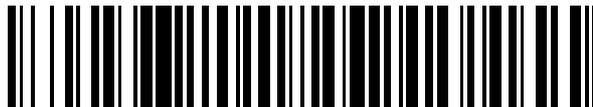


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 133**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2009 E 09805832 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 2376528**

54 Título: **Péptidos y composiciones para prevención de la adhesión celular, y métodos para utilizar los mismos**

30 Prioridad:

29.12.2008 US 193821 P

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

04.02.2015

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH,
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD.
(100.0%)**

**The Technology Transfer Company Of Chaim
Sheba Medical Center
52621 Tel Hashomer, IL**

72 Inventor/es:

ZLOTKIN, AMIR

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 133 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

Péptidos y composiciones para prevención de la adhesión celular, y métodos para utilizar los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos aislados y a su uso en la prevención de la adhesión celular.

5 Antecedentes de la invención

Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales que nadan libremente en el medio ambiente (como plancton) o pueden crecer como comunidades multicelulares muy organizadas encerradas en una autoproducida matriz polimérica en íntima asociación con superficies e interfases. Al último estilo de vida microbiana se hace referencia como biopelículas. La formación de biopelículas representa un antiguo modo protegido de crecimiento que permite la supervivencia microbiana en entornos hostiles y permite que los microorganismos se dispersen y colonicen nuevos nichos [Hall-Stoodley et al., Nat. Rev. Microbiol. (2004) 2 (2): 95-108].

La composición de las biopelículas es compleja y variable entre las diferentes especies microbianas e incluso dentro de la misma especie bajo diferentes condiciones ambientales. No obstante, la formación de biopelículas representa el estilo de vida normal de un microorganismo en el medio ambiente, y todos los microbios pueden formar biopelículas. Estudios previos revelaron que la formación de biopelículas bacterianas progresa a través de múltiples fases de desarrollo que difieren en cuanto a los perfiles proteicos [Sauer et al., J. Bacteriol. (2002) 184 (4): 1140-54], comenzando con la fijación a una superficie y siguiendo con la inmigración y la división para formar microcolonias y, finalmente, una maduración que implica la expresión de polímeros matriciales. Las bacterias, dentro de cada fase de la biopelícula, presentan fenotipos y poseen propiedades que son notablemente diferentes de aquéllas del mismo grupo que crece planctónicamente [Sauer et al., J. Bacteriol. (2004) 186 (21): 7312-26].

Las biopelículas son una causa principal de infecciones sistémicas (por ejemplo, infecciones nosocomiales) en los seres humanos. En el organismo, las biopelículas pueden asociarse con tejidos (por ejemplo, oídos internos, dientes, encías, pulmones, válvulas cardíacas y el tracto urogenital). Se estima que el 65% de las infecciones bacterianas son de naturaleza biopelicular en los seres humanos. Además, después de formar biopelículas, los microorganismos tienden a cambiar sus características, a veces drásticamente, de modo que unas dosis de antibióticos que normalmente matan los organismos en cultivos en suspensión resultan completamente ineficaces contra los mismos microorganismos cuando los organismos están en forma de biopelícula fijada o conglomerada (Patente de EE.UU. nº 7189351).

Una de las principales preocupaciones con respecto a los productos que se introducen en el organismo (por ejemplo, lentes de contacto, catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas mecánicas y marcapasos) o proporcionan una vía en el organismo es la infección microbiana y la inevitable formación de biopelículas. Puesto que estas infecciones son difíciles de tratar con antibióticos, a menudo es necesaria la eliminación del dispositivo, lo que es traumático para el paciente y aumenta el coste médico. En consecuencia, para tales aparatos médicos, en la técnica se han buscado durante mucho tiempo medios y métodos para hacer antimicrobianos esos aparatos y dispositivos médicos.

En la Solicitud PCT nº WO 06/006172 se describe el uso de agentes antiamiloides, tales como compuestos aromáticos, para inhibir la formación de una biopelícula o desintegrar una biopelícula preexistente. En la solicitud se describe que compuestos que previenen la formación de fibrillas de amiloide en pacientes con enfermedad de Alzheimer pueden actuar contra la formación de fibrillas en biopelículas, y se concluye que aminoácidos que tienen una rama aromática son eficaces contra las biopelículas. Sin embargo, el análisis se limitó a secuencias de longitud completa.

En el Documento WO 2005/121778 y en Spangenberg (1998), Genomics volumen 48, se describe TM7SF1 (miembro 1 de la superfamilia de proteínas con 7 dominios transmembranales). Balaban (2003), J. Infect. Diseases volumen 187, describe un péptido YSPWTNF que previene la producción de una molécula reguladora RNAIII en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Sumario de la invención

La invención se refiere a realizaciones como las definidas en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona péptidos naturales o sintéticos aislados de animales, incluyendo mamíferos y no mamíferos, que interfieren en la formación de biopelículas en sus fases iniciales, en una gran variedad de microorganismos.

