inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* dependiente de la concentración de galio (FIG. 7). El galio 100 nM no inhibió el crecimiento (no mostrado). En condiciones diferentes se observaron resultados similares (véase más adelante).

Ejemplo 8**El galio inhibe la formación de biopelículas de *P. aeruginosa***

Los datos indican que la quelación del hierro mediante la lactoferrina inhibe el desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa* y que el galio puede alterar la adquisición de hierro microbiana. Estos resultados sugieren que el galio puede tener acciones anti-biopelícula. Por lo tanto, la administración del galio para bloquear la formación de biopelículas proporciona un posible enfoque terapéutico dado que la quelación eficaz del hierro *in vivo* posiblemente sea muy difícil por diversas razones.

En primer lugar, muchas bacterias patógenas poseen mecanismos de adquisición de hierro muy eficaces. Por lo tanto, un quelante eficaz tendría que unirse al hierro con una afinidad extremadamente alta. En segundo lugar, el hierro biodisponible ya está muy limitado por las proteínas de unión huéspedes presentes en fluidos extracelulares. Esto hace que sea poco probable que los quelantes farmacéuticos puedan reducir mucho más el hierro disponible. En tercer lugar, organismos patógenos, como *P. aeruginosa*, producen enzimas que pueden degradar quelantes de hierro. Por último, las células humanas necesitan hierro para realizar muchos procesos fisiológicos. Por tanto, incluso si fuese posible una limitación eficaz de hierro, esto podría tener efectos adversos en el huésped.

Para investigar la posibilidad de que el galio inhibiese el desarrollo de biopelículas, se determinó una concentración sub-inhibidora de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ (que no alteraba el crecimiento de *P. aeruginosa* en el medio usado en experimentos de biopelícula, TSB con resistencia 1:100). Fue importante evaluar las acciones específicas anti-biopelícula del galio y no los efectos que implicaba la inhibición del crecimiento. Como se observa en la FIGURA 8, el $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ no disminuyó significativamente la tasa de crecimiento de *P. aeruginosa* (en cultivo discontinuo) hasta alcanzar concentraciones que superaban 1 μM .

En experimentos iniciales de biopelícula, se utilizó $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ a una concentración de 0,3 μM , que era 3 veces más baja que la concentración inhibidora de *P. aeruginosa* en este medio. Para evaluar el efecto de la lactoferrina sobre la formación de biopelícula, se cultivó *P. aeruginosa*, que expresaba la proteína verde fluorescente (GFP), en células de flujo de cultivo continuo y se realizó un seguimiento del desarrollo de la biopelícula a lo largo del tiempo. Cámaras de células de flujo se perfundieron de manera continuada con medio biopelicular con o sin $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$.

En medio sin galio (FIG. 9), se observaron las fases típicas del desarrollo de una biopelícula. Inicialmente, las bacterias estaban unidas a la superficie. Después de 2 días de crecimiento, aparecieron microcolonias (grupos de células que se forman precozmente en el desarrollo de la biopelícula). El cuarto día, se habían formado biopelículas con forma de columna. El galio alteró este patrón de desarrollo. En presencia de $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$, las bacterias se unieron, pero se inhibieron las siguientes etapas de la formación de la biopelícula (FIG. 9). Incluso después de una incubación prolongada, las bacterias no se ensamblaron en estructuras biopeliculares diferenciadas; en presencia de galio permanecieron en una capa fina.

Debido al efecto drástico del galio sobre la formación de biopelículas, se realizaron experimentos adicionales para examinar si concentraciones sub-inhibidoras de otros agentes microbianos se comportaban de manera similar. La FIG. 9 muestra que las concentraciones sub-inhibidoras de la ceftazidima, un antibiótico antiseudomonal, no inhibió el desarrollo de biopelículas. Esto sugiere que la inhibición de las biopelículas no es un efecto general de antibióticos a concentraciones sub-inhibidoras. A continuación se estudia el mecanismo mediante el cual el galio ejerce este efecto.

Ejemplo 9**El galio destruye biopelículas establecidas**

Los datos anteriores sugieren que el galio inhibe la formación de biopelículas impulsando a examinar el posible impacto del galio sobre biopelículas establecidas. Se expusieron a galio biopelículas de tres días de antigüedad a concentraciones de 10 μM , 100 μM ; y 1000 μM . La viabilidad de la biopelícula se evaluó con yoduro de propidio y a las 12 horas (FIG. 10A), 24 horas (FIG. 10B), 48 horas (FIG. 10C) y 72 horas (FIG. 10D) se registraron las observaciones. Las FIGS. 10A-10D muestran que el galio destruye biopelículas establecidas de una manera dependiente del tiempo y de la concentración, y lo hace a concentraciones dentro de niveles máximos alcanzados clínicamente (140-700 mM).

A la luz de la presente divulgación, todas las composiciones y/o procedimientos y/o aparatos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin excesiva experimentación.

Referencias

Patente de Estados Unidos 5.997.912 US 2002/068761 A1
 Patente de Estados Unidos 6.203.822 WO 03/0889014 A2
 Patente de Estados Unidos 6.267.979
 Patente de Estados Unidos 6.086.921
 Patente de Estados Unidos 5.688.516

- Adaire y col., *Intensive Care Med.*, 25: 1072-1076, 1999.
 Adair y col., *J. Antimicrob. Chemother.*, 31: 689-697, 1993.
 Anwar y col., *Antimicrob Agents Chemother.*, 36: 1208-14, 1992.
 Bauer y col., *Monaldi Arch. Chest Dis.*, 57: 84-87, 2002.
 5 Bergmans y col., *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, 19: 853-855, 1998.
 Bernstein, *Pharmacol. Rev.*, 50:665-682, 1998. Bitton, in *Wastewater Microbiology*, Wiley-Liss, Nueva York, NY, 1994.
 Chastre y col., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 165: 867-903, 2002.
 Chitambar, *Semin Oncol.*, 30(2 Suppl 5):1-4, 2003.
 10 Chitambar y col., *Blood*, 72:1930-1936, 1988.
 Chitambar y col., *Cancer Res.*, 47:3929-3934, 1987.
 Clemens y col., *J. Exp. Med.*, 184:1349-1355, 1996
 Costerton y col., *Science*, 284: 1318-1322, 1999.
 Darouiche y col., *N Engl J Med.*, 340: 1-8, 1999.
 15 Davis y col., *Science*, 280: 295-298, 1998.
 Drenkard y col., *Nature*, 416: 740-743.
 Dussurget y col., *Mol. Microbiol.*, 22: 535-544, 1996.
 Elkins et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 4594-4600, 1999.
 Evans y col., *J Antimicrob Chemother.*, 27: 177-84, 1991.
 20 Fick, *Chest*, 95: 2065-213S, 1989.
 Fick y col., *Chest*, 96: 158-164, 1989.
 Flowers y col., *JAMA*, 261: 878-83, 1989.
 Foster y col., *Cancer Treat Rep.*, 70: 1311-1319, 1986.
 Freeman y col., *J Antimicrob Chemother.*, 15: 258, 1985.
 25 Gale y col., *Cancer Res.*, 24: 1012-1020, 1964.
 Gorman y col., *Biomaterials*, 22: 2741-2747, 2001.
 Hubbard y col., *Arch. Microbiol.*, 146:80-86, 1986.
 Inglis y col., *J. Clin. Microbiol.*, 27:2014-2018, 1989.
 Jonkoff y col., *Br. J. Cancer*, 67:693-700, 1993.
 30 Kamal y col., *JAMA*, 265:2364-8, 1991.
 Klempner y col., *Hospital infections and health-care epidemiology*, In: *INFECTIOUS DISEASES: MEDICAL KNOWLEDGE SELF-ASSESSMENT PROGRAM, 2ND EDITION*, American College of Physicians, Philadelphia, PA, página 210, 1998.
 Koerner, *J. Hosp. Infect.*, 35:83-89, 1998. Leu y col., *Am. J. Epidemiol.*, 129: 1258-1267, 1989.
 35 Levine y col., *Clin. Chest Med.*, 12: 523-543, 1991.
 Leyland-Jones, *Semin Oncol.*, 18: 16, 1991.
 Lode y col., *Intensive Care Med.*, 18 Suppl 1: S24-S27, 1992.
 Lyczak y col., *Microbe. Infect.*, 2: 1051-1060, 2000.
 Mah y col., *Trends Microbiol.*, 9: 34-39, 2001.
 40 Maki, In: Bisno AL, Waldvogel FA, editors. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2ª ed. Washington: American Society for Microbiology; páginas 155-212, 1994.
 Marshall y col., *Semin. Respir. Infect.*, 6:11-18, 1991. Meynard y col. *J. Infect.* 3(3): 176-81, 1999.
 Narasimhan y col., *Biochem. Pharmacol.*, 44: 2403-2408, 1992.
 Olakanmi y col., *Infect. Immun.*, 68: 5619-5627, 2000.
 45 Olakanmi y col., *J. Immunol.* 153: 2691-2703, 1994.
 Platt y col., *J. Hosp. Infect.*, 11: 396-397, 1988.
 Pollack, In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, Mandell y col. (Eds.), Churchill Livingstone, NY, 2310-2335, 2000.
 Raad, *Lancet*, 351: 893-898, 1998.
 50 Schmitt y col., *Infect. Immun.*, 63: 4284-4289, 1995.
 Schuster y col., *AIDS*, 8: 1437-1441, 1994.
 Seligman y col., *Am. J. Hematol.*, 41: 232-240, 1992.
 Shepp y col., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 7: 823-831, 1994
 Singh y col., *Nature*, 417: 552-555, 2002.
 55 Sottile y col., *Crit. Care Med.*, 14: 265-270, 1986.
 Steelhammer y col., *Indust. Water Treatm.*, 49-55, 1995.
 Stewart y col., *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:836-838, 2000
 Stickler y col., *Appl Environ Microbiol.*, 64(9): 3486-90, 1998.
 Suci y col., *Antimicrob Agents Chemother.*, 38: 2125-33, 1994.
 60 Todd y col., *Drugs*, 42:261-273, 1991.
 Wenzel y col., *N Engl J Med.*, 340:48-9, 1999.
 WO 98/09622
 WO 03/088914 A2
 Yang y col., *J. Bacteriol.*, 179: 6408-6415, 1997.
 65 Yang y col., *J. Bacteriol.*, 6738-6743, 1994.

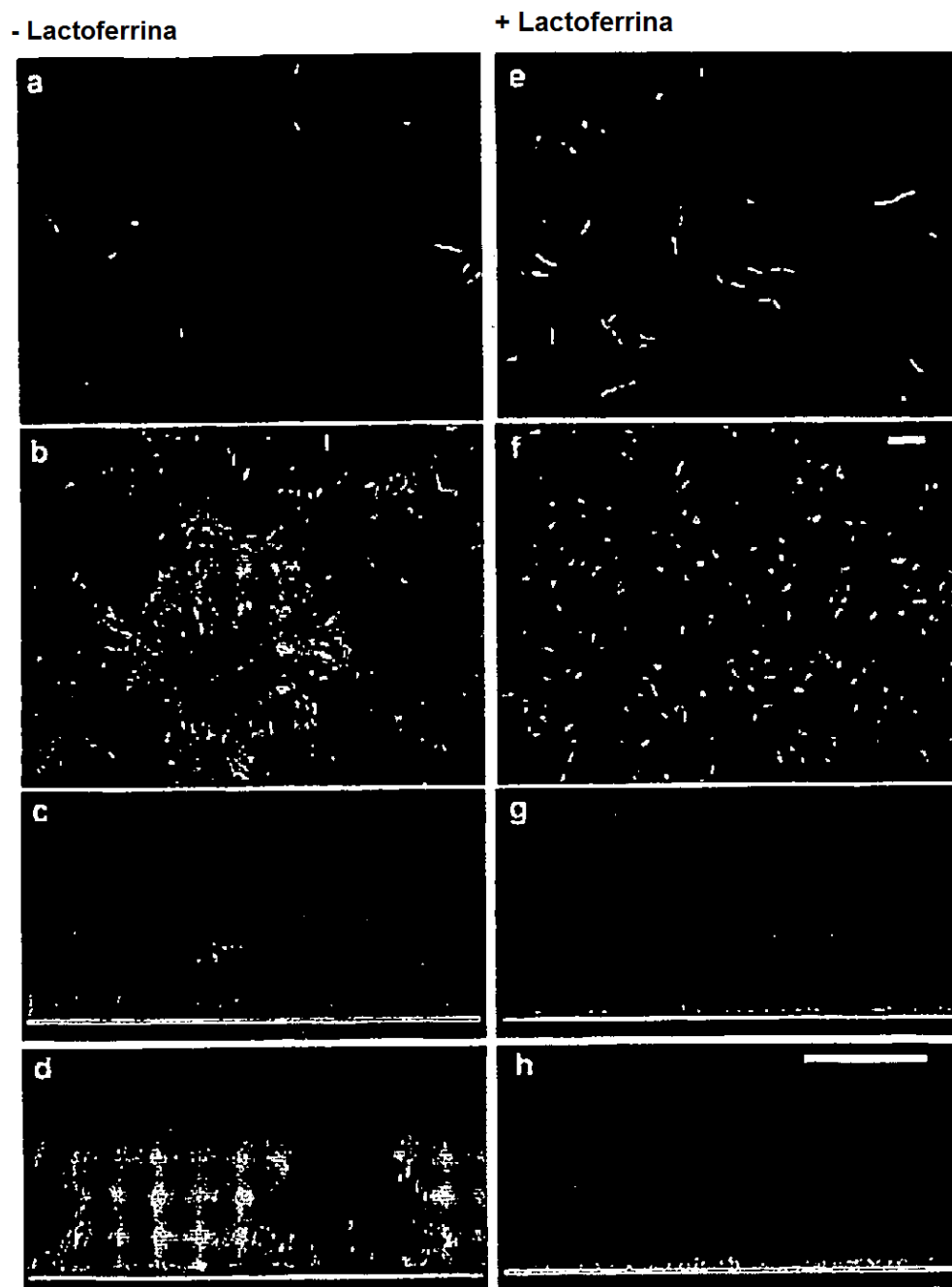
REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo, o la superficie de un dispositivo, revestido o impregnado, con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelículas sobre dicho dispositivo o superficie del dispositivo.
- 5 2. El dispositivo o la superficie del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo es un dispositivo médico, en el que, en particular, dicho dispositivo médico es un dispositivo médico permanente, preferentemente, un catéter, más preferentemente (i) un catéter vascular, tal como (a) un catéter del sistema nervioso central, por ejemplo, una derivación intraventricular, (b) una línea arterial, (c) un catéter de la arteria pulmonar, (d) un catéter central de inserción periférica (CCIP) o (e) un catéter intermedio, (ii) un catéter epidural, (iii) un catéter peritoneal o (iv) un catéter urinario.
- 10 3. El dispositivo o la superficie del mismo de la reivindicación 2, en el que dicho dispositivo médico es (a) un dispositivo ortopédico, (b) un dispositivo protésico, (c) un dispositivo endotraqueal, (d) una endoprótesis, en particular una endoprótesis vascular, una endoprótesis biliar o una endoprótesis urinaria, (e) una cánula, (f) un marcapasos, (g) un implante médico, (h) una lentilla óptica tal como una lentilla de contacto, (i) una lentilla ocular o (k) un dispositivo quirúrgico.
- 15 4. El dispositivo o la superficie del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo es (a) un dispositivo dental, tal como un implante dental, (b) un respirador artificial, (c) un inhalador, (d) un tubo de drenaje, (e) un dispositivo o un recipiente distribuidor de fluidos biológicos, tal como una jeringa precargada, una bolsa, un frasco o una ampolla de perfusión intravenosa (IV) o (f) un dispositivo distribuidor de fármaco tal como un parche, en particular un dispositivo, un sistema, una composición, un apósito o una tirita que contenga fármaco.
- 20 5. El dispositivo o la superficie del mismo de la reivindicación 1, en el que el dispositivo comprende un dispositivo codificado tal como una microplaca de ordenador.
- 25 6. El dispositivo o la superficie del mismo de la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo es un dispositivo industrial tal como (a) un dispositivo de tratamiento de alimentos, (b) un dispositivo de recogida de alimentos, (c) un colector de agua, tal como una piscina, una bañera, una fuente, un filtro, un depósito, un pozo, una botella o un jacuzzi, (d) un dispositivo de tratamiento de agua, (e) un dispositivo de enfriamiento de agua, (f) un dispositivo de chorro de inyección de agua, (g) un dispositivo de fabricación de papel y pasta o (h) un sistema o aparato de distribución de agua.
- 30 7. Un procedimiento para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelículas o para destruir una biopelícula establecida en un dispositivo o una superficie tal como una superficie del dispositivo, comprendiendo el procedimiento la etapa de impregnar o revestir dicho dispositivo o superficie con una composición que contiene galio a una concentración suficiente para impedir o inhibir la formación del crecimiento de la biopelícula o para destruir la biopelícula establecida en dicho dispositivo o superficie.
- 35 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa de impregnación o revestimiento comprende la etapa de (a) sumergir el dispositivo o la superficie en dicha composición que contiene galio y, opcionalmente, la etapa de (b) secar el dispositivo o la superficie o (c) aclarar el exceso de composición del dispositivo o de la superficie.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la biopelícula es una biopelícula bacteriana, en particular en el que la biopelícula bacteriana es una biopelícula producida por una especie de *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*.
10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el dispositivo es como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
11. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la superficie es una encimera, una superficie de una mesa, un suelo, una tabla para cortar, una pared o un tejado.
- 45 12. Uso de una composición que contiene galio para inhibir o impedir el crecimiento de una biopelícula o para destruir una biopelícula establecida.
13. Uso de una composición que contiene galio en la fabricación de un producto farmacéutico para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelícula o para destruir una biopelícula establecida dentro o sobre un sujeto.
- 50 14. Uso de la reivindicación 13, en la que la formación del crecimiento de biopelícula es la formación del crecimiento de biopelícula bacteriana, en la que, en particular, la formación del crecimiento de biopelícula bacteriana lo provoca una especie de *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*.
15. Uso de la reivindicación 13, en la que la formación del crecimiento de biopelícula está provocado por hongos, levaduras o protozoos.

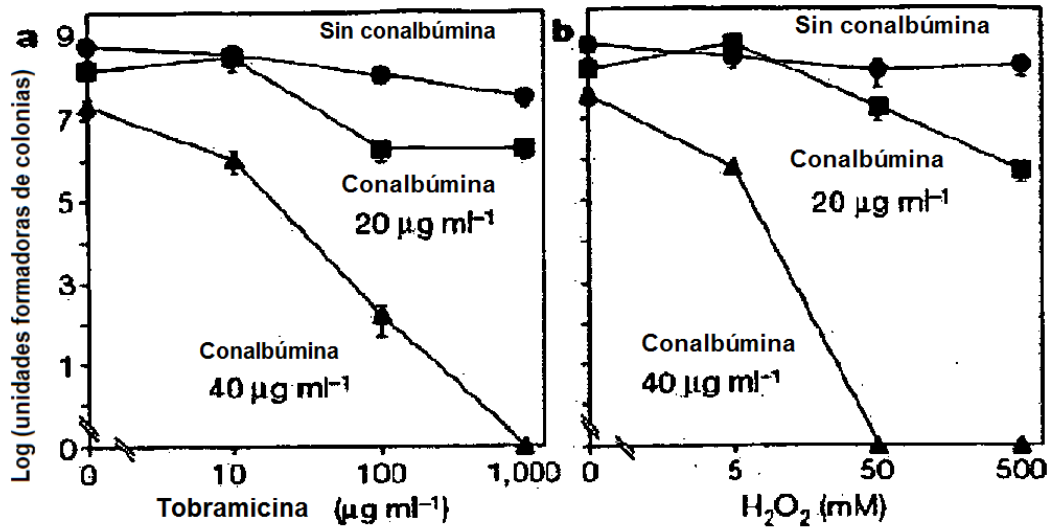
16. Uso de la reivindicación 13, en la que la biopelícula establecida está en el pulmón y está provocada por una infección pulmonar tal como una fibrosis cística.

17. Uso de la reivindicación 13, en la que el producto farmacéutico es para impedir o inhibir la formación del crecimiento de biopelícula en heridas por quemadura.

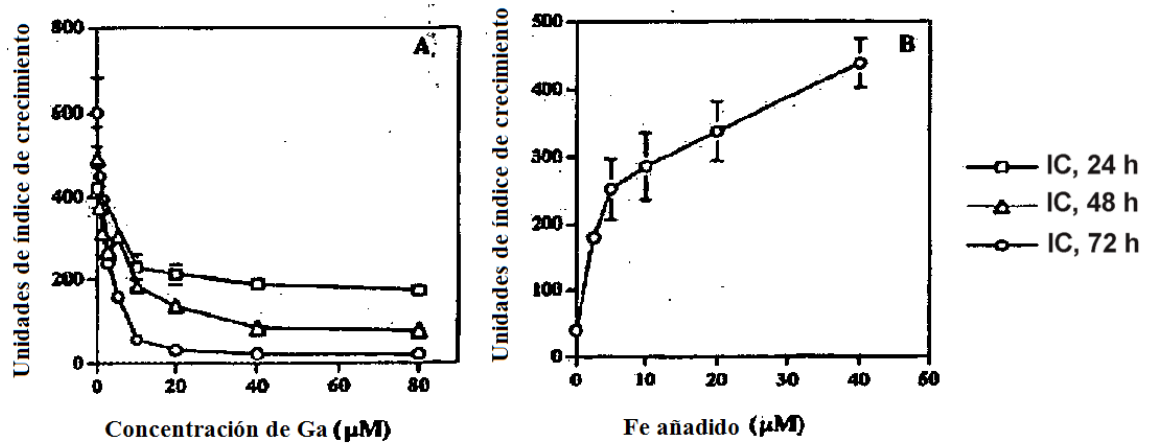
5 18. Uso de la reivindicación 13, en la que el producto farmacéutico se formula para la administración sistémica o tópica o para la administración por aerosol.



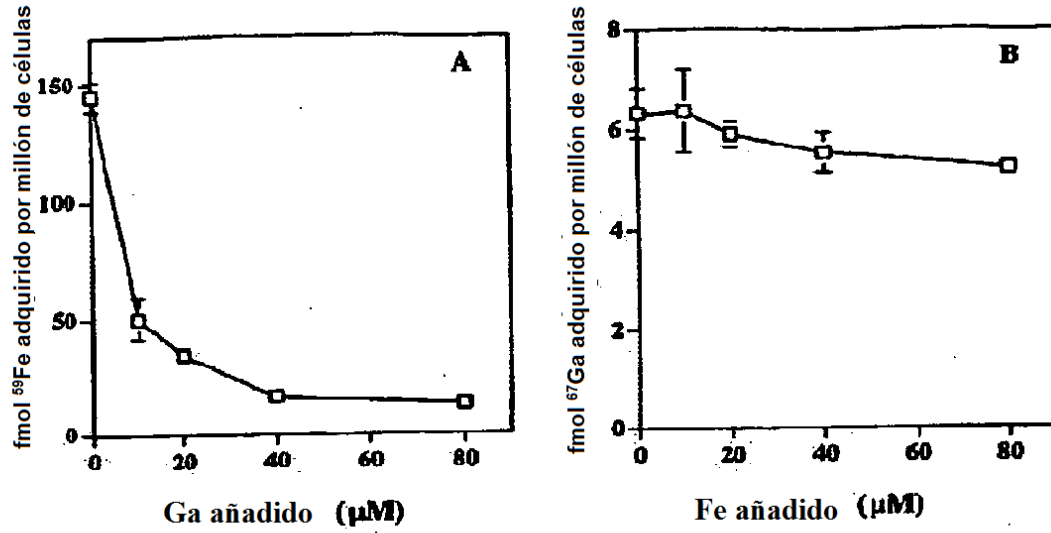
FIGS. 1A-1H



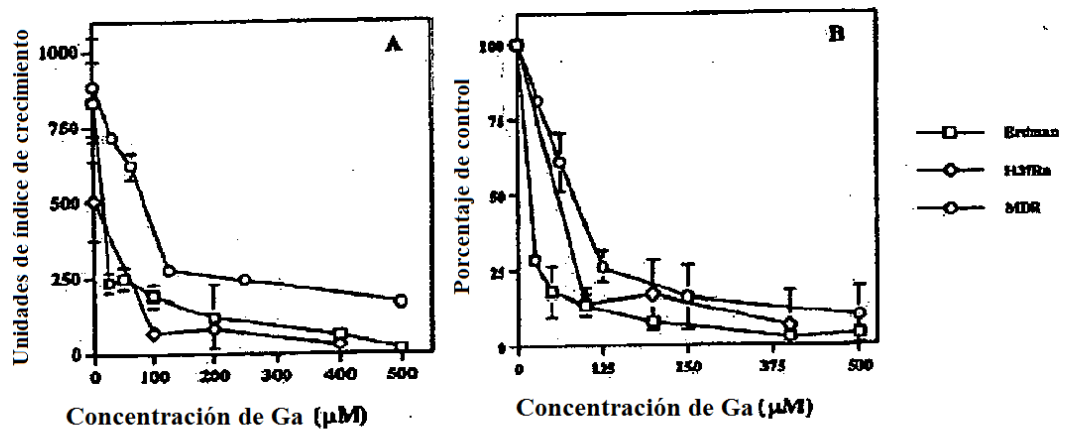
FIGS. 2A-2B



FIGS. 3A-3B



FIGS. 4A-4B



FIGS. 5A-5B

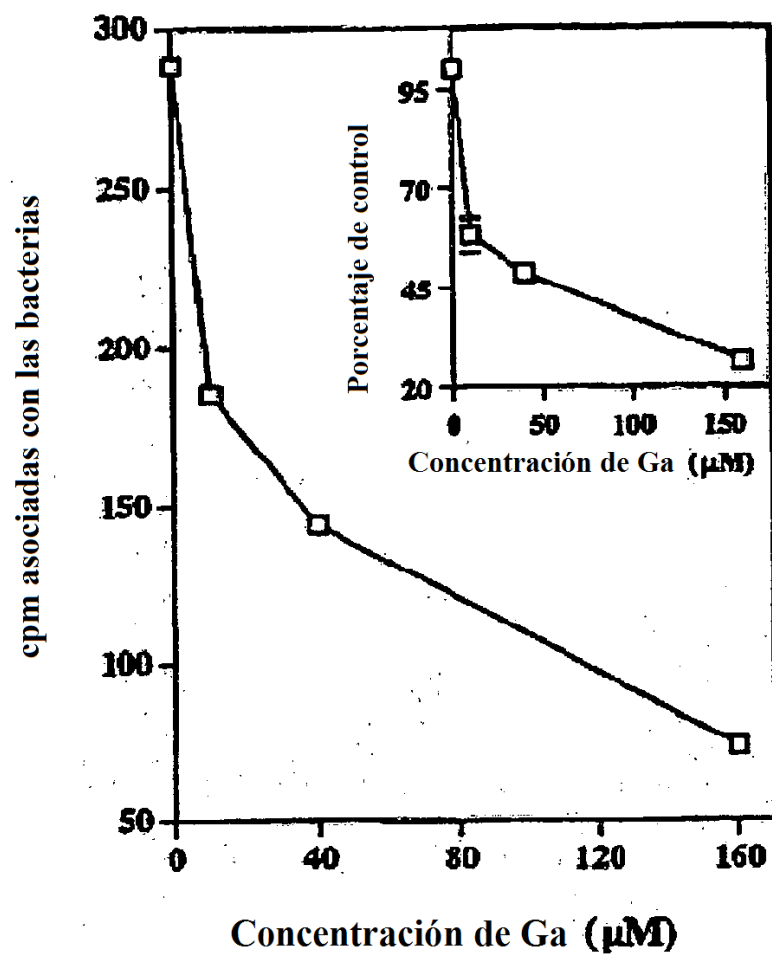


FIG. 6

Competencia por el galio

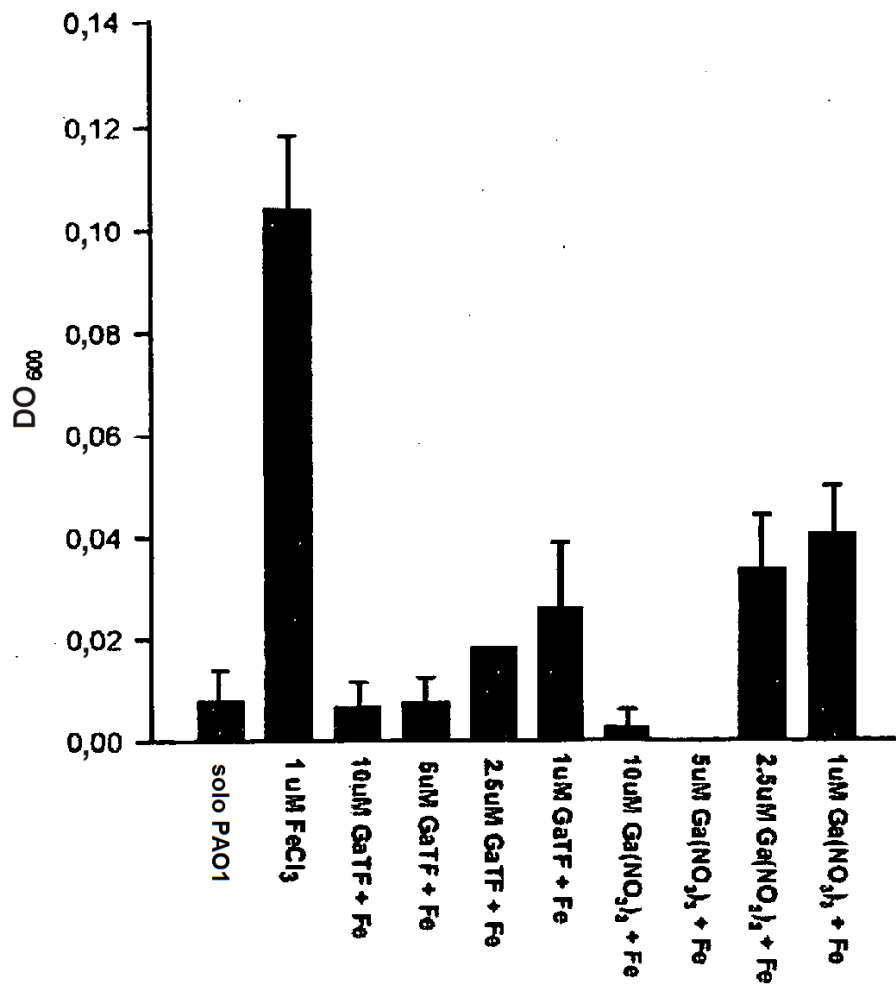


FIG. 7

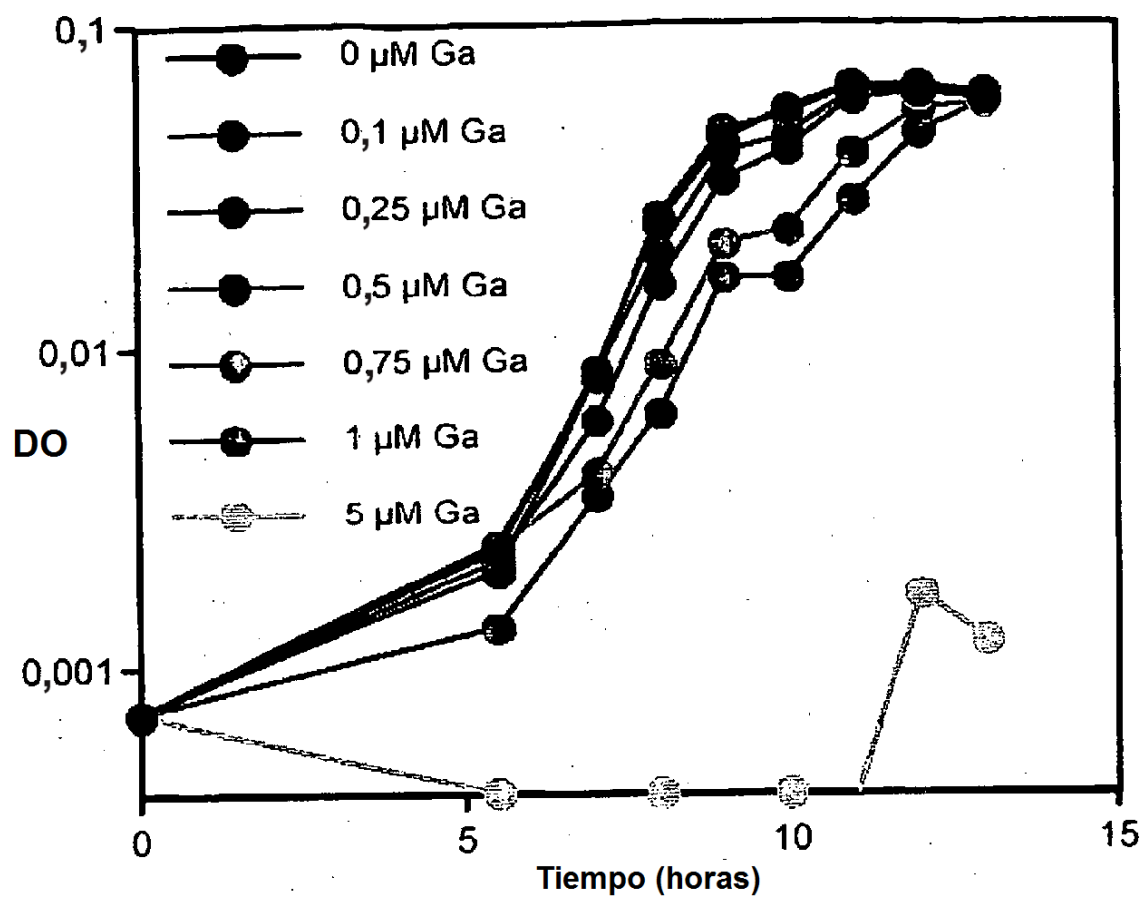


FIG. 8

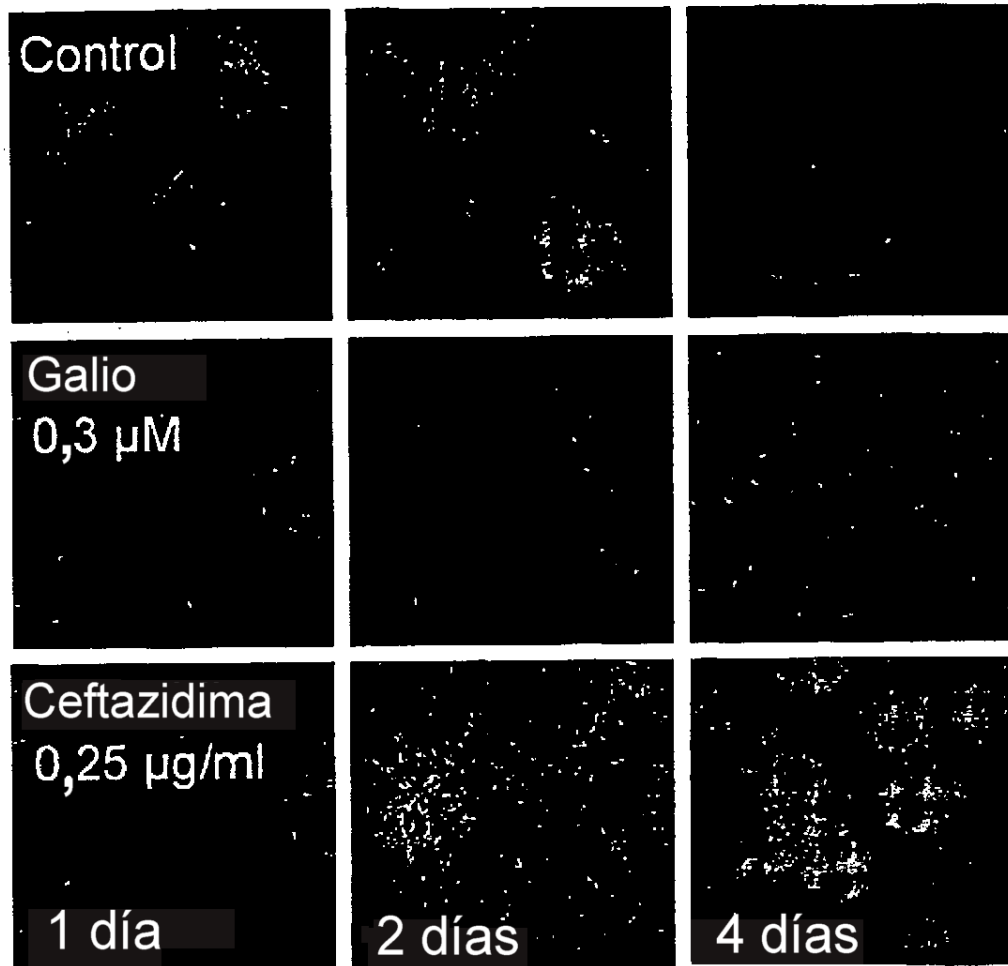


FIG. 9

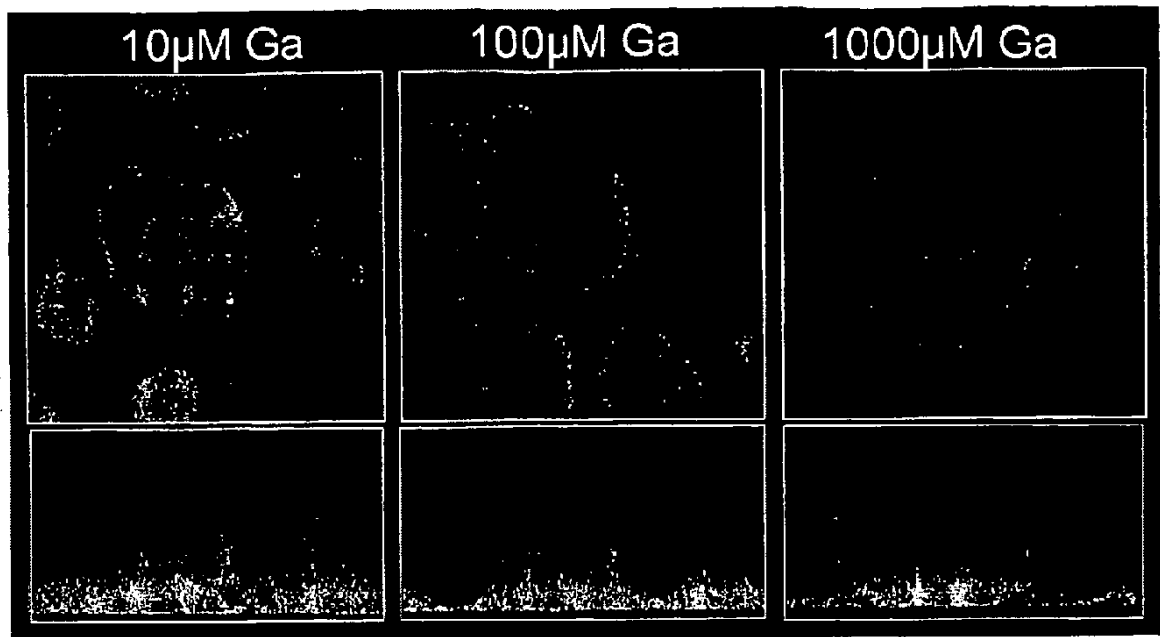


FIG. 10A

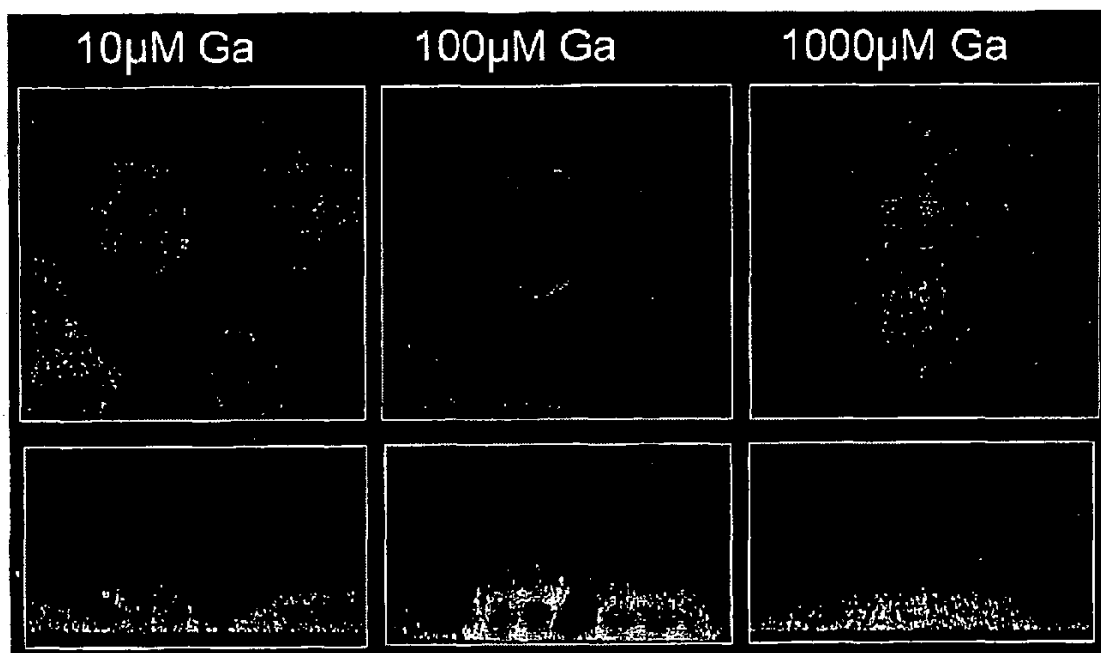


FIG. 10B

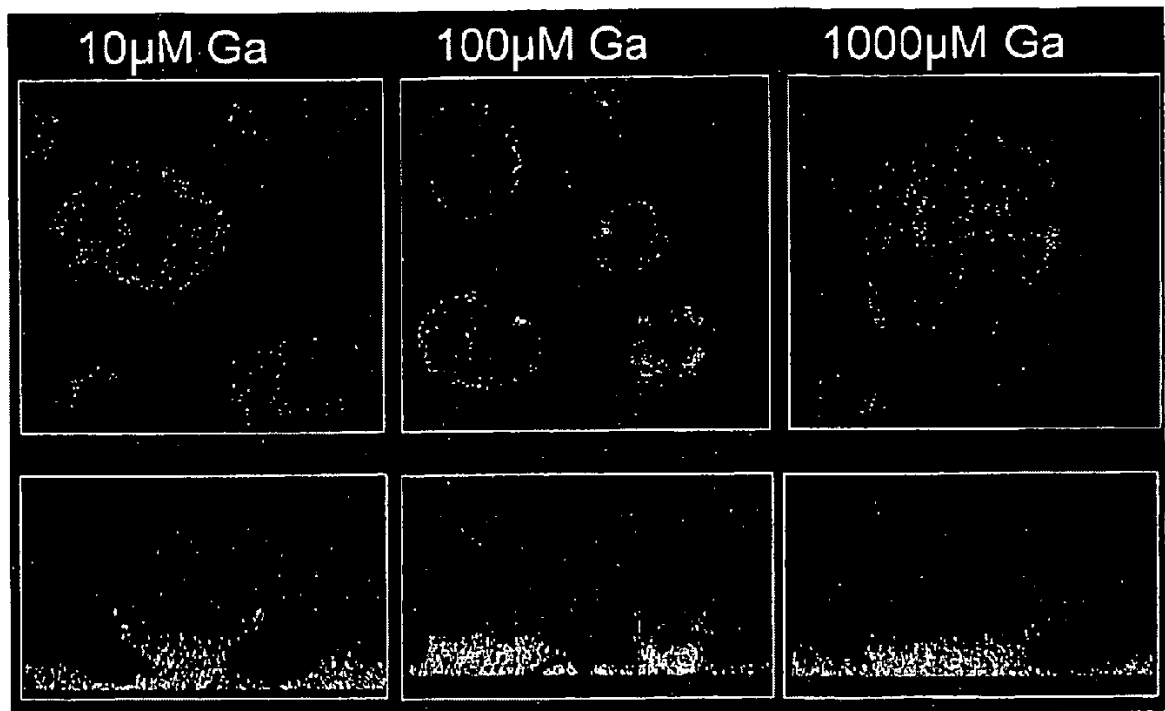


FIG. 10C

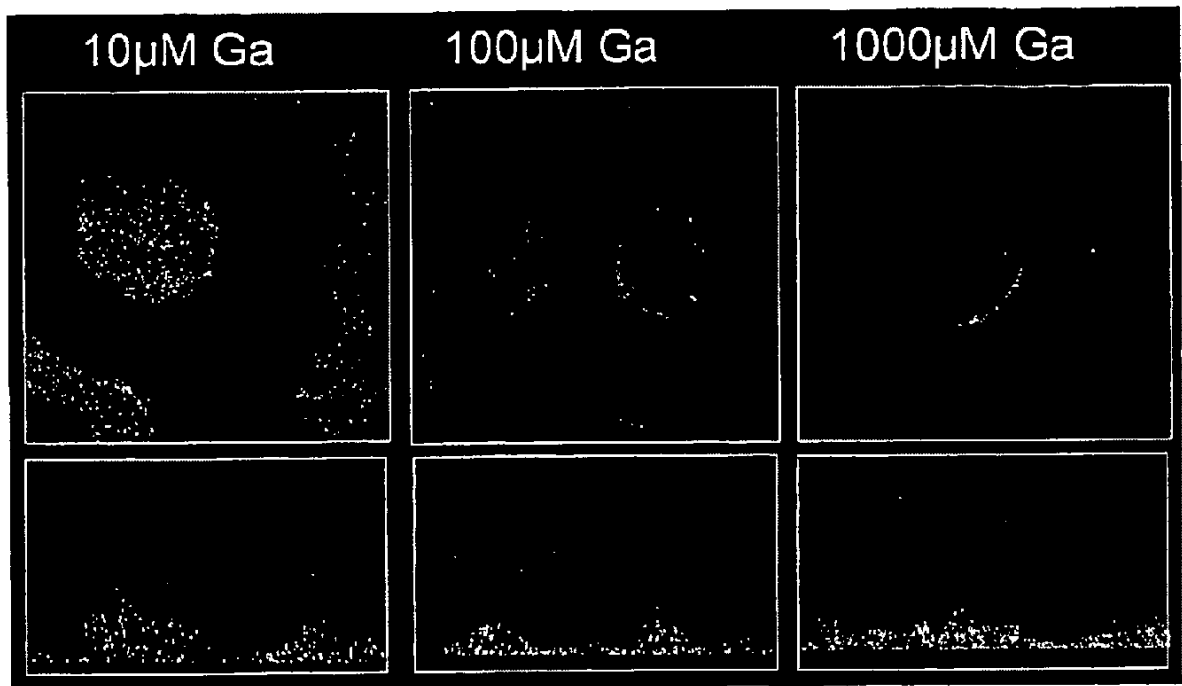


FIG. 10D