

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 792**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/44** (2006.01)

**A01P 1/00** (2006.01)

**A01N 25/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2009 E 09767399 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2306821**

54 Título: **Uso de quelantes de zinc que comprenden DTPA para inhibir la formación de biopelículas**

30 Prioridad:

**30.05.2008 US 57267**

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

**12.12.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CINCINNATI (100.0%)  
51 Goodman Drive Suite 240  
Cincinnati, OH 45221-0829, US**

72 Inventor/es:

**HERR, ANDREW, B.;  
CONRADY, DEBORAH, GAIL;  
BRESCIA, CRISTIN, C. y  
WARD, STEFANIE, L.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 524 792 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

Uso de quelantes de zinc que comprenden DTPA para inhibir la formación de biopelículas

5 La presente invención se refiere a las áreas de la microbiología y la bioquímica, y más específicamente a los métodos para inhibir la formación de una biopelícula bacteriana, en donde la bacteria diana comprende al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de los mismos, el método comprende poner en contacto las bacterias con una cantidad eficaz de al menos un quelante de zinc, de manera que la formación de las biopelículas se inhibe y se caracteriza además porque al menos un  
10 quelante de zinc comprende DTPA.

Recientemente se estimó que las infecciones que se adquieren en los hospitales (nosocomiales) son la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos, al afectar a 2 millones de pacientes por año y al causar más de 100,000 muertes anuales, con un costo anual total de más de \$ 30 billones. Especies estafilocócicas tales como *S. epidermidis* y *S. aureus* son  
15 responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales; el tratamiento de estas infecciones frecuentemente se hace mucho más difícil por la tendencia de los estafilococos de formar biopelículas.

Las biopelículas son comunidades de bacterias que se adhieren a sustratos biológicos o abióticos, se diferencian en micro- y macrocolonias, y producen una matriz extracelular típicamente compuesta por polisacáridos y proteínas. Las bacterias en  
20 las biopelículas son resistentes a los antibióticos y a las respuestas inmunes del huésped y son extremadamente difíciles de erradicar. Por ejemplo, las infecciones que se relacionan con los dispositivos que se deben a las biopelículas estafilocócicas a menudo requieren la extirpación quirúrgica del dispositivo que se implanta, el desbridamiento del tejido circundante, y el tratamiento prolongado con antibióticos.

Las infecciones estafilocócicas son una amenaza re-emergente considerable para la salud humana. A partir de la década de 1980 se observó un aumento dramático en las infecciones que se adquieren en los hospitales, que se asocia principalmente con *S. epidermidis* y con otros estafilococos coagulasa negativos. *S. epidermidis* es el único responsable de hasta dos tercios de todas las infecciones del sistema nervioso central que se relacionan con los catéteres o con un shunt, así como también de hasta la mitad de todas las infecciones de las válvulas cardíacas protésicas o articulaciones artificiales. Las  
30 infecciones nosocomiales que tienen como causa a los estafilococos son frecuentemente persistentes y recurrentes, particularmente en el caso de las infecciones de dispositivos médicos permanentes. Además, las biopelículas de *S. epidermidis* que se relacionan con los dispositivos pueden conducir a una endocarditis o una septicemia. Así mismo, las infecciones de *S. aureus* que se relacionan con las biopelículas pueden llegar a diseminarse a otras regiones, lo cual es una preocupación debido a la gran cantidad de toxinas y enzimas que degradan los tejidos que se liberan por *S. aureus*.

Industrialmente, las biopelículas pueden acumularse en una amplia variedad de sustratos e interferir en una serie de aplicaciones industriales y comerciales, lo que incluye los sistemas de tuberías, sistemas de enfriamiento por agua en centrales eléctricas, refinerías, plantas químicas, sistemas de aire acondicionado, y similares. Si no se controla, la contaminación biológica que se causa por la formación de las biopelículas puede interferir con las operaciones, disminuir la  
40 eficiencia de los sistemas, desperdiciar la energía y los recursos, y afectar negativamente a la calidad del producto.

Existe una necesidad de controlar e inhibir la formación de biopelículas en las aplicaciones médicas e industriales. Un área de interés actual implica el uso de la quelación de metales como un medio de inhibición de las biopelículas. La presente invención se refiere específicamente a la quelación de iones metálicos de zinc en las biopelículas compuestas por bacterias que tienen un módulo de adhesión de zinc.  
45

Los métodos de inhibición de la formación de biopelículas en entornos médicos e industriales se desarrollaron previamente mediante la utilización de quelantes de metales, específicamente quelantes de hierro. Por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 6,267,979, que se concedió el 31 de julio del 2001, a Raad y otros, describe el uso de los quelantes de metales en combinación con antimicóticos o composiciones antibióticas para la prevención de la contaminación biológica en el tratamiento de agua, la fabricación de pulpa y papel y las inundaciones de agua en los yacimientos de petróleo. La patente de los EE.UU. núm. 7,314,857, que se concedió el 1 de Enero, del 2008, a Madhyastha, describe composiciones antimicrobianas sinérgicas para inhibir la formación de biopelículas mediante la utilización de combinaciones de una glicoproteína secuestrante de hierro, un péptido catiónico, y un agente quelante de hierro. La patente de los EE.UU. núm. 7,446,089, que se concedió el 4 de noviembre del 2008, a Singh y otros, también se refiere a métodos de inhibición de la  
50 formación de biopelículas mediante la limitación de la cantidad de hierro disponible para una población de bacterias, de tal manera que la formación de biopelículas puede inhibirse. Estos descubrimientos generalmente apuntan al hierro, un ión metálico de afinidad superior. De hecho, los rangos que se especificaron que se describen en Madhyastha para la quelación de metal, tales como de 12.5 a 200 mg/l, no serían eficaces para la quelación de zinc en las bacterias gram positivas, debido  
55

a que el zinc es un ion metálico de afinidad inferior que requiere concentraciones relativamente altas de los agentes quelantes.

5 Las biopelículas estafilocócicas están típicamente inmersas dentro de una matriz de polisacárido extracelular que se sintetiza por las proteínas que se codifican por el operón *ica*; sin embargo, se describieron recientemente biopelículas estafilocócicas *ica*-negativas que se basan en interacciones proteína-proteína. Se implicó a la proteína de superficie Aap de *S. epidermidis* (del inglés Accumulation-associated protein) en las biopelículas de *S. epidermidis* que se basan tanto en polisacáridos como en proteínas. La Aap contiene una región de repetición A N-terminal con 11 repeticiones redundantes de 16 aminoácidos, un dominio globular putativo ("αβ"), y una región de repetición B con un número variable (de 5 a 17) de repeticiones de 128 aminoácidos casi idénticas que terminan en un motivo conservado "de media repetición" (Fig. 1 A).  
 10 Rohde, H. y otros, Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus isolated from prosthetic hip and knee joint infections, *Biomaterials* 28:1711-20 (2007). El elemento de secuencia repetida dentro de la región de repetición B se definió recientemente como un dominio G5, que se encuentra en las proteínas de superficie de las gram-positivas, metaloproteasas Zn<sup>2+</sup>, y otros factores de virulencia bacterianos (Fig. 5). A continuación de la región de repetición B en la Aap se encuentra una secuencia repetida similar al colágeno y una secuencia LPXTG de anclaje a la pared celular. Existe una disposición similar del dominio existe en el homólogo SasG de *S. aureus* (Fig. 1 B). Corrigan, R.M. y otros, The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in adherence and biofilm formation, *Microbiology* 153:2435-46 (2007).

20 El procesamiento proteolítico de Aap o de SasG entre las regiones de repetición B y αβ induce la formación de biopelículas a base de proteínas en *S. epidermidis* y en *S. aureus*; tanto las biopelículas proteicas como las que se basan en polisacáridos de *S. epidermidis* se inhiben por los antisueros anti-Aap. Además, la adición de un fragmento grande soluble de Aap que contiene las regiones similares al colágeno y G5 inhiben la formación de biopelículas de *S. epidermidis* que se basan en proteínas. Rohde, H. y otros, Induction of Staphylococcus epidermidis biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases, *Mol. Microbiol.* 55:1883-95 (2005). En *S. aureus*, la formación de biopelículas que se basan en proteínas era dependiente en el número de dominios G5 en la SasG; se requieren cinco o más dominios G5 para apoyar la formación de biopelículas. Estos estudios sugirieron que las mitades C-terminales de Aap y de SasG que contienen los dominios G5 se involucran en las interacciones bacterianas dentro de las biopelículas de estafilococos, pero el mecanismo molecular preciso no está claro.

30 Dados los graves problemas médicos, industriales y ambientales que se asocian a las biopelículas bacterianas, persiste la necesidad de desarrollar enfoques que se orienten a inhibir la formación de las biopelículas.

35 La patente de EE.UU 5,688,516 A describe las composiciones y métodos de empleo de las composiciones en el enjuague y revestimiento de dispositivos médicos. Las composiciones incluyen combinaciones que se seleccionaron de un agente quelante, un anti-coagulante, o un agente antitrombótico, con un agente antimicrobiano no glicopéptido, tal como los antibióticos de tetraciclina. Se describen los métodos de uso de estas composiciones para recubrir un dispositivo médico y para inhibir la infección de los catéteres.

40 La presente aplicación describe una caracterización biofísica de una región de repetición B que contiene un dominio G5 de la Aap, que revela que se trata de un módulo de adhesión dependiente de zinc (Zn<sup>2+</sup>) ("módulo de adhesión de zinc") responsable de la interacción intercelular en las biopelículas estafilocócicas. Este módulo de adhesión de zinc se identificó en una variedad de bacterias, incluyendo bacterias gram positivas, y proporciona una diana específica para la quelación de zinc y para la inhibición de las biopelículas en las biopelículas compuestas por bacterias que tienen un dominio G5.

45 Sorprendentemente, se encontró que la quelación de zinc inhibe tanto la formación de las biopelículas de *S. epidermidis* como de *S. aureus* resistentes a la metilina y la suplementación con zinc adicional en el rango fisiológico revierte el efecto. Este efecto reversible que se identificó en bacterias que tienen un módulo de adhesión de zinc, que se describe en la presente invención como una "cremallera de zinc," pone de relieve la función crítica del zinc en la adhesión intercelular, al proporcionar una diana específica para la inhibición de la biopelícula y la quelación. Además, la adición de un fragmento soluble de Aap que contiene un único módulo de adhesión de zinc intacto inhibe la formación de biopelículas en una forma dependiente de la dosis, lo que indica que el dominio G5 es de hecho un elemento que se requiere para la adhesión intercelular en las biopelículas estafilocócicas.

50 En consecuencia, en un primer aspecto la presente invención proporciona un método *in vitro* para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacterias, el método comprende poner en contacto las bacterias con una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc, en donde las bacterias comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de los mismos, de manera que la formación de la biopelícula se inhibe; que se caracteriza porque el al menos un quelante de zinc comprende DTPA.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la formación de una biopelícula en un dispositivo, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y de combinaciones de los mismos, el método comprende poner en contacto el dispositivo con una disolución que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc, por lo que la formación de una biopelícula en el dispositivo se inhibe; se caracteriza porque al menos un quelante de zinc comprende DTPA.

10 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica tópica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un quelante de zinc y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de inhibición de la formación de una biopelícula sobre o en un mamífero, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de los mismos, que se caracteriza porque el al menos un quelante de zinc comprende DTPA.

15 También se describe un enjuague quirúrgico para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacterias, en donde las bacterias comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, el enjuague quirúrgico que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA.

20 Se describe además un método para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacterias, el método comprende poner en contacto las bacterias con una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE), *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus suis*, de manera que se inhibe la formación de la biopelícula.

25 También se describe un método para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacterias, en donde las bacterias comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, el método comprende poner en contacto las bacterias con una composición que comprende al menos un módulo de adhesión de zinc soluble, de manera que se inhibe la formación de la biopelícula.

30 También se describe un vendaje que se impregna con una cantidad segura y efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde el vendaje inhibe la formación de una biopelícula sobre la piel, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc.

35 También se describe una composición de limpieza personal que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la composición de limpieza personal inhibe la formación de una biopelícula sobre la piel, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc.

40 También se describe una composición de limpieza de superficies duras que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la composición inhibe la formación de una biopelícula sobre una superficie dura, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc.

45 También se describe un enjuague dental para inhibir la formación de una biopelícula en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, el enjuague dental que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA.

50 **Figura 1.** (A) Se ilustran las cinco regiones de la Aap: la región de repetición A, el dominio globular putativo ( $\alpha/\beta$ ), la región de repetición B que contiene de 5 a 17 dominios G5 en tándem, la región rica en prolina/glicina similar al colágeno y un motivo de anclaje a la pared celular (LPXTG). El sitio de proteólisis se ilustra con unas tijeras. Se ilustran los límites del dominio de las construcciones Brpt1.5 y Brpt2.5, y las histidinas se destacan con puntas de flecha; (B) Alineación de secuencias del dominio terminal G5 y del motivo C-terminal de "media repetición" de la Aap (sec. con. núm de ident. 1) y de la SasG (sec. con. núm de ident. 2). Los aminoácidos idénticos se indican mediante guiones (-). La alineación mediante el programa Blast muestra un 80 % de conservación y un 65 % de identidad; (C) Espectro de dicroísmo circular Far-UV de la Brpt1.5 en Tris 20 mM pH 7.4, NaF 50 mM. La deconvolución de los datos revela predominantemente elementos de estructura secundaria enrollados y de láminas  $\beta$  (Tabla 1); (D) Gráfica de distribución del coeficiente de sedimentación para la Brpt1.5 a concentraciones variables. La estimación del peso molecular indica que la Brpt1.5 es monomérica; (E) Datos de equilibrio de sedimentación representativos para la Brpt1.5, lo que confirma un estado monomérico (Tabla 3). Las líneas negras muestran los ajustes globales; los residuos se muestran arriba.

60 **Figura 2.** (A) Análisis de la velocidad de sedimentación de la Brpt1.5 en la presencia de cationes bivalentes reveló un

evento de dimerización específico de  $Zn^{2+}$ . La etiqueta de línea discontinua (---) representa la Brpt1.5 libre de cationes; (B) Espectro de CD Far-UV de la Brpt1.5 en presencia (cuadrados) y ausencia (triángulos) de Zn; (C) Análisis del equilibrio de sedimentación de la dimerización mediada por  $Zn^{2+}$  de la Brpt1.5 (triángulos) y de la Brpt2.5 (cuadrados). La dimerización de la Brpt2.5 requiere un menor  $[Zn^{2+}]$  ( $EC_{50} = 3.7$  mM) en comparación con la Brpt1.5 ( $EC_{50} = 5.4$  mM) y muestra una pendiente más pronunciada para la transición monómero-dímero, lo que indica una mayor cooperatividad de la unión de  $Zn^{2+}$  con un creciente número de dominios G5 en tándem. Las barras de error indican los intervalos de confianza del 95 %; (D) Gráfico de equilibrio de unión de la unión de Zn por la Brpt1.5. El análisis de regresión lineal de la pendiente indica que el número de iones  $Zn^{2+}$  que se toma de la dimerización de la Brpt1.5 (es decir,  $\Delta Zn^{2+}$ ) es aproximadamente tres; (E) Gráfico de equilibrio de unión de la unión de Zn por la Brpt2.5. El análisis de regresión lineal de la pendiente indica que aproximadamente cinco iones de  $Zn^{2+}$  se unen luego de la dimerización de la Brpt2.5.

**Figura 3.** (A) Biopelículas de *S. epidermidis* RP62A que se formaron en poliestireno y se visualizaron con cristal violeta; la adición del quelante de  $Zn^{2+}$  DTPA ( $\geq 30$   $\mu$ M) inhibe la formación de la biopelícula. Se escanearon pocillos representativos (parte inferior). Se muestran los controles no tratados ("RP62A") y el vehículo ("HCl"). Las barras de error indican la desviación estándar (\* indica  $p < 0.05$  con relación al control no tratado;  $n=3$ ); (B) Se forman biopelículas de *S. aureus* USA300 resistentes a la metilicina en placas recubiertas de fibronectina pero se inhiben mediante la adición de DTPA ( $\geq 30$   $\mu$ M). (\*:  $p < 0.05$ ;  $n=4$ ); (C) La adición de  $ZnCl_2$  5-20  $\mu$ M a una dosis mínima inhibitoria de DTPA (30  $\mu$ M) rescata la formación de las biopelículas por RP62A. (#:  $p < 0.05$  con relación al control de 0  $\mu$ M  $ZnCl_2$ /30  $\mu$ M DTPA; ^: el dato es estadísticamente indistinguible del control no tratado "RP62A";  $n=3$ ); (D) La adición de  $ZnCl_2$  15-20  $\mu$ M a una dosis mínima inhibitoria de DTPA (30  $\mu$ M) rescata la formación de biopelículas por USA300. (#:  $p < 0.05$  con relación a 0  $\mu$ M  $ZnCl_2$ /30  $\mu$ M DTPA; ^: estadísticamente indistinguible del control no tratado;  $n=4$ ).

**Figura 4.** (A) La adición de la MBP-Brpt1.5 soluble inhibe las biopelículas de RP62A en una forma dependiente de la dosis en presencia de  $ZnCl_2$  0.75-1 mM. La MBP sola fue estadísticamente indistinguible del control no tratado a todas las concentraciones que se ensayaron. (\*:  $p < 0.05$  con relación al control RP62A a concentraciones relevantes de  $Zn^{2+}$ ;  $n=3$ ); (B) Respuesta de dosis de la inhibición de la biopelícula por la MBP-Brpt1.5 a una concentración fija de  $ZnCl_2$ . (\*:  $p < 0.0005$ ;  $n=3$ ); (C) Modelo "cremallera de zinc" para la adhesión intercelular en las biopelículas estafilocócicas mediadas por la auto-asociación dependiente de zinc de los dominios G5.

**Figura 5.** (A) Aap de *S. epidermidis* cepa RP62A. Una arquitectura similar se observa en las proteínas SasG y Pls de *S. aureus*, con variaciones entre cuatro y diecisiete en el número que se reporta de repeticiones G5 entre las especies estafilocócicas; (B) "Proteína de superficie de cocos gram positivos" de *Streptococcus suis* 89/1591; (C) "Proteína de superficie de la pared celular LPXTG" de *Streptococcus gordonii* str. challis substr. chl; (D) "Precursor de la proteína de superficie celular" de *Corynebacterium urealyticum*; (E). "Proteína hipotética conservada" de *Fingoldia magna*; (F)  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasa de *Streptococcus pneumoniae*. Se reporta una arquitectura similar del dominio en varias cepas de *S. pneumoniae*; (G) IgA1 proteasa de *S. pneumoniae*. Se reporta una arquitectura similar del dominio en metaloproteasas de zinc predichas de *S. pneumoniae*, *S. gordonii*, y *S. suis*, con hasta cuatro repeticiones del dominio G5 antes del dominio peptidasa N-terminal; (H). Proteína de resistencia a la vancomicina VanW de *Thermosinus carboxydivorans*. Se encontraron proteínas similares en *Clostridium botulinum* y *C. difficile*, *Desulfotomaculum reducens*, *Caldicellulosiruptor saccharoluticus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Eubacterium ventriosum*, *Alkaliphilus sp.*, *Thermonaerobacter sp.*, *Desulfitobacterium hafniense*, *Moorella thermoacetica*, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, y *Symbiobacterium thermophilum*.

**Figura 6.** (A) Análisis de la velocidad de sedimentación de la dimerización dependiente de  $Zn^{2+}$  de la Brpt1.5 en función del pH en Tris 20 mM, MES 20 mM, NaCl 50 mM, y  $ZnCl_2$  10 mM. La Brpt1.5 cambia de dímero a pH 7.4 a monómero a pH 6.0; (B) El equilibrio de sedimentación confirma que las transiciones de la Brpt1.5 de dímero a monómero ocurren en la medida que se disminuye el pH de 7.4 a 6.0. La  $pK_a$  aparente de esta transición es de 6.7, lo que puede indicar la participación de residuos de histidina en la dimerización dependiente de  $Zn^{2+}$ ; (C) Análisis de equilibrio de unión de la dependencia del pH de la dimerización de Brpt1.5 en  $ZnCl_2$  10 mM. La pendiente del gráfico del  $\log K$  contra el  $\log [H^+]$ , que se determinó por regresión lineal, revela que la dimerización de la Brpt1.5 se enlaza con la liberación de aproximadamente 2 o 3 protones; (D) Espectro de CD Far-UV de la H75A/mutante H85A Brpt1.5 en presencia (cuadrados) y ausencia (triángulos) de  $ZnCl_2$  10 mM; (E) Análisis de la velocidad de sedimentación de la Brpt1.5 tipo salvaje (gris) en comparación con el mutante H75A/H85A carente de histidina (negro). Las líneas discontinuas muestran los datos que se recogieron en la ausencia de  $Zn^{2+}$ , y las líneas continuas muestran los datos que se recogieron en  $ZnCl_2$  10 mM. Se observa una pérdida parcial de la dimerización en el mutante H75A/H85A, lo que sugiere que una o ambas histidinas así como otros residuos se involucran en la coordinación del  $Zn^{2+}$ .

**Figura 7.** (A) El  $SrCl_2$  no revierte la inhibición de las biopelículas por el DTPA 30  $\mu$ M. Todos los datos a 30  $\mu$ M de DTPA muestran disminuciones estadísticamente significativas en comparación con el control no tratado (RP62A); (B) El  $CaCl_2$  no revierte la inhibición de las biopelículas por el DTPA 30  $\mu$ M. Todos los datos a 30  $\mu$ M de DTPA muestran disminuciones estadísticamente significativas en comparación con el control no tratado (RP62A); (C) El  $MgCl_2$  no revierte la inhibición de

las biopelículas por el DTPA 30  $\mu\text{M}$ . Todos los datos a 30  $\mu\text{M}$  de DTPA muestran disminuciones estadísticamente significativas en comparación con el control no tratado (RP62A); (D) La adición de 10  $\mu\text{M}$  o más de  $\text{MnCl}_2$  permitió el rescate parcial de la formación de biopelículas en presencia de DTPA 30  $\mu\text{M}$ . Todos los datos a 30  $\mu\text{M}$  de DTPA muestran disminuciones estadísticamente significativas en comparación con el control no tratado (RP62A). Los aumentos estadísticamente significativos por encima del punto de datos 0  $\mu\text{M}$  de  $\text{MnCl}_2$ /30  $\mu\text{M}$  de DTPA se marcaron con un asterisco (\*). Los niveles de  $\text{MnCl}_2$  que se requieren para rescatar la formación de biopelículas fueron al menos 500 veces mayores que la concentración de Mn en el suero (~20 nM), lo que indica que esto es poco probable que sea un fenómeno biológicamente relevante. Este resultado puede deberse a la competencia por el DTPA y a la liberación de zinc quelado. La afinidad del Mn por el DTPA (log K = 15.5) está dentro de aproximadamente tres órdenes de magnitud de la afinidad del Zn (log K = 18.75), mientras que las afinidades del Ca, el Sr y el Mg por el DTPA son de 8-9 órdenes de magnitud menores que la del el zinc (log K = 10.74, 9.68, y 9.3, respectivamente).

**Figura 8.** Inhibición de la biopelícula de RP62A por la MBP-Brpt1.5 a 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$ . Respuesta de dosis de la inhibición de la biopelícula por la MBP-Brpt1.5 a una concentración fija de 750  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ . Los asteriscos indican el nivel de significación estadística con relación al control sin tratar.

La siguiente es una lista de definiciones de términos que se utilizan en la presente invención.

El término "biopelícula" se refiere a las acumulaciones microbianas encerradas en matrices en las superficies biológicas o no biológicas. La formación de biopelículas representa un modo de crecimiento protegido que permite a las células sobrevivir en ambientes hostiles.

El término "formación de biopelículas" se pretende que incluya a la formación, el crecimiento, y la modificación de las colonias bacterianas contenidas en las estructuras de las biopelículas, así como también a la síntesis y el mantenimiento de la matriz de polisacárido de las estructuras de las biopelículas.

El término "módulo de adhesión de zinc" se refiere a un pliegue polipeptídico que se encuentra en las proteínas de la superficie celular bacteriana que incluye, pero no se limita a, la proteína asociada a la acumulación (Aap) de *Staphylococcus epidermidis*. El módulo de adhesión de zinc comprende una secuencia polipeptídica que incluye al menos a un dominio G5, y opcionalmente a una secuencia de aminoácidos adicional.

El término "dominio G5" se refiere a un pliegue polipeptídico que se encuentra en una amplia variedad de proteínas extracelulares, que se nombra de esta forma debido a sus residuos de glicina conservados. El dominio G5 se compone de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos y se encuentra típicamente como de una a doce repeticiones en tándem. El dominio G5 se compone de los primeros 80 aminoácidos de la Brpt1.0

Los términos "región de repetición B" o "Brpt" se refieren a una región de la proteína Aap que tiene un número variable (de 5 a 17) de 128 repeticiones de aminoácidos casi idénticas. "Brpt1.5" se refiere a una región de repetición B que termina en un motivo conservado "de media repetición" de 79 aminoácidos. "Brpt1.0" se refiere a una repetición de 128 aminoácidos aislada que comprende un dominio G5.

Los términos "quelante" o "quelante de metales" se refieren a cualquier sustancia que es capaz de eliminar un ion metálico de un sistema de disolución mediante la formación de un nuevo ion complejo que tiene diferentes propiedades químicas que las del ion metálico original. El término pretende además abarcar sustancias que son capaces de quelar iones metálicos, específicamente metales divalentes.

El término "iones metálicos" pretende incluir cualquier ion metálico que esté biodisponible, es decir, cualquier ion metálico que participe en una reacción o ruta bioquímica, o cualquier ion metálico que esté disponible en el fluido, tejido, o hueso de un sujeto.

El término "quelante de zinc" se refiere a cualquier sustancia que es capaz de quelar un ion de zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) ion y así agotar el zinc de los ambientes acuosos.

El término "bacterias gram positivas" se refiere a las bacterias que tienen paredes celulares con altas cantidades de peptidoglicano. Las bacterias gram positivas se identifican por su tendencia a retener el cristal violeta y teñirse de azul oscuro o violeta en el protocolo de tinción de Gram.

El término "bacterias gram negativas" se refiere a las bacterias que tienen capas de peptidoglicano más delgadas que no retienen la tinción de cristal violeta en el protocolo de tinción de Gram y en su lugar conservan el contracolorante, típicamente safranina. Las bacterias gram negativas se tiñen de rojo o rosa en el protocolo de tinción de Gram.

- 5 El término "dispositivo médico implantable" se refiere a cualquier dispositivo médico que se implanta o se inserta en el cuerpo humano. Tales dispositivos pueden implantarse temporal o permanentemente. Un dispositivo médico implantable puede ser, por ejemplo, catéteres, dispositivos ortopédicos, prótesis, endoprótesis vasculares, endoprótesis urinarias, marcapasos, implantes, o similares.
- 10 El término "bañar a un dispositivo" se refiere a sumergir un dispositivo en una disolución con el fin de tratar previamente al dispositivo, por ejemplo, antes de la implantación quirúrgica. El baño de un dispositivo puede ocurrir además después de que el dispositivo se implantó quirúrgicamente, por ejemplo, mediante la irrigación de la zona quirúrgica con una disolución estéril.
- 15 El término "recubrimiento de un dispositivo" se refiere al pre-tratamiento de un dispositivo con una composición antes de la implantación quirúrgica. Las composiciones adecuadas para tratar previamente el dispositivo pueden incluir, por ejemplo, disoluciones, geles, revestimientos de polímero, y similares. Una variedad de medios se puede emplear para recubrir un dispositivo, tales como la pulverización o la sumersión del dispositivo. El dispositivo recubierto comprende una capa de superficie que tiene propiedades deseables que se confieren por la composición de revestimiento. En una modalidad, la composición de recubrimiento comprende al menos un quelante de zinc. En otra modalidad, la composición de recubrimiento comprende uno o más dominios G5 solubles o módulos de adhesión de zinc.
- 20 El término "recubrimiento de polímero" se refiere a una capa de polímero adherente adecuado para recubrir la superficie exterior de un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo médico implantable. El recubrimiento de polímero puede tener propiedades intrínsecas de quelación, o puede unirse a uno o más agentes quelantes químicos o a base de proteínas.
- 25 El término "mamífero" se refiere a los organismos que pueden sufrir de estados que se asocian a las biopelículas. El término incluye a los humanos, por ejemplo, así como a los animales salvajes y domésticos y al ganado, incluyendo pero sin limitarse a los caballos, chimpancés, macacos, cerdos, ovejas, cabras, hámsters, cobayas, monos, osos, perros, gatos, ratones, conejos, vacas, ardillas y ratas.  
El término "composición farmacéutica" incluye preparaciones adecuadas para la administración a mamíferos, por ejemplo, los seres humanos.
- 30 El término "composición farmacéutica tópica" se refiere a las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración dérmica a un mamífero. Las composiciones farmacéuticas tópicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, geles, cremas, lociones, ungüentos, tinturas, sprays, y sólidos. En una modalidad, una composición farmacéutica tópica de la presente invención se aplica en la superficie externa de la piel o en las áreas adyacentes de cortes, abrasiones, lesiones por quemadura con césped, laceraciones, quemaduras, o heridas punzantes con el fin de tratar, prevenir, o inhibir la formación de biopelículas bacterianas. El término "agente antimicrobiano" se refiere a cualquier sustancia que mate o prevenga el crecimiento de bacterias u otros microbios.
- 35 El término "antibiótico" se refiere a una sustancia que es antagónica a la proliferación de los microorganismos. Los antibióticos adecuados pueden ser de origen natural, modificarse químicamente, o producirse sintéticamente.
- 40 El término "enjuague quirúrgico" se refiere a una disolución que se utiliza durante la cirugía para irrigar el sitio de un dispositivo médico que se implantó, con la intención de evitar la formación inicial de biopelículas en las proximidades del dispositivo médico.
- 45 El término "enjuague dental" se refiere a una disolución que contiene uno o más quelantes de zinc que se utiliza como un enjuague bucal o enjuague para prevenir el establecimiento de biopelículas orales que conduzcan a las caries dentales.
- 50 El término "composición de limpieza personal" se refiere a una composición que se utiliza para la higiene personal. Las composiciones de aseo personal incluyen, pero no se limitan a, los geles, cremas, suspensiones, coloides, jabones, jabones líquidos, champús, y similares. En una modalidad, las composiciones de aseo personal de la presente invención inhiben las infecciones que se relacionan con las biopelículas que incluyen, pero sin limitarse a, las infecciones de *S. aureus* comunidad-adquiridas resistentes a la metilina (CA-MRSA).
- 55 El término "composición de limpieza de superficies duras" se refiere a una composición que se utiliza para limpiar y/o desinfectar una superficie sólida o dura. En una modalidad, la invención proporciona una composición que impide el crecimiento de la biopelícula bacteriana en superficies duras, incluyendo, pero sin limitarse a, instrumentos quirúrgicos, tanques de almacenamiento, tuberías, bandejas, contenedores, paredes, suelos, encimeras, suelos de vestuarios, taquillas, bancos, duchas, baños, retretes, unidades de filtración de agua, y similares.
- 60 Los términos "inhibir", "inhibición", e "inhibida" como se utiliza en la presente invención con respecto a la formación de las

biopelículas, se refieren al efecto de un quelante de zinc en la interrupción o eliminación de una biopelícula, así como también a la prevención de la formación de una biopelícula.

5 El término "cantidad efectiva", como se utiliza en la presente invención con respecto a la inhibición de la formación de las biopelículas, se refiere a una cantidad de un quelante de zinc o de un módulo de adhesión de zinc soluble suficiente para lograr el resultado inhibitorio que se desea.

10 El término "cantidad segura y efectiva" se refiere a una cantidad de un quelante de zinc o de un módulo de adhesión de zinc soluble que es efectiva para inhibir la formación de las biopelículas sin efectos secundarios adversos indebidos, tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica, en proporción con una relación riesgo/beneficio razonable cuando se utiliza en la manera de la invención.

15 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente de un ingrediente para tratar trastornos, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Debe entenderse, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones de la presente invención se decidirá por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel específico de dosis terapéuticamente efectiva para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del quelante específico que se emplee; la composición específica que se emplee; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico que se emplee; la duración del tratamiento; los fármacos que se utilicen en combinación o de forma coincidente con el compuesto específico que se emplee; y los factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, se conoce bien de la experiencia de la técnica el comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores a los que se requieren para lograr el efecto terapéutico que se desea y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto que se desea.

25 **Caracterización de la disolución del dominio G5 terminal de la Aap**

La presente invención indica que la asociación homofílica de la Aap y la SasG se media únicamente a través de la auto-asociación de sus respectivos dominios G5. El dominio G5 C-terminal de la región de repetición B de la Aap se expresó tanto como un dominio aislado (llamado Brpt1.0) y como el único dominio G5 seguido por el motivo "de media repetición" C-terminal de 79 aminoácidos (llamado Brpt1.5; Figs 1A y 1B).

35 Este motivo de media repetición C-terminal se conserva en los homólogos de la Aap, lo que sugiere que puede funcionar como una caperuza terminal que se requiere para la estabilidad de la región de repetición B, como se ve con otras proteínas que contienen los motivos estructurales repetidos. Caracterización de la disolución de Brpt1.0 por dicroísmo circular (CD) far-UV mostraron una preponderancia de enrollado aleatorio con poca evidencia de elementos estructurales regulares. En contraste, las muestras de la Brpt1.5 produjeron espectros coherentes correspondientes a un 39 % de láminas-β, a un 32 % de enrollado, a un 24 % de giros, y a un 4 % de α-hélices (Fig. 1C, Tabla 1).

40

Tabla 1 Análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular de la Brpt1.5				
	% α hélice	% Lámina β	% Giro	% enrollado
Brpt1.5	4	39	24	32
Brpt1.5 + 10 mM ZnCl <sub>2</sub>	5	38	23	32
H75A/H85A	4	38	23	32
H75A/H85A + 10 mM ZnCl <sub>2</sub>	5	40	22	32

50 Los espectros de CD Far-UV se colectaron de muestras que se dializaron en Tris 20 mM, NaF 50 mM. El contenido de estructuras secundarias se determinó mediante la utilización del programa CDSSTR en Dichroweb. Los valores de NRMSD oscilaron desde 0.039 hasta 0.043.

55 Estos datos apoyan la función del motivo de media repetición como una caperuza estructural que se requiere para la estabilidad del dominio G5. Experimentos de ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (AUC) revelaron que la Brpt1.5 sedimentó como una sola especie alargada con un peso molecular estimado coherente con un monómero (Fig. 1D, Tabla 2).

60

5

	$s^{\circ}_{20, w}$	$f/f_0$
Brat1.5	1.55	2.21
Brpt1.5 + 10 mM ZnCl <sub>2</sub>	2.46	1.66

10

Los valores de  $s^{\circ}_{20, w}$  se determinaron de los datos a 4 o 5 concentraciones. Los valores de la relación de fricción,  $f/f_0$ , se promediaron a partir de cuatro o más experimentos independientes.

15 Ninguna ensamblaje a especies de orden superior se observó en estas condiciones, incluso a altas (70  $\mu$ M) concentraciones. Experimentos de equilibrio de sedimentación verificaron que la Brpt1.5 era monomérica bajo estas condiciones (Fig. IE, Tabla 3).

20

	$M_{\text{secuencia}}$		$M_{\text{experimental}}$ (95 % de confianza)	
	monómero	dímero	0 mM Zn	10 mM Zn
Brpt1.5	22,284	44,568	22,075 (19,820-24,259)	41,213 (38,823-43,536)
Brpt2.5	35,971	71,942	36, 987 (34,519-39,380)	78,541 (76,220-80,863)
$K_D$ para la asociación monómero-dímero				
	2 mM Zn	5 mM Zn	10 mM Zn	
Brpt1.5	113 $\mu$ M (62.8-200 $\mu$ M)	5.06 $\mu$ M (3.59-7.08 $\mu$ M)	0.353 $\mu$ M (0.196-0.647 $\mu$ M)	
Brpt2.5	25.5 $\mu$ M (17.8-36.8 $\mu$ M)	0.072 $\mu$ M (0.165-0.0322 $\mu$ M)	ND*	
*ND, no determinable; ningún monómero observable se determinó bajo esta condición, lo que se opone a la determinación de la constante de equilibrio.				
intervalos del 95 % de confianza que se calculan por el WinNONLIN.				
La $M_{\text{secuencia}}$ es el peso molecular que se determinó por el programa ProtParam a partir de la secuencia de aminoácidos.				
La $M_{\text{experimental}}$ se determina del análisis global de las curvas de equilibrio de sedimentación.				

25

30

35

40

45

Dimerización mediada por el Zn<sup>2+</sup> de los dominios G5

50 Dado que muchas proteínas de adhesión de mamíferos que incluyen las cadherinas, integrinas, y neurexinas requieren cationes divalentes para funcionar apropiadamente, la Brpt1.5 se analizó por AUC en presencia de Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, y Zn<sup>2+</sup>. Interesantemente, la Brpt1.5 formó dímeros sólo en presencia de Zn<sup>2+</sup> (Fig. 2A, Tablas 2 y 3). El análisis de equilibrio de sedimentación de la Brpt1.5 en presencia de 2, 5, o 10 mM de ZnCl<sub>2</sub> reveló un equilibrio monómero-dímero con constantes de disociación de 113  $\mu$ M, 5.06  $\mu$ M, y 0.353  $\mu$ M, respectivamente (Tabla 3). Los espectros de CD de la Brpt1.5 en presencia o ausencia de 10 mM ZnCl<sub>2</sub> fueron similares, lo que indica que la dimerización mediada por Zn<sup>2+</sup> de la Brpt1.5 se produce como resultado de la asociación de cuerpo rígido de dos dominios G5 mediada a través de la coordinación de uno o más iones Zn<sup>2+</sup> en *trans* más que a cambios conformacionales significantes que se inducen por los iones Zn<sup>2+</sup> (Fig. 2B, Tabla 1).

55

60 En la Aap y en las proteínas relacionadas de estafilococos SasG y P1s, los dominios G5 se encuentran como repeticiones en tándem que oscilan de 5 a 17 copias. La formación de biopelículas a base de proteínas dependiente de SasG en *S.*

*aureus* se demostró que requiere por lo menos cinco repeticiones G5 en tándem. Ver Corrigan, Microbiology 153: 2435-46. Para analizar el comportamiento de los dominios G5 en tándem, se expresó una construcción Brpt2.5 con dos dominios G5 y la caperuza C-terminal.

5 El análisis de equilibrio de sedimentación de la Brpt2.5 reveló un equilibrio monómero-dímero en presencia de  $Zn^{2+}$  como se observa para la Brpt1.5, pero con una mejora modesta en la afinidad del  $Zn^{2+}$  por la Brpt2.5 en comparación con la Brpt1.5, en combinación con una transición más pronunciada entre el monómero y el dímero en la medida que aumenta la longitud de repetición (Fig. 2C). Para analizar los equilibrios de unión entre la dimerización y la unión de  $Zn^{2+}$ , el logaritmo de la constante de asociación de la dimerización se representó contra el logaritmo de la concentración de  $Zn^{2+}$  libre para revelar el número neto de iones  $Zn^{2+}$  que participan en la interfase de dimerización. Existen de 2 a 3 iones de  $Zn^{2+}$  que participan en la interfase del dímero de Brpt1.5, en comparación con ~5 iones  $Zn^{2+}$  para la Brpt2.5. Esto es consistente con una disposición modular en la cual cada dominio G5 contribuye a una interfaz de dímero independiente (Figs. 2D y 2E).

#### Coordinación del $Zn^{2+}$ por el dominio G5

15 Los iones estructurales de  $Zn^{2+}$  son más comúnmente coordinados por la cisteína, seguido por la histidina, el aspartato y el glutamato. La secuencia completa de la Aap carece de cisteínas; sin embargo, existen dos residuos de histidina en la construcción Brpt1.5. La Brpt1.5 con 10 mM de  $Zn^{2+}$  se transforma de un dímero a pH 7.4 a un monómero a pH 6.0 (Fig. 6A). Los experimentos de equilibrio de sedimentación verificaron estos resultados; un gráfico del peso molecular relativo como una función del pH puede ajustarse para obtener una  $pK_a$  aparente de 6.7 (Fig. 6B), coherente con la coordinación mediante la histidina. El análisis de regresión lineal de los equilibrios de unión entre la protonación y la dimerización mediante la utilización de un gráfico de doble logaritmo mostró un valor de  $\Delta H^+$  de 2.6, lo que indica que aproximadamente tres residuos ionizables se vinculan a la dimerización de la Brpt1.5 (Fig. 6C). La mutagénesis sitio-dirigida confirmó la participación de las histidinas, aunque otros residuos tales como los glutamatos o los aspartatos pueden contribuir también (Figs 6D y 6E). En su conjunto, los resultados de CD y de la AUC para la Brpt1.5 y la Brpt2.5 indican que los dominios G5 de la Aap se auto-ensamblan de forma modular luego de la unión  $Zn^{2+}$ . La presencia de repeticiones de los dominios en tándem y la dependencia de un catión divalente para la adhesión son una reminiscencia de la adhesión dependiente de calcio por las cadherinas de los mamíferos.

30 La quelación del  $Zn^{2+}$  inhibe la formación de biopelículas por los estafilococos

Para comprobar la función fisiológica de la adhesión de G5 mediada por  $Zn^{2+}$  en la formación de la biopelícula estafilocócica, las biopelículas de tanto *S. epidermidis* como de *S. aureus* se crecieron en cultivo en presencia o ausencia del quelante de  $Zn^{2+}$  ácido dietilentríamínepentaacético (DTPA). El DTPA no fue tóxico en todas las concentraciones que se ensayaron (hasta 100  $\mu M$ ). La cepa RP62A de *S. epidermidis* formó biopelículas robustas cuando se cultivaron en medio solo, pero el crecimiento de biopelícula se inhibió por dosis no tóxicas de DTPA ( $\geq 30 \mu M$ ) (Fig. 3A). En las condiciones que se comprobaron, el DTPA no rompió las biopelículas preformadas de la RP62A.

40 La cepa USA300 de *S. aureus*, que es responsable de los recientes brotes epidémicos de las infecciones de *S. aureus* comunidad-adquiridas resistentes a la metilicina (MRSA), formaron biopelículas en placas recubiertas de fibronectina. Como se observa para *S. epidermidis*, las biopelículas de las MRSA se inhibieron mediante la quelación del  $Zn^{2+}$  ( $\geq 30 \mu M$  DTPA) (Fig 3B). Sorprendentemente, la formación de la biopelícula de *S. epidermidis* podría rescatarse por la adición de 5-20  $\mu M$  de  $ZnCl_2$ , lo que indica que el efecto es  $Zn^{2+}$  específico (Fig. 3C). La adición de hasta 60  $\mu M$  de  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ , y  $SrCl_2$  no tuvo efecto; el  $MnCl_2$  permitió el rescate parcial, pero a concentraciones cercanas a las 1,000-veces por encima de los niveles fisiológicos (Fig. 7). De manera similar a *S. epidermidis*, la cepa MRSA USA300 podría rescatarse por la adición de 15-20  $\mu M$  de  $ZnCl_2$  (Fig. 3D). Es importante destacar que, a la concentración inhibitoria mínima de DTPA (30  $\mu M$ ), el crecimiento de las biopelículas por las dos especies de estafilococos podría rescatarse mediante la adición de 5-20  $\mu M$  de  $ZnCl_2$ ; estas concentraciones de  $Zn^{2+}$  son similares al intervalo fisiológico en el plasma humano (12-16  $\mu M$  concentración en reposo).

50 El dominio G5 soluble inhibe la formación de las biopelículas

Para determinar si la formación de la biopelícula dependiente de  $Zn^{2+}$  depende específicamente del autoensamblaje mediado por el dominio G5, se añadió la Brpt1.5 soluble a la biopelícula de *S. epidermidis* RP62A como una fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP). Debido a las concentraciones más altas de  $Zn^{2+}$  que se requieren para inducir la dimerización en la construcción corta en comparación con la Aap de longitud completa, la inhibición por la MBP-Brpt1.5 se ensayó a concentraciones de  $Zn^{2+}$  en el intervalo de hasta 1 mM. Las biopelículas de RP62A se inhibieron por la MBP-Brpt1.5 soluble en presencia de 0.75 y de 1 mM  $ZnCl_2$ , mientras que la adición de MBP sola no tuvo efecto (Fig. 4A). La titulación de la MBP-Brpt1.5 a concentraciones fijas de  $Zn^{2+}$  mostró que a 1 mM de  $ZnCl_2$ , la adición de 10 a 22  $\mu M$  de la MBP-Brpt1.5 abolió completamente la formación de la biopelícula (Fig. 4B). La inhibición dosis dependiente de la biopelícula

por la MBP-Brpt1.5 se observó además a 750  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnCl}_2$  (Fig. 8). Así, la adición de incluso un solo módulo de adhesión de zinc intacto en una forma soluble es capaz de inhibir la formación de las biopelículas, lo que destaca la función de este dominio como un módulo de adhesión  $\text{Zn}^{2+}$  dependiente en las biopelículas estafilocócicas.

5 El dominio G5, encontrado en Aap, SasG, y proteínas de estafilococo relacionadas tales como Pls, median la formación de biopelículas de estafilococo dependientes de  $\text{Zn}^{2+}$ . Múltiples eventos de auto-asociación entre tramos de dominios de G5 en tándem en moléculas Aap opuestas conducirían a un extenso contacto adhesivo entre dos células, llamado "cremallera de zinc" (Fig. 4C). Aap se identificó originalmente como una proteína requerida para la formación de microcolonias de *S. epidermidis*. Subsecuentemente, se mostró que Aap y SasG experimentan un evento de proteólisis cerca del inicio de la  
10 región de repetición-B que contiene el dominio G5 en tándem, que conduce a la formación de biopelículas de estafilococo basadas en proteínas. La presente invención indica que el mismo mecanismo para la adhesión intercelular basado en auto-asociaciones de G5 dependientes de  $\text{Zn}^{2+}$  es responsable de las etapas tempranas y tardías de la formación de la biopelícula. La adhesión intercelular dependiente de  $\text{Zn}^{2+}$  mediada por dominios G5 probablemente evolucionó como un mecanismo de defensa contra la acción de las células inmunes. Los niveles de  $\text{Zn}^{2+}$  que se conoce aumentan los niveles de liberación de citocinas y estimulan la respuesta inmune del huésped son suficientes para promover la formación de biopelículas de estafilococo (5-20  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ). Los mastocitos, basófilos y eosinófilos contienen altos niveles de  $\text{Zn}^{2+}$  en gránulos secretores que se liberan a partir de la desgranulación.

20 Dada la emergencia global de infecciones relacionadas con biopelículas de estafilococo, se necesitan métodos mejorados para la prevención. Hacer objetivo en la auto-asociación de G5 ya sea por la quelación de  $\text{Zn}^{2+}$  o la inhibición directa con compuestos de pequeñas moléculas proporciona una nueva avenida terapéutica para combatir la formación de biopelículas por una amplia variedad de especies de bacterias, lo que incluye las cepas MRSA epidémicas. La aplicación a infecciones MRSA es de particular interés, dado que se reportó recientemente que MRSA causa más muertes por año que AIDS. King, M.D. y otros, Emergence of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the  
25 predominant cause of skin and soft-tissue infections, *Ann. Intern. Med.* 144:309-17 (2006). Finalmente, los genes que codifican las proteínas de superficie con uno o más dominios G5 en tándem se encuentran en un amplio número de especies de bacterias, lo que indica que el mecanismo de cremallera de zinc para la adhesión intercelular proporciona un objetivo para la inhibición de la formación de biopelículas en muchas especies de bacterias, tanto en aplicaciones médicas como industriales.

30 Bacterias que forman biopelículas

Para cada una de las modalidades subsecuentes de la invención, la bacteria que forma biopelículas comprende al menos un módulo de adhesión de zinc, de forma tal que el contacto con uno o más quelantes de zinc o uno o más módulos de adhesión de zinc solubles inhibe la formación de una biopelícula. Para cada modalidad, la bacteria que comprende al menos  
35 un módulo de adhesión de zinc puede seleccionarse del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de las mismas.

Otras bacterias que forman biopelículas incluyen *Acidothermus cellulyticus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Alkaliphilus metalliredigens*, *Alkaliphilus oremlandii*, *Arthrobacter aurescens*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium leptum*, *Clostridium novyi*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium thermocellum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium urealyticum*, *Desulfotobacterium hafniense*, *Desulfotomaculum reducens*, *Eubacterium ventriosum*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Fingoldia magna*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Janibacter sp.*, *Kineococcus radiotolerans*, *Lactobacillus fermentum*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Moorella thermoacetica*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium gilvum*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium vanbaalenii*, *Nocardioides sp.*, *Nocardia farcinica*, *Oceanobacillus iheyensis*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Rhodococcus sp.*, *Saccharopolyspora erythraea*, especies de Estafilococos coagulasa negativos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistentes a metilina (MRSE), *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus suis*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter tengcongensis*, y combinaciones de las mismas.

Aun más específicamente, las bacterias pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Corynebacterium urealyticum*, *Fingoldia magna*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), *Staphylococcus*

*epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE), *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus suis*, y combinaciones de las mismas.

Más específicamente aún, las bacterias pueden seleccionarse del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistentes a meticilina (MRSE), y combinaciones las mismas.

Además, se descubrió que ciertas bacterias gram negativas comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc. Por ejemplo, las bacterias gram negativas que comprenden un módulo de adhesión de zinc, pero que no se limitan a, *Bacteroides capillosus*, *Symbiobacterium thermophilum*, *Syntrophomonas wolfei*, *Thermosinus carboxydivorans*. Por lo tanto, se prevé que la invención además se puede aplicar a bacterias gram negativas que tengan al menos un módulo de adhesión de zinc.

Quelantes de zinc

Un experto en la técnica apreciará la variedad de sustancias capaces de quelar iones metálicos de zinc. El quelante de zinc de la presente invención comprende 1,3-diaminopropano-N,N,N',N'-ácido tetraacético (DTPA). Los ejemplos de quelantes de zinc incluyen ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido 1,3-diaminopropano-N,N,N',N'-tetraacético (DTPA), N,N,N',N'-tetrakis(2-piridilmetil) etilendiamina (TPEN), 1,10-fenantrolina, clioquinol, dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), ácido etilendiamina - N,N'- diacético-N,N'-di-B-propiónico (EDPA), 1,2-dimetilo-3-hidroxi-4-piridinona (DMHP), 1,2-dietil-3-hidroxi-4-piridinona (DEHP), etilmaltol (EM), ácido 4-(6-metoxi-8-quinaldinilaminosulfonil)benzoico sal de potasio (TFLZn), ditiozono, N-(6-metoxi-8-quinolil)-para-toluenosulfonamida (TSQ), carnosina, deferasirox, ácido trans-1,2-ciclohexano-diamina-N,N,N',N'-tetraacético (CyDTA), dihidroxietilglicina (DHEG), 1,3-diamino-2-hidroxiopropano-N,N,N',N'-tetraacético (DTPA-OH), ácido etilendiamina - N,N'-diacético (EDDA), ácido etilendiamina-N,N'-dipropiónico (EDDP), ácido etilendiamina-N,N'-bis(metilfosfónico) (EDDPO), ácido N-hidroxi-etilendiamina-N,N',N'-triacético (EDTA-OH), ácido etilendiaminatetra(metilenfosfónico) (EDTPO), ácido N,N'-bis(2-hidroxibencil)etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido hexametileno-1,6-diaminotetraacético (HDTA), ácido hidroxietiliminodiacético (HIDA), ácido iminodiacético (IDA), Metil-EDTA, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido nitrilotripropiónico (NTP), ácido nitrilotrimetilenfosfónico (NTPO), 7,19,30-trioxa-1,4,10,13,16,22,27,33-octazabicyclo[11,11,11] pentatriacontano (O-Bistren), ácido trietilenetetraaminehexaacético (TTHA), ácido etilenglicol bis(2-Aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), deferoxamina, dimercaprol, citrato de zinc, combinación de bismuto y citrato, penicilamina, succímero, Etidronato, etilendiamina-di (ácido O-hidroxifenilacético) (EDDHA), ácido trans-1,2-ciclohexanodiaminatetraacético (CDTA), ácido N-(2-hidroxietil) etilendinitriлотriacético (HEDTA), ácido N-(2-hidroxietil) iminodiacético (HEIDA), calprotectina, dedos de zinc, lactoferrina, ovotransferrina, con albúmina, y combinaciones de los mismos.

La invención se refiere a un método para la inhibición de la formación de una biopelícula que comprende bacterias, método que comprende poner en contacto la bacteria con una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la bacteria comprende al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde se inhibe la formación de la biopelícula.

El al menos un quelante de zinc se coloca en contacto con la bacteria en un ambiente que apoya la adhesión bacteriana y por lo tanto potencia el establecimiento de la formación de la película. La reducción del zinc bacteriano en el sitio de la adhesión previene la interacción de los módulos de adhesión de zinc y, por lo tanto, la formación de la biopelícula dependiente de proteína. Los quelantes de zinc, sin embargo, no son necesariamente bactericidas y pueden no matar directamente la bacteria, sino en su lugar prevenir el establecimiento de la infección.

Una variedad de quelantes de zinc se conocen en la técnica. Determinar la concentración adecuada del quelante de zinc, basado en sus propiedades y las biopelícula(s) bacterianas objetivo, está dentro del alcance del técnico con experiencia. Por ejemplo, las concentraciones adecuadas de DTPA para usar contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus suis* pueden estar en el intervalo de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 800  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 700  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 640  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 400  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 320  $\mu\text{M}$ , de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ , o de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 160  $\mu\text{M}$ .

La invención además se refiere a un método para inhibir la formación de una biopelícula sobre un dispositivo, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, el método comprende poner en

contacto el dispositivo con una solución que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la formación de una biopelícula en un dispositivo se inhibe.

5 En una modalidad de la invención, el dispositivo es un dispositivo médico implantable. Un experto en la técnica apreciará que cualquier dispositivo médico implantado o insertado dentro del cuerpo es adecuado para usar en la presente modalidad. Por ejemplo, dispositivos médicos implantables adecuados incluyen, pero no se limitan a, marcapasos, válvulas del corazón, articulaciones de remplazo, catéteres, puertos de acceso a catéteres, tubos de diálisis, bandas gástricas, desviaciones, placas atornillables, reemplazos de discos espinales artificiales, desfibriladores implantables internos, dispositivos de terapia de resincronización cardiaca, monitores cardiacos implantables, dispositivos de reparación del anillo de la válvula mitral, dispositivos de asistencia ventricular izquierda (LVAD), corazones artificiales, bombas de infusión implantables, bombas de insulina implantables, endoprótesis vascular, neuroestimuladores implantables, implantes maxilofaciales, implantes dentales, y similares.

10 La bacteria formadora de biopelícula de la modalidad comprende al menos un módulo de adhesión de zinc, de forma tal que el contacto con uno o más quelantes de zinc que comprenden DTPA inhiben la formación de una biopelícula sobre el dispositivo.

15 Determinar la concentración adecuada del quelante de zinc, basado en sus propiedades y la biopelícula bacteriana en cuestión, está dentro del alcance del técnico con experiencia. Por ejemplo, la concentración del quelante puede ser desde aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 3 mM. Por ejemplo, las concentraciones apropiadas de DTPA para usar en el presente método con *S. epidermidis* RP62A pueden estar en el intervalo de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2.6 mM, o más específicamente de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{M}$ , o aun más específicamente de aproximadamente 30  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 80  $\mu\text{M}$ ; con *S. aureus* USA300, de aproximadamente 80  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1300  $\mu\text{M}$ , o más específicamente de aproximadamente 80  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1600  $\mu\text{M}$ ; con *S. aureus* SA1113, de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 160  $\mu\text{M}$ , o más específicamente de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ ; y con *S. aureus* COL, de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 160  $\mu\text{M}$ , o más específicamente de aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ .

20 En una modalidad, el dispositivo se baña o recubre con una solución que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA. Por ejemplo, el dispositivo puede sumergirse en una solución que comprende una cantidad efectiva de quelante de zinc y opcionalmente se deja secar. En otro aspecto de la modalidad, el dispositivo puede atomizarse con una solución que comprende un quelante de zinc que comprende DTPA y opcionalmente se deja secar. En un escenario quirúrgico, el presente método se puede usar, por ejemplo, para bañar un dispositivo médico antes de la implantación. Alternativamente, un dispositivo médico puede recubrirse con una solución que comprende un quelante de zinc antes de la implantación.

25 La solución que comprende el quelante de zinc que comprende DTPA puede estar en cualquier forma que permita la aplicación de la solución al dispositivo particular. En una modalidad específica, la solución es un gel que comprende al menos un quelante de zinc que comprende DTPA. En otra modalidad específica, la solución es un recubrimiento de polímero que comprende al menos un quelante de zinc. Opcionalmente, la solución puede estar compuesta de forma tal que una cantidad efectiva del quelante de zinc se libera gradualmente, lo que proporciona la inhibición de la formación de la biopelícula durante un período de tiempo.

30 La invención además se refiere a una composición farmacéutica tópica para usar en un método de inhibición de la formación de una biopelícula en o sobre un mamífero que se proporciona, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, la composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

35 La frase "portador farmacéuticamente aceptable" se reconoce en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para administrar composiciones de la presente invención a mamíferos. Cada portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no dañino para el paciente.

40 Las composiciones de esta invención se pueden administrar tópicamente a un sujeto, por ejemplo, por la colocación directa o extensión de la composición sobre el tejido epidérmico o epitelial del sujeto. Tales composiciones incluyen, por ejemplo, lociones, cremas, soluciones, geles, aerosoles, ungüentos, y sólidos. Estas composiciones tópicas preferentemente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva, usualmente al menos aproximadamente 20  $\mu\text{M}$ , y específicamente desde aproximadamente 40  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2 mM, de un quelante de zinc que comprende DTPA. Los portadores adecuados para la administración tópica permanecen en el lugar sobre la piel como una película continua, y resisten

eliminarse por la transpiración o inmersión en agua. Generalmente, el portador es de naturaleza orgánica y capaz de tener dispersos o disueltos en él al menos un quelante de zinc que comprende DTPA. El portador puede incluir agentes emolientes, emulsionantes, espesantes, disolventes y similares farmacéuticamente aceptables.

5 La cantidad de quelante de zinc que comprende DTPA que se aplica tópicamente depende de factores tales como la sensibilidad de la piel, tipo y localización del tejido a tratar, la composición y portador que se va a administrar, así como la biopelícula bacteriana particular que se va a inhibir.

10 Las composiciones de la invención pueden incluir además fármacos o excipientes adicionales según sea apropiado para la indicación. En una modalidad, la composición farmacéutica además comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un agente antimicrobiano. En una modalidad más específica, el agente antimicrobiano es un antibiótico.

15 Se puede usar un enjuague quirúrgico para inhibir la formación de una biopelícula, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, y en donde el enjuague quirúrgico comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA. El enjuague quirúrgico puede ser, por ejemplo, una solución salina amortiguada o una solución Ringer. El quelante puede ser DTPA y la concentración puede ser desde aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2 mM. Un enjuague quirúrgico de este tipo se puede aplicar antes, durante, o después de la cirugía y se puede aspirar del área quirúrgica o dejarse en el área quirúrgica para inhibir la formación de la biopelícula. El vendaje se puede impregnar con una composición de polímeros quelantes.

20 Además se describe un método para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacterias, método que comprende poner en contacto las bacterias con una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE), *Streptococcus sanguinis*, y *Streptococcus suis*, por medio del cual se inhibe la formación de la biopelícula.

30 Además se describe un método para la inhibición de la formación de una biopelícula que comprende bacterias en donde las bacterias comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, método que comprende poner en contacto la bacteria con una composición que comprende al menos un módulo de adhesión de zinc soluble, en donde se inhibe la formación de la biopelícula. La composición puede ser, por ejemplo, un aerosol, loción, solución, gel, crema, ungüento, enjuague quirúrgico, o enjuague dental. La composición que comprende al menos un módulo de adhesión de zinc soluble puede ser una solución para sumergir un dispositivo, una composición de aseo personal, o una composición para limpiar una superficie dura preparada con módulos de adhesión de zinc recombinantes, purificados. La composición puede comprender aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  de una construcción de proteína que comprende uno o dos módulos de adhesión de zinc, o aproximadamente 10 nM a aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  de una construcción de proteína que contiene tres a 17 módulos de adhesión de zinc.

40 Se puede usar un vendaje impregnado con una cantidad segura y efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde el vendaje inhibe la formación de una biopelícula sobre la piel, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc. El vendaje puede ser adecuado para usar en pacientes con cortes, quemaduras por césped, abrasiones, laceraciones, heridas punzantes, regiones de infección bacteriana tales como forúnculos y pústulas y similares. El quelante puede ser DTPA y la concentración de DTPA en la solución que impregna el vendaje puede ser desde aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2 mM.

45 Además se prevé una composición de aseo personal que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la composición de aseo personal inhibe la formación de una biopelícula sobre la piel, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc. Composiciones de aseo personal adecuados incluyen, pero no se limitan a, batas quirúrgicas, geles de ducha, jabones líquidos, jabones, y similares. El quelante puede ser DTPA y la concentración de DTPA en la composición de aseo personal puede ser desde aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 2 mM. La composición de aseo personal se puede aplicar como parte de una rutina de aseo personal. Las composiciones de aseo personal de este tipo pueden ser adecuadas para el uso por una variedad de individuos, lo que incluye, por ejemplo, personas que se recobran de infecciones por MRSA o MRSE, atletas que usan los vestidores del equipo, y profesionales de la salud.

55 Además se prevé una composición de limpieza de superficie dura que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA, en donde la composición inhibe la formación de una biopelícula sobre una superficie dura, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc. Tal composición de limpieza de una superficie dura tiene una variedad de aplicaciones útiles, que incluyen su uso en aplicaciones industriales así como en ambientes médicos, veterinarios, o de ganadería. Por ejemplo, los limpiadores de superficie dura de este tipo son útiles en la limpieza y el tratamiento de sistemas de tuberías, sistemas de enfriamiento de

agua en plantas de energía, refinerías, plantas químicas, sistemas de aire acondicionado, tanques de almacenamiento, bandejas, contenedores, paredes, pisos, pisos de vestidores, mesetas, mostradores, armarios, duchas, baños, aseos, unidades de filtración de agua, y similares, como parte de una rutina de limpieza estándar. El quelante puede ser DTPA y la concentración del quelante en la composición puede ser desde aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 20 mM. Opcionalmente, el al menos un agente quelante de zinc que comprende DTPA está presente en la composición en combinación con uno o más agentes, tales como detergentes, surfactantes, alcoholes, ácido clorhídrico o muriático, ácido acético, hidróxido de sodio o potasio, amonio, y similares.

Se prevé además un enjuague dental para la inhibición de la formación de una biopelícula en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc, el enjuague dental comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc que comprende DTPA.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan como ilustración solamente y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

#### Ejemplo 1

Preparación de soluciones madres de DTPA quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende DTPA acuoso en las cantidades indicadas:

Se preparó una solución madre 100 mM por la disolución de DTPA sólido en 500 mM de HCl y se incubó a temperatura ambiente con agitación (balanceo) por 2 hrs hasta disolver todo el polvo. Esta solución madre concentrada se usó para preparar 8-10X madres para usar para el ensayo, por la dilución del DTPA concentrado en agua filtrada para dar una concentración final de 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 13000, 26000  $\mu\text{M}$ . Todas las soluciones quelantes se filtraron-esterilizaron por un filtro de nitrocelulosa de 0.2  $\mu\text{M}$  antes de usarse en el ensayo de biopelícula.

#### Ejemplo comparativo 2

Preparación de soluciones madres de EDTA quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende EDTA acuoso en las cantidades indicadas:

Se preparó una solución madre concentrada 0.5 M por la disolución del EDTA sólido en agua filtrada y se tituló en 10 M NaOH gota a gota hasta que se alcanzó un pH 8.8. Esta solución madre concentrada se usó para preparar 8-10X madres para el ensayo por la dilución en agua filtrada y esterilización por filtrado, como se describió en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo comparativo 3

Preparación de soluciones madres de EDDA quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende EDDA acuoso en las cantidades indicadas:

Se preparó una madre concentrada 100 mM por la disolución del EDDA sólido en 1N NaOH y se tituló en 12 M HCl gota a gota hasta que se alcanzó un pH de 8.8. Esta solución madre concentrada se usó para preparar 8-10X madres para el ensayo por la dilución en agua filtrada y esterilización por filtrado, como se describió en el Ejemplo 1.

#### Ejemplo comparativo 4

Preparación de soluciones madres de DEDTC quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende DEDTC acuoso en las cantidades indicadas:

Una madre concentrada 100 mM se preparó por la disolución de DEDTC sólido en agua filtrada. Esta solución madre

concentrada se usó para preparar 8-10X madres para el ensayo por la dilución en agua filtrada y esterilización por filtrado, como se describió en el Ejemplo 1.

5 Ejemplo comparativo 5

Preparación de soluciones madres de TPEN quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende TPEN acuoso en las cantidades indicadas:

10 Una madre concentrada 100 mM se preparó por la disolución de TPEN sólido en etanol 100 %. Esta solución madre concentrada se usó para preparar 8-10X madres para el ensayo por la dilución en etanol 100 % y esterilización por filtrado, como se describió en el Ejemplo 1.

15 Ejemplo comparativo 6

Preparación de soluciones madres de 1,10-fenantrolina quelantes de zinc

Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende 1,10-fenantrolina acuosa en las cantidades indicadas:

20 Una madre concentrada 100 mM se preparó por la disolución de 1,10-fenantrolina sólida en 100 mM HCl. Esta solución madre concentrada se usó para preparar 8-10X madres para el ensayo por la dilución en agua filtrada y esterilización por filtrado, como se describió en el Ejemplo 1.

25 Ejemplo comparativo 7

Preparación de solución madre de violeta cristal

30 Se preparó una composición de acuerdo con la presente invención que comprende violeta cristal acuoso en las cantidades indicadas:

Se preparó una solución madre por la disolución de 1 gramo de violeta cristal sólido en 1 litro de agua filtrada, y se pasó la solución a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µM.

35 Ejemplo 8

Efectividad de quelantes de zinc contra la formación de la biopelícula por la cepa RP62a de *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina.

40 La cepa RP62a de *S. epidermidis* (ATCC 35984) se obtuvo como una madre en glicerol de la ATCC. Cultivos durante la noche de 3 ml crecieron en caldo de cultivo de soya tríptico (TSB, BD Biomedical), con agitación a 37 °C, y los cultivos se diluyeron 1: 200 en TBS para su uso en el ensayo de biopelícula.

45 Cada quelante (preparado en Ejemplos 1-6) se añadió directamente a una placa de microtitulación de 96 pozos en una serie de diluciones. 20 µl de cada solución madre (200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 13000, o 26000 µM de quelante) se añadieron a cada pozo. 200 µl de la dilución 1:200 del cultivo bacteriano de RP62a (como se especificó previamente) se añadieron a cada pozo. Controles con medio de cultivo de bacteria solamente y medio de cultivo de bacteria más controles de vehículo solamente (es decir, concentraciones finales 10 mM HCl, 10 % etanol, o 10 mM NaOH) se añadieron a los pozos solos sin quelante. Las placas de 96 pozos se incubaron después 18-24 horas estáticamente a 37 °C. El medio se aspiró mediante pipeta y los pozos se lavaron dos veces con agua filtrada. Las placas se secaron por inversión por 1 hora, y se tiñeron con 0.1 % violeta cristal por 15 minutos. El violeta cristal se aspiró mediante pipeta y se lavó una vez con agua filtrada. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Una absorbancia mayor que 0.1 indica la formación de la biopelícula.

55 Para RP62a, las biopelículas disminuyeron pero no se eliminaron por 20 µM DTPA, 40 µM EDTA, 80 µM 1,10-fenantrolina, 20 µM DEDTC, y 80 µM EDDA. Las biopelículas de RP62a se inhibieron (es decir, absorbancia de 0.1 o menos) por 40 µM DTPA, 20 µM TPEN, 320 µM EDTA, 640 µM 1,10-fenantrolina, y 1.3 mM DEDTC.

60 Ejemplo 9

Efectividad de los quelantes de zinc contra la formación de la biopelícula por la cepa Rosenbach SA113 de *Staphylococcus aureus*

5 La cepa Rosenbach SA113 de *S. aureus* (ATCC 35556) se obtuvo como una madre en glicerol a partir de la ATCC. Cultivos durante la noche de 3 ml crecieron en sangre-caldo de infusión de corazón (BHI, BD biomedical) con agitación a 37 °C, donde los cultivos se diluyeron 1: 50 para su uso en el ensayo de biopelícula.

10 2 % glucosa (20 µl de una madre de glucosa 20 %) se añadió a cada pozo antes de la adición del cultivo de bacterias para promover la formación de la biopelícula. Adicionalmente, placas de microtitulación de 96 pozos se pre-trataron con suero fetal bovino (FBS) a 4 °C por al menos 24 horas antes de su uso. El FBS se aspiró antes de la adición de los quelantes y la glucosa para el ensayo. Cada quelante (preparado en Ejemplos 1-6) se añadió directamente a una placa de microtitulación de 96 pozos en una serie de diluciones. 20 µl de cada solución madre (200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 13000, o 26000 µM de quelante) se añadieron a cada pozo. 200 µl de la dilución 1:50 del cultivo bacteriano de SA113 (como se especificó previamente) se añadieron a cada pozo. Controles con medio de cultivo de bacteria solamente y medio de cultivo de bacteria más controles de vehículo solamente (es decir, concentraciones finales 10 mM HCl, 10 % etanol, o 10 mM NaOH) se añadieron a los pozos solos sin quelante. Las placas de 96 pozos se incubaron después 36-40 horas estáticamente a 37 °C. El medio se aspiró mediante pipeta y los pozos se lavaron dos veces con agua filtrada. Las placas se secaron por inversión por 1 hora, y se tiñeron con 0.1 % violeta cristal por 15 minutos. El violeta cristal se aspiró mediante pipeta y se lavó una vez con agua filtrada. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Una absorbancia mayor que 0.1 indica la formación de la biopelícula.

25 Para SA113, las biopelículas disminuyeron pero no se eliminaron por 20 µM TREN, 320 µM EDTA, 320 µM 1,10-fenantrolina, 80 µM DEDTC, y 20 µM EDDA. Las biopelículas de SA113 se inhibieron (es decir, absorbancia de 0.1 o menos) por 20 µM DTPA, 40 µM TPEN, 1.3 mM 1,10-fenantrolina, 80 µM DEDTC, y 640 µM EDDA.

#### Ejemplo 10

30 Efectividad de los quelantes de zinc contra la formación de la biopelícula por la cepa COL de *Staphylococcus aureus*

La cepa COL de *S. aureus* se obtuvo directamente de Brian Wilkinson (Universidad del estado de Illinois) quien mantuvo el cultivo como una madre congelada desde 1976. Cultivos durante la noche de 3 ml crecieron en sangre-caldo de infusión de corazón (BHI, BD biomedical) con agitación a 37 °C, donde los cultivos se diluyeron 1: 25 para su uso en el ensayo de biopelícula.

35 2 % sacarosa (20 µl de una madre de sacarosa 20 %) se añadió a cada pozo antes de la adición del cultivo de bacterias para promover la formación de la biopelícula. Adicionalmente, placas de microtitulación de 96 pozos se pre-trataron con suero fetal bovino (FBS) a 4 °C por al menos 24 horas antes de su uso. El FBS se aspiró antes de la adición de los quelantes y la sacarosa para el ensayo. Cada quelante (preparado en Ejemplos 1-6) se añadió directamente a una placa de microtitulación de 96 pozos en una serie de diluciones. 20 µl de cada solución madre (200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 13000, o 26000 µM de quelante) se añadieron a cada pozo. 200 µl de la dilución 1:25 del cultivo bacteriano de COL (como se especificó previamente) se añadieron a cada pozo. Controles con medio de cultivo de bacteria solamente y medio de cultivo de bacteria más controles de vehículo solamente (es decir, concentraciones finales 10 mM HCl, 10 % etanol, y 10 mM NaOH) se añadieron a los pozos solos sin quelante. Las placas de 96 pozos se incubaron después 36-40 horas estáticamente a 37 °C. El medio se aspiró mediante pipeta y los pozos se lavaron dos veces con agua filtrada. Las placas se secaron por inversión por 1 hora, y se tiñeron con 0.1 % violeta cristal por 15 minutos. El violeta cristal se aspiró mediante pipeta y se lavó una vez con agua filtrada. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Una absorbancia mayor que 0.1 indica la formación de la biopelícula.

50 Para COL, las biopelículas disminuyeron pero no se eliminaron por 20 µM EDTA, 80 µM 1,10-fenantrolina, 20 µM DEDTC, y 160 µM EDDA. Las biopelículas de COL se inhibieron (es decir, absorbancia de 0.1 o menos) por concentraciones mayores que 20 µM DTPA, 20 µM TPEN, 160 µM EDTA, 320 µM 1,10-fenantrolina, y 80 µM DEDTC. 20.

#### Ejemplo 11

55 Efectividad de los quelantes de zinc contra la formación de la biopelícula por la cepa USA300 *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

La cepa USA300 de *S. aureus* se obtuvo de Daniel Hassett (Universidad de Cincinnati) como una madre en glicerol. Cultivos durante la noche de 3 ml crecieron en sangre-caldo de infusión de corazón (BHI, BD biomedical) con agitación a 37 °C, donde los cultivos se diluyeron 1: 25 para su uso en el ensayo de biopelícula.

5 2 % glucosa (20 µl de una madre de glucosa 20 %) se añadió a cada pozo antes de la adición del cultivo de bacterias para promover la formación de la biopelícula. Adicionalmente, placas de microtitulación de 96 pozos se pre-trataron con fibronectina humana (BD biomedical adquirida de Fisher scientific). La fibronectina se aspiró antes de la adición de los quelantes y la glucosa para el ensayo. Cada quelante (preparado en Ejemplos 1-6) se añadió directamente a una placa de microtitulación de 96 pozos en una serie de diluciones. 20 µl de cada solución madre (200, 400, 800, 1600, 3200, 6400, 13000, o 26000 µM de quelante) se añadieron a cada pozo. 200 µl de la dilución 1:25 del cultivo bacteriano de USA300 (como se especificó previamente) se añadieron a cada pozo. Controles con medio de cultivo de bacteria solamente y medio de cultivo de bacteria más controles de vehículo solamente (concentraciones finales 10 mM HCl, 10 % etanol y 10 mM NaOH) se añadieron a los pozos solos sin quelante. Las placas de 96 pozos se incubaron después 36-40 horas estáticamente a 37 °C. El medio se aspiró mediante pipeta y los pozos se lavaron dos veces con agua filtrada. Las placas se secaron por inversión por 1 hora, y se tiñeron con 0.1 % violeta cristal por 15 minutos. El violeta cristal se aspiró mediante pipeta y se lavó una vez con agua filtrada. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Una absorbancia mayor que 0.1 indica la formación de la biopelícula.

20 Para USA300, las biopelículas disminuyeron pero no se eliminaron por 20 µM DTPA, 20 µM TPEN, 1.3 mM EDTA, y 160 µM 1,10-fenantrolina. Las biopelículas de USA300 se inhibieron (es decir, absorbancia de 0.1 o menos) por concentraciones mayores que 20 µM DTPA, 20 µM TPEN, 2.6 mM EDTA y 1.3 mM 1,10-fenantrolina.

#### Ejemplo 12

25 Un remplazo prostético de rodilla se prepara antes de la cirugía mediante el baño del dispositivo por 60 minutos en una solución estéril DTPA 2 mM. La solución es una solución acuosa que contiene 10 mM HCl, un vehículo usado para solubilizar DTPA. Cuando el cirujano está listo para insertar el remplazo prostético de rodilla, el dispositivo se retira de la solución estéril de DTPA y se implanta dentro del paciente. El tratamiento con la solución de DTPA inhibe la formación de la biopelícula en el dispositivo prostético.

#### 30 Ejemplo 13

35 Durante la instalación quirúrgica de un dispositivo médico implantable, el área adyacente a la operación quirúrgica se enjuaga con una solución salina amortiguada estéril que contiene 100 µM DTPA. Tras la conclusión de la cirugía, la solución estéril se aspira de la zona quirúrgica. El enjuague con la solución de DTPA inhibe la formación de la biopelícula sobre el dispositivo implantable por bacterias comensales o ambientales que acceden a la zona de implantación durante la cirugía.

#### Ejemplo 14

40 Se prepara una crema farmacéutica tópica que contiene 100 µM DTPA. Esta composición se aplica a la superficie de la piel después de una lesión de quemadura por césped. El tratamiento con la crema farmacéutica tópica inhibe la formación de la biopelícula tras la infección del área lesionada con *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

#### 45 Ejemplo 15

Un vendaje se impregna con un gel farmacéutico que contiene 100 µM DTPA. El vendaje se aplica a la superficie de la piel sobre la laceración. El tratamiento con el vendaje inhibe la formación de la biopelícula tras la infección de la superficie lesionada con *Staphylococcus epidermidis*.

#### 50 Ejemplo 16

Se prepara una composición de aseo personal en forma de gel de baño que contiene 1 mM DTPA. La composición de aseo personal se aplica como parte de la rutina de higiene personal por atletas en el vestidor. El gel de baño que contiene DTPA previene infecciones relacionadas con la biopelícula tales como MRSA o MRSE.

#### 55 Ejemplo 17

60 Se prepara una composición de limpieza de superficie dura que contiene 2 mM DTPA. La solución de limpieza se usa para sumergir objetos duros tales como instrumentos quirúrgicos o herramientas para preparar alimentos. La formación de la biopelícula por bacterias que tienen módulos de adhesión de zinc se inhibe.

Ejemplo 18

5 Se prepara una composición de limpieza de superficie dura que contiene 2 mM DTPA. La solución de limpieza se aplica a sistemas de tuberías. La aplicación de la solución de limpieza previene la formación de biopelículas ambientales o industriales en la superficie de las tuberías.

Ejemplo 19

10 Un remplazo de cadera prostético se prepara antes de la cirugía mediante el baño del dispositivo por 60 minutos en una solución estéril que contiene una concentración de 25 µM de una construcción de proteína que comprende un módulo de adhesión de zinc. Cuando el cirujano está listo para insertar el remplazo prostético de cadera, el dispositivo se retira de la solución estéril de módulo de adhesión de zinc y se implanta dentro del paciente. El tratamiento con la solución de módulo de adhesión de zinc inhibe la formación de la biopelícula sobre el dispositivo prostético.

15 Ejemplo 20

20 Durante la instalación quirúrgica de un dispositivo médico implantable, el área adyacente a la operación quirúrgica se enjuaga con una solución salina amortiguada estéril que contiene una concentración de 2 µM de una construcción de proteína que comprende seis módulos de adhesión de zinc. Tras la conclusión de la cirugía, la solución estéril se aspira de la zona quirúrgica. El enjuague con la solución de módulos de adhesión de zinc inhibe la formación de la biopelícula sobre el dispositivo implantable por bacterias comensales o ambientales que acceden a la zona de implantación durante la cirugía.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Herr, Andrew B.  
 Conrady, Deborah G.  
 Brescia, Cristin C.  
 Ward, Stefanie L.

30 <120> Uso de quelantes de zinc para inhibir la formación de la biopelícula  
 <130> 10738-132  
 <150> 61/057267  
 <151> 2008-05-30

35 <160> 2  
 <170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus epidermidis

45 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (1)..(208)  
 <223> Módulo de adhesión de zinc completo simple que incluye secuencia de caperuza C-terminal de la proteína asociada a acumulación (Aap).

50 <400> 1

55

60

ES 2 524 792 T3

Val Asp Gly Asp Ser Ile Thr Ser Thr Glu Glu Ile Pro Phe Asp Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Glu Phe Asp Pro Asn Leu Ala Pro Gly Thr Glu Lys Val Val  
 5 20 25 30  
 Gln Lys Gly Glu Pro Gly Thr Lys Thr Ile Thr Thr Pro Thr Thr Lys  
 35 40 45  
 Asn Pro Leu Thr Gly Glu Lys Val Gly Glu Gly Glu Pro Thr Glu Lys  
 50 55 60  
 Ile Thr Lys Gln Pro Val Asp Glu Ile Val His Tyr Gly Gly Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Gln Gly His Lys Asp Glu Phe Asp Pro Asn Ala Pro Val Asp  
 85 90 95  
 Ser Lys Thr Glu Val Pro Gly Lys Pro Gly Val Lys Asn Pro Asp Thr  
 100 105 110  
 Gly Glu Val Val Thr Pro Pro Val Asp Asp Val Thr Lys Tyr Gly Pro  
 115 120 125  
 Val Asp Gly Asp Ser Ile Thr Ser Thr Glu Glu Ile Pro Phe Asp Lys  
 130 135 140  
 Lys Arg Glu Phe Asp Pro Asn Leu Ala Pro Gly Thr Glu Lys Val Val  
 145 150 155 160  
 Gln Lys Gly Glu Pro Gly Thr Lys Thr Ile Thr Thr Pro Thr Thr Lys  
 165 170 175  
 Asn Pro Leu Thr Gly Glu Lys Val Gly Glu Gly Lys Ser Thr Glu Lys  
 180 185 190  
 Val Thr Lys Gln Pro Val Asp Glu Ile Val Glu Tyr Gly Pro Thr Lys  
 195 200 205

ES 2 524 792 T3

<210> 2  
 <211> 208  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELANEA  
 <222> (1)..(208)

<223> Módulo de adhesión de zinc completo simple que incluye secuencia de recubrimiento C-terminal de la proteína SasG.

<400> 2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

```

Val Lys Gly Asp Ser Ile Val Glu Lys Glu Glu Ile Pro Phe Glu Lys
 1          5          10      15

Glu Arg Lys Phe Asn Pro Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Lys Val Thr
          20          25          30

Arg Glu Gly Gln Lys Gly Glu Lys Thr Ile Thr Thr Pro Thr Leu Lys
          35          40          45

Asn Pro Leu Thr Gly Glu Ile Ile Ser Lys Gly Glu Ser Lys Glu Glu
 50          55          60

Ile Thr Lys Asp Pro Val Asn Glu Leu Thr Glu Phe Gly Gly Glu Lys
65          70          75          80

Ile Pro Gln Gly His Lys Asp Ile Phe Asp Pro Asn Leu Pro Thr Asp
          85          90          95

Gln Thr Glu Lys Val Pro Gly Lys Pro Gly Ile Lys Asn Pro Asp Thr
          100         105         110

Gly Lys Val Ile Glu Glu Pro Val Asp Asp Val Ile Lys His Gly Pro
          115         120         125

Lys Thr Gly Thr Pro Glu Thr Lys Thr Val Glu Ile Pro Phe Glu Thr
130         135         140

Lys Arg Glu Phe Asn Pro Lys Leu Gln Pro Gly Glu Glu Arg Val Lys
145         150         155         160

Gln Glu Gly Gln Pro Gly Ser Lys Thr Ile Thr Thr Pro Ile Thr Val
          165         170         175

Asn Pro Leu Thr Gly Glu Lys Val Gly Glu Gly Gln Pro Thr Glu Glu
          180         185         190

Ile Thr Lys Gln Pro Val Asp Lys Ile Val Glu Phe Gly Gly Glu Lys
          195         200         205
    
```

Reivindicaciones

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
1. Un método *in vitro* para inhibir la formación de una biopelícula que comprende bacteria, método que comprende poner en contacto la bacteria con una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc, en donde la bacteria comprende al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde las bacterias se seleccionan de un grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de las mismas, por medio del cual se inhibe la formación de la biopelícula; **que se caracteriza por que** el al menos un agente quelante de zinc comprende DTPA.
  2. El método de la reivindicación 1 en donde las bacterias se seleccionan de uno o más grupos que consisten de *Staphylococcus aureus* (MRSA) resistente a meticilina y *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (MRSE) y combinaciones de las mismas.
  3. Un método para inhibir la formación de una biopelícula sobre un dispositivo, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde las bacterias se seleccionan del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de las mismas, método que comprende poner en contacto el dispositivo con una solución que comprende una cantidad efectiva de al menos un quelante de zinc, por medio del cual la formación de una biopelícula sobre el dispositivo se inhibe; **caracterizado por que** el al menos un quelante de zinc comprende DTPA.
  4. El método de la reivindicación 3 en donde el dispositivo comprende un dispositivo médico implantable.
  5. El método de la reivindicación 4 en donde el dispositivos médico implantable se selecciona del grupo que consiste de marcapasos, válvulas del corazón, articulaciones de remplazo, catéteres, puertos de acceso a catéteres, tubos de diálisis, bandas gástricas, desviaciones, placas atornillables, remplazos de discos espinales artificiales, defibriladores implantables internos, dispositivos de terapia de resincronización cardiaca, monitores cardiacos implantables, dispositivos de reparación del anillo de la válvula mitral, dispositivos de asistencia ventricular izquierda (LVAD), corazones artificiales, bombas de infusión implantables, bombas de insulina implantables, endoprótesis vasculares, neuroestimuladores implantables, implantes maxilofaciales, e implantes dentales.
  6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en donde el contacto comprende bañar o recubrir el dispositivo.
  7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en donde la solución es un revestimiento de gel o polímero.
  8. Una composición farmacéutica tópica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un quelante de zinc y al menos un portador farmacéuticamente aceptable, para usar en un método de inhibición de la formación de una biopelícula en un mamífero, en donde la biopelícula comprende bacterias que comprenden al menos un módulo de adhesión de zinc y en donde la bacteria se selecciona del grupo que consiste de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* y combinaciones de las mismas; **caracterizado porque** el al menos un quelante de zinc comprende DTPA.
  9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que además comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente antimicrobiano, que incluye un antibiótico.
  10. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la composición está en la forma de un enjuague quirúrgico, enjuague dental, aerosol, solución, gel, crema, ungüento, lavado corporal, jabón, batas quirúrgicas, o vendaje impregnado.
  11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración de cada quelante es de 20  $\mu\text{M}$  a 3 mM.
  12. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la concentración de cada quelante es de 20  $\mu\text{M}$  a 3 mM.

FIG. 1

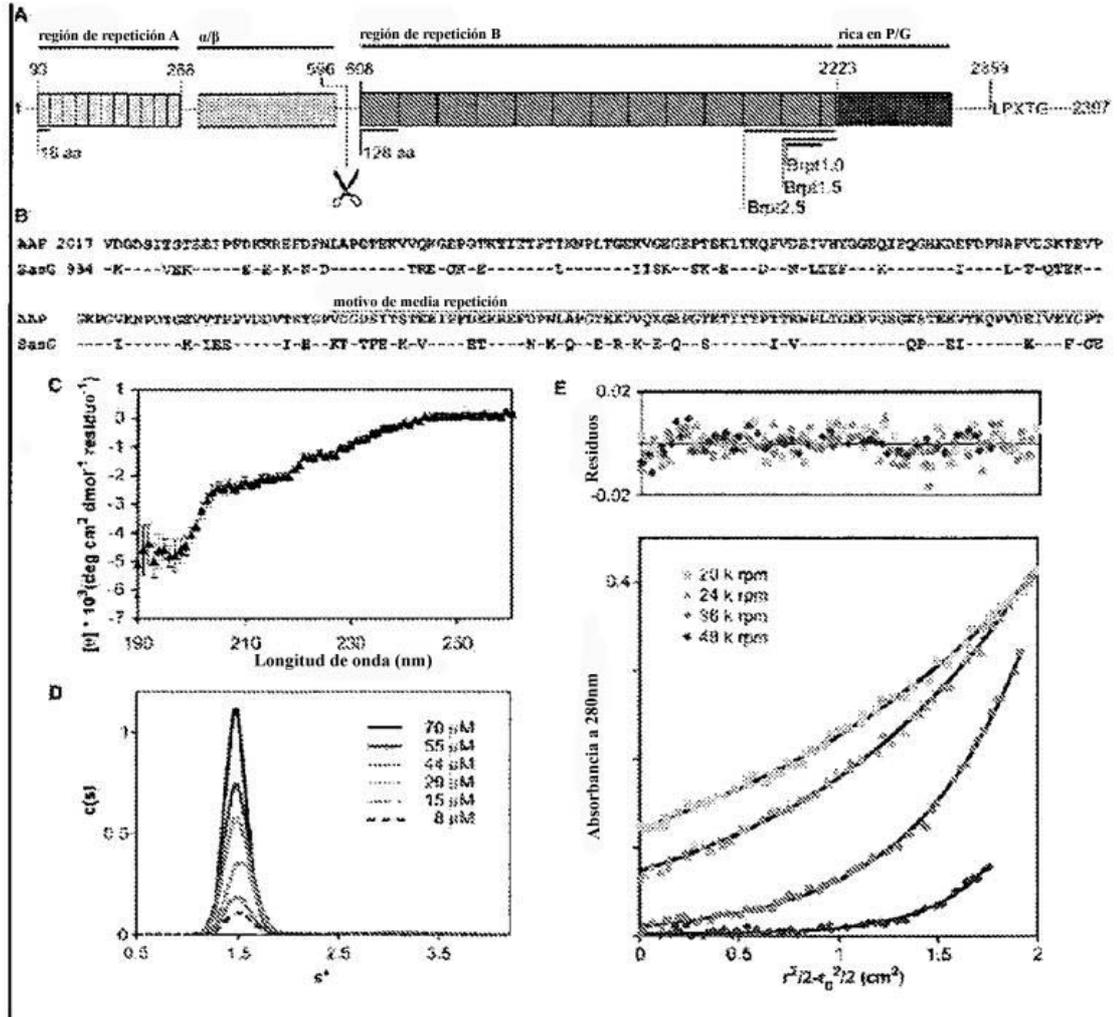


FIG. 2

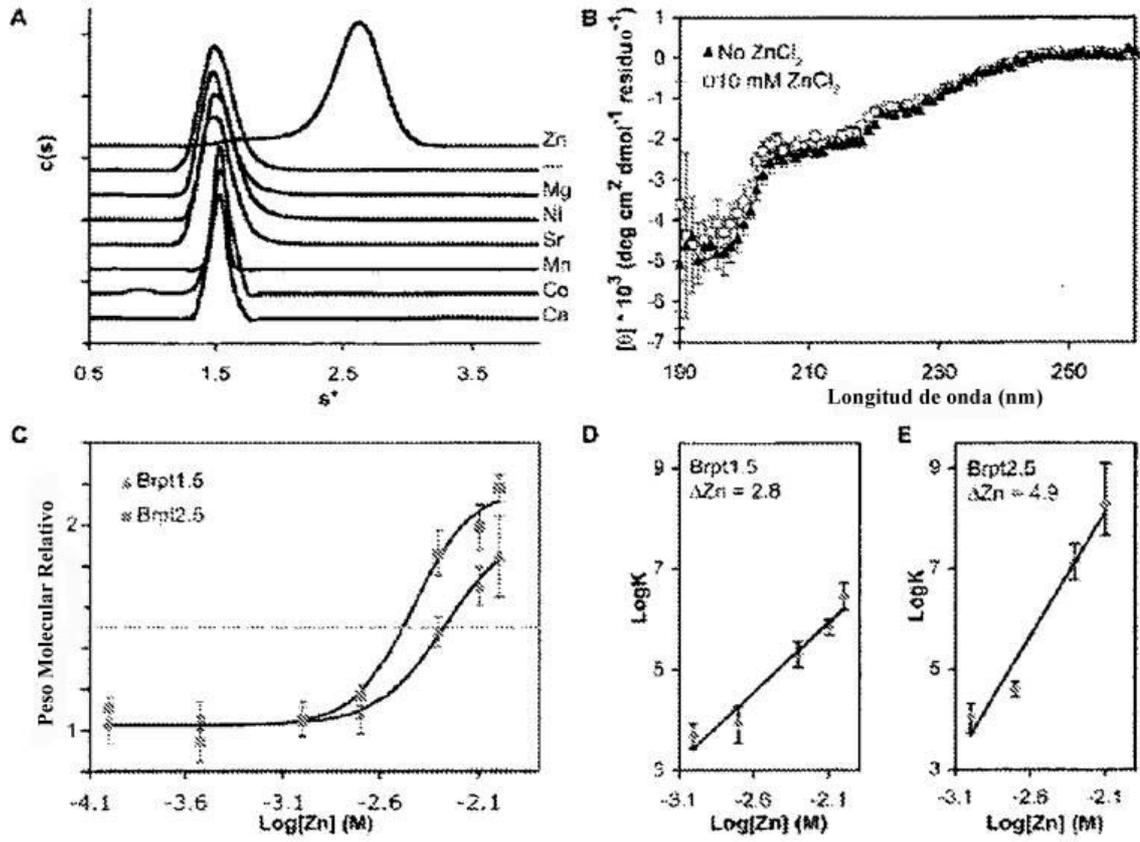


FIG. 3

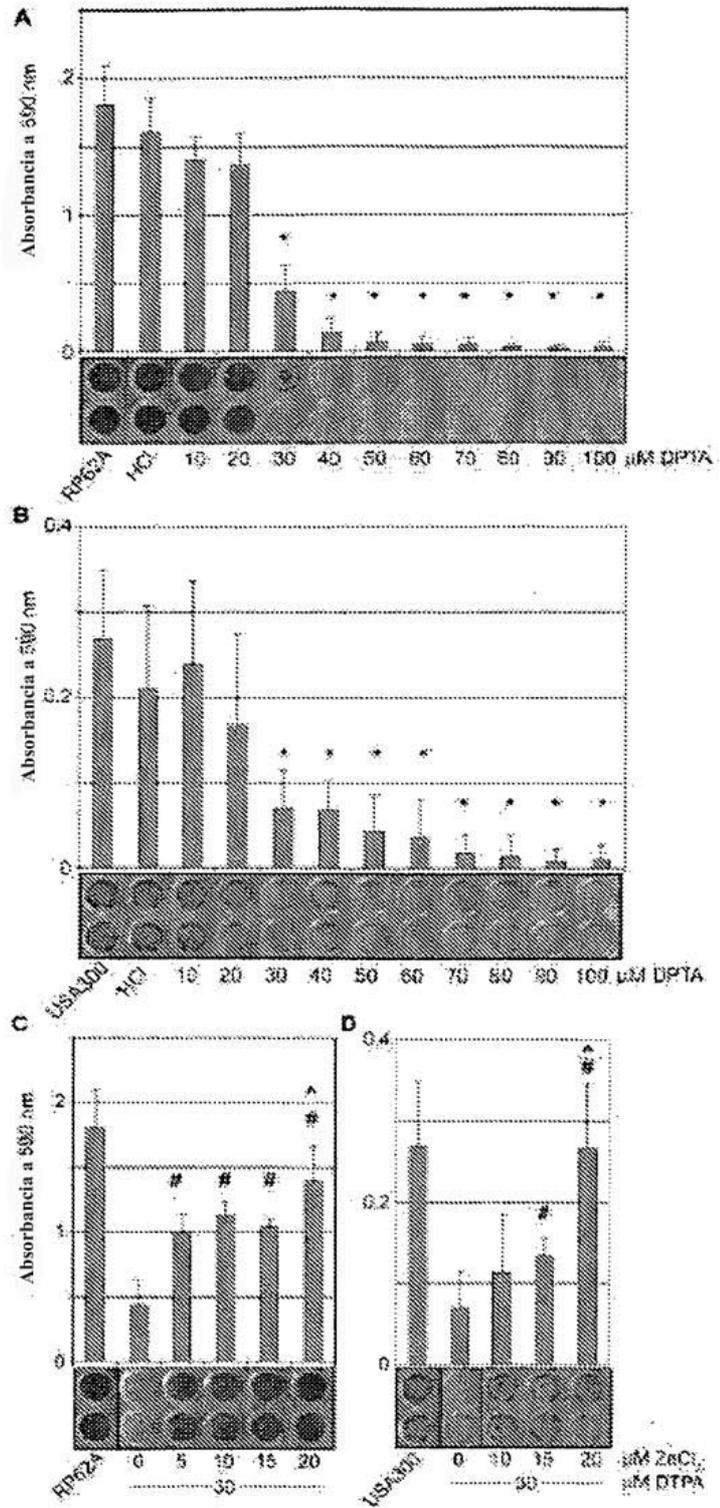


FIG. 4

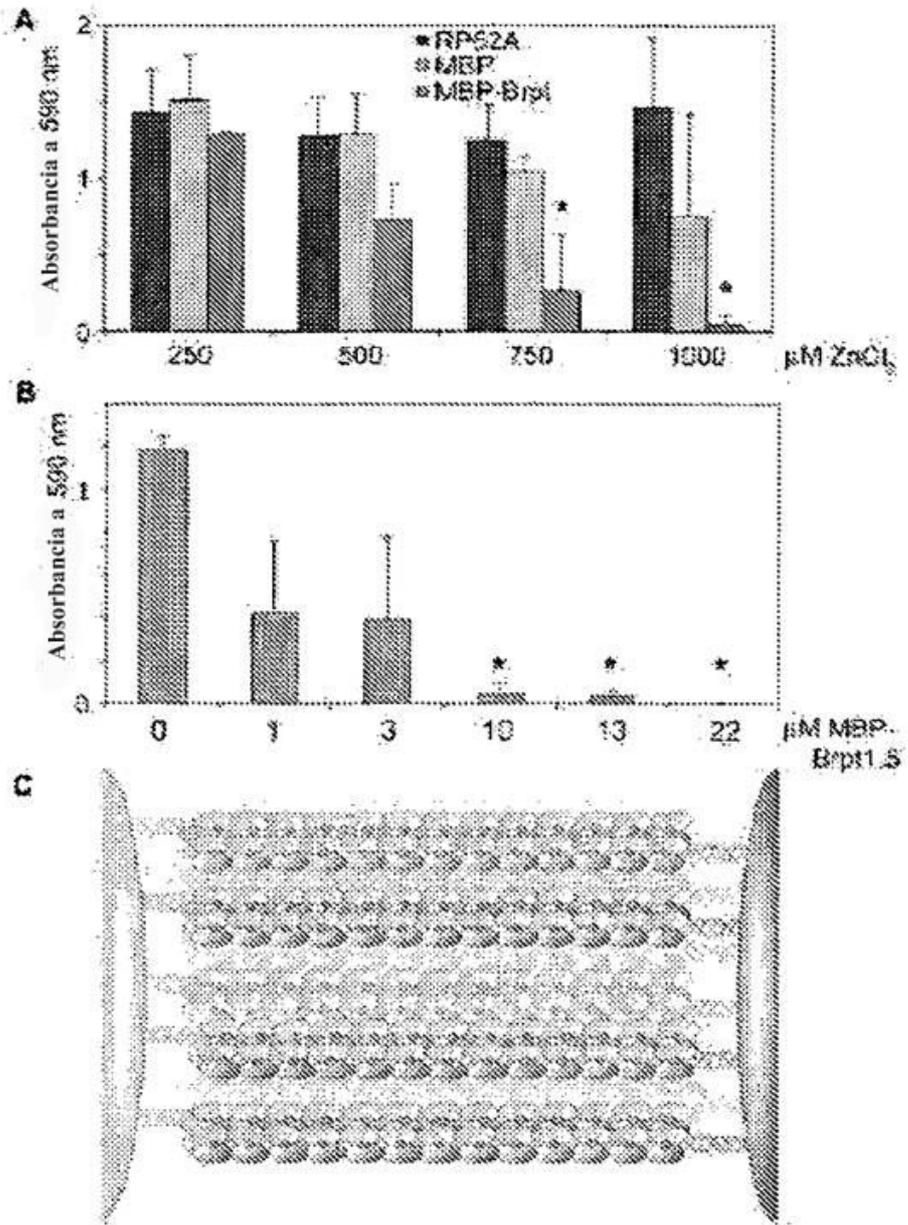


FIG. 5

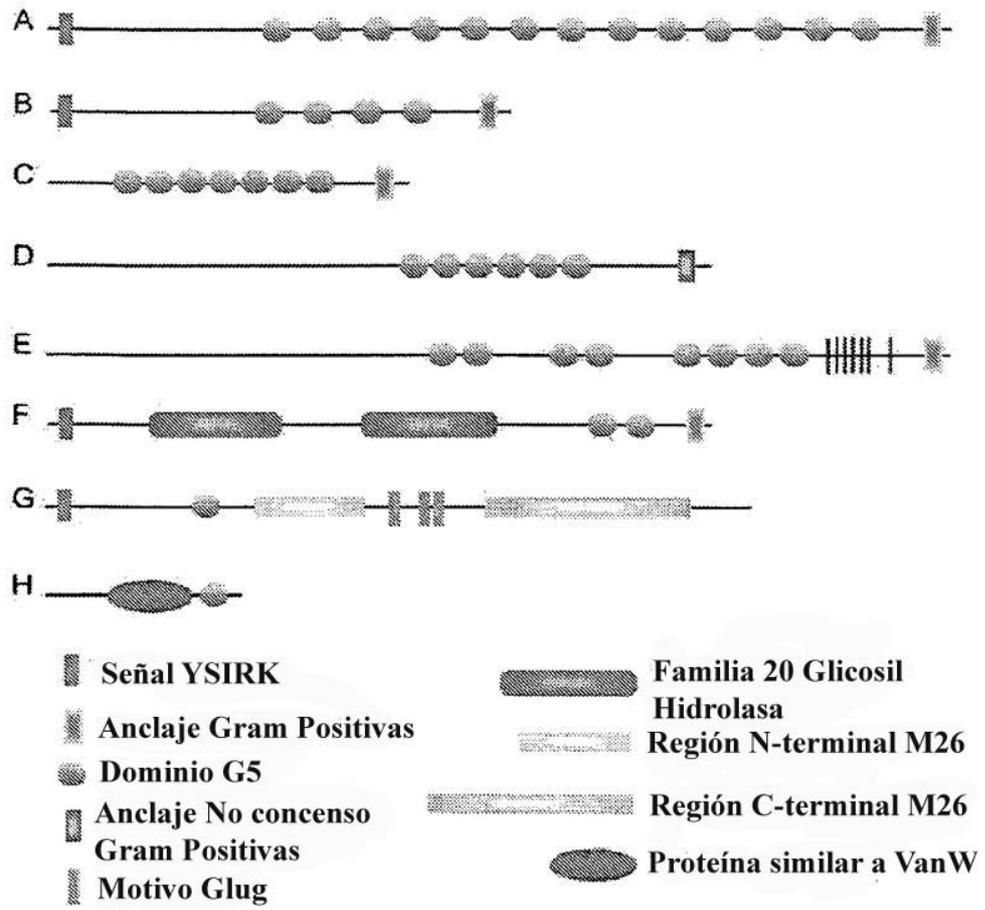


FIG. 6

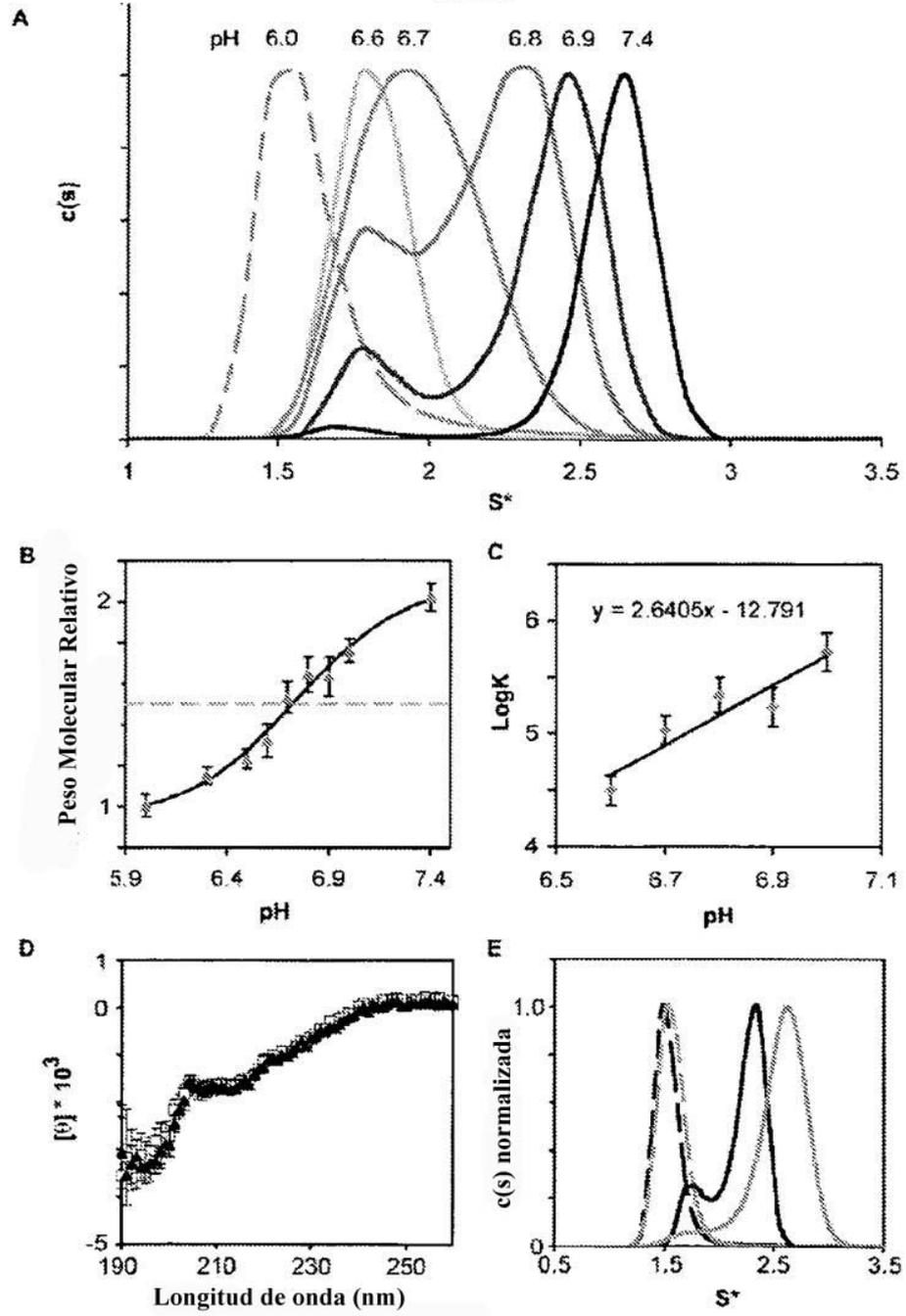


FIG. 7

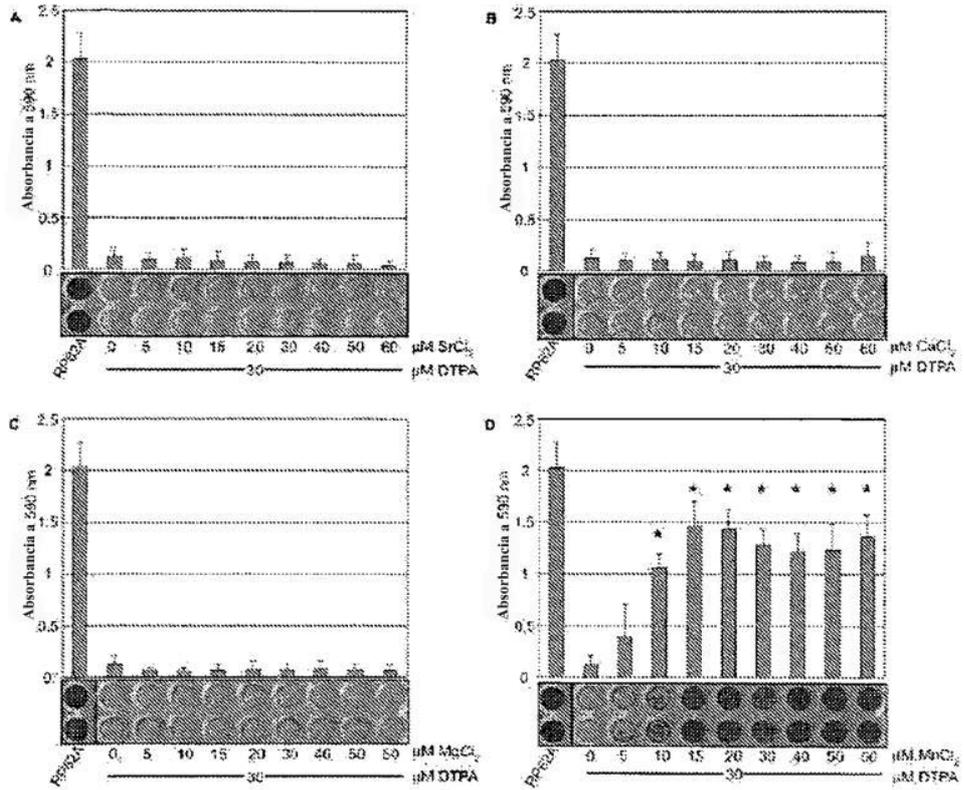


FIG. 8