Todos los péptidos descritos en esta memoria muestran una actividad que se dirige exclusivamente a la prevención de la adhesión microbiana a sustratos y la derivada formación de biopelículas. Están desprovistos de la actividad bactericida letal comúnmente observada, revelada por los péptidos antibióticos y los metabolitos secundarios, que proporciona una potente presión selectiva para una rápida selección natural mediante el intensivo "potencial biótico"

microbiano. Por otro lado, una inhibición de amplio alcance de la colonización microbiana causa el antagonismo de un mecanismo fundamental de supervivencia bacteriana. Por lo tanto, una modificación adaptativa de dicho mecanismo presenta una baja probabilidad a causa de su vitalidad.

5 Sher et al. (Toxicon 45: 865-879, 2005), empleando un planteamiento de bioinformática, identificaron supuestas proteínas y polipéptidos biológicamente activos expresados por hidras, que podrían ser componentes de su sistema de alomonas. Se mostró que las hidras expresan ortólogos de toxinas de fosfolipasa A2 de cnidarios y citolisinas pertenecientes a la familia de actinoporinas, y expresan proteínas similares a fosfolipasas de tipo elápido, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP; del inglés, cysteine-rich secretory proteins), polipéptidos de tipo procinetina y desoxirribonucleasas tóxicas.

10 Hasta ahora no se han identificado las secuencias específicas responsables de la actividad citotóxica en péptidos aislados de fuentes naturales.

15 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos empleados en esta memoria tienen un significado igual al comúnmente entendido por quien tiene una experiencia normal en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque en la práctica o el ensayo de la presente invención se pueden emplear métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, mandará la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no han de ser considerados restrictivos.

20 Como se emplean en esta memoria, las expresiones "que comprende" y "que incluye", o variantes gramaticales de las mismas, han de ser consideradas como especificación de las características, números enteros, operaciones o componentes expuestos pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, operaciones, componentes o grupos de los mismos adicionales. Estas expresiones abarcan las expresiones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

25 La frase "que consiste esencialmente en" o variantes gramaticales de la misma, cuando se emplean en esta memoria, han de ser consideradas como especificación de las características, números enteros, operaciones o componentes expuestos pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, operaciones, componentes o grupos de los mismos adicionales, pero sólo si las características, números enteros, operaciones, componentes o grupos de los mismos adicionales no alteran sustancialmente las características básicas y nuevas de la composición, el dispositivo o el método reivindicados.

30 El término "método" se refiere a modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, incluyendo, pero sin limitarse a, aquellos modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos, por profesionales de las técnicas química, biológica y biofísica.

Como se emplea en esta memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

35 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

40 La invención se describe en esta memoria, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que los datos mostrados son sólo a modo de ejemplo y con la finalidad de una discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan con objeto de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y más fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace intento alguno para mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle que el necesario para una comprensión fundamental de la invención, y la descripción tomada con los dibujos hacen evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden llevar las diversas formas de la invención a la práctica.

45 En los dibujos:

La Figura 1 es un diagrama de barras que muestra la inhibición de la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* por el péptido sintético grZ-28C [CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNC] (ID. SEC. nº 1) en tres concentraciones diferentes;

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra un ensayo de crecimiento sobre *Pseudomonas aeruginosa*;

50 La Figura 3 es un diagrama de barras que muestra la actividad antiadherente de los péptidos grZ35 cyc y grZ28C, basados en la secuencia de aminoácidos de GPCR 137b, sobre *Pseudomonas aeruginosa*; y

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra los efectos de los péptidos grZ35 cyc y grZ28C sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de composiciones que comprenden un péptido aislado de una fuente animal, que tiene uno o más efectos relativos a la prevención de la adhesión bacteriana a sustratos y la derivada formación de biopelículas, y, opcionalmente, también a la prevención de la adhesión de célula-célula. Adicional o alternativamente, también se pueden proporcionar opcionalmente otros efectos. El péptido comprende al menos la secuencia FDYDWY. Como un ejemplo no restrictivo, el péptido puede comprender opcional y preferiblemente una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

FDYDWY (ID. SEC. nº 2),
SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3) y
CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 1).

Una de las principales preocupaciones en medicina es la formación de biopelículas microbianas. En seres humanos, las biopelículas son una preocupación principal cuando se introducen productos en el organismo (por ejemplo, lentes de contacto, catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas mecánicas y marcapasos).

Las biopelículas son también un problema en muchas industrias, incluyendo las industrias de alimentos, productos farmacéuticos, pinturas, agua, transporte e ingeniería, causando, entre una gran variedad de efectos negativos, la corrosión acelerada en sistemas industriales, la acidificación del petróleo y la bioincrustación. Por ejemplo, la bioincrustación puede ser causada por la adhesión de organismos a cualquier superficie en un entorno marino o de agua dulce, incluyendo torres de refrigeración, conductos de agua y filtros en instalaciones de refrigeración o desalinización, instalaciones de riego y centrales eléctricas, y membranas tales como las utilizadas en sistemas de aguas residuales y desalinización. También se produce bioincrustación en sistemas de acuicultura en criaderos de peces.

Además, las flotas de transporte comerciales del mundo consumen aproximadamente 300 millones de toneladas de combustible al año. Sin medidas antiincrustantes, ese consumo de combustible aumentaría en tanto como un 40%, equivalente a 120 millones de toneladas extra de combustible al año. Se estimó que el coste económico de esto era aproximadamente 7500 millones de dólares en el año 2000; una estimación más reciente es 30.000 millones de dólares.

Las biopelículas son muy difíciles de eliminar ya que los microbios que crecen dentro de ellas están muy organizados y pueden resistir entornos hostiles, tales como temperaturas elevadas y agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos).

Las plantas y organismos marinos y de agua dulce, incluyendo invertebrados acuáticos de cuerpo blando, peces y musgos, están rodeados por especies de organismos microbianos de amplio espectro. Puesto que dichas plantas y organismos carecen de inmunidad específica, producen diversos factores que pueden prevenir la colonización microbiana sobre su superficie corporal.

Los organismos más "sensibles" son invertebrados que pertenecen al filo cnidaria, que incluyen las anémonas de mar, los corales, las medusas, los hidroides y las gorgonias. Dichos organismos de cuerpo blando, que carecen de una protección física tal como escamas o caparazones, utilizan proteínas y metabolitos secundarios para protegerse del entorno microbiano que los rodea.

Se ha comunicado previamente que organismos marinos (por ejemplo, las esponjas) producen metabolitos secundarios que presentan actividades antibacterianas y antifúngicas (Amade et al., *supra*). Además, se ha mostrado que las anémonas de mar (por ejemplo, la *Actinia equina*) producen péptidos tóxicos formadores de poros (es decir, equinatoxinas), que lisan y matan células eucarióticas similarmente a otros péptidos antimicrobianos pequeños (Anderluh et al., *supra*).

Se aislaron péptidos con secuencias de alta conservación de estos factores naturales, péptidos que mostraron una elevada actividad en la prevención de la adherencia microbiana en su conformación sintética. La secuencia conservada se encuentra en diversos organismos marinos, incluyendo varias especies conocidas de anémona de mar, diversos peces (incluyendo el pez cebra, *Danio rerio*) y el musgo *Physcomitrella patens* subsp. *patens*.

Basándose en un análisis bioinformático, se cree que la proteína ha cambiado en los organismos superiores (incluyendo el *Homo sapiens*) a FDYDWY (ID. SEC. nº 2), que se puede encontrar en proteínas con un intervalo de tamaños de 128 aa - 400 aa. En el *Homo sapiens*, este péptido es parte del receptor 137B acoplado a proteínas G (Identificación Génica: 7107 GPR137B), situado en 269-274. Basándose en la entrada O60478 de UniProtKB/Swiss-Prot, la región, que comienza en 259 y acaba en 292, es una región extracelular, lo que respalda la teoría de que este péptido es la parte activa de la proteína.

Un análisis bioinformático del antiguo organismo marino *Ciona intestinalis* permitió identificar una proteína de 368 aminoácidos, similar al receptor 137ba acoplado a proteínas G (número de acceso de GeneBank: XP_002125109). La región similar al péptido antiadhesivo es SPLRCSELSSFNFDWYNVSDQADLVN (ID. SEC. nº 4). Basándose en esta información y en el hecho de que *Ciona intestinalis* está también expuesto a una gran diversidad de

microorganismos, los presentes inventores formularon la hipótesis de que el péptido FNFDWY (ID. SEC. nº 5) es también antiadhesivo. La secuencia peptídica no ciclada SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3), que representa la región extracelular, restos 259-284, fue sintetizada con dos cisteínas en los extremos C y N.

5 La secuencia peptídica ciclada SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNQLGDAGYV (ID. SEC. nº 6), que representa la región extracelular, restos 259-292, fue sintetizada con dos cisteínas en los extremos C y N y un puente S-S.

El péptido ciclado de la presente invención comprende al menos la secuencia FDYDWY (ID. SEC. nº 2). Por ejemplo, el péptido ciclado puede comprender al menos una de las secuencias :

FDYDWY (ID. SEC. nº 2),
 SFDYDWY (ID. SEC. nº 7),
 10 SFDYDWYN (ID. SEC. nº 8),
 HSFYDWYN (ID. SEC. nº 9),
 HSFYDWYNV (ID. SEC. nº 10),
 VHSFDYDWYNV (ID. SEC. nº 11),
 VHSFDYDWYNVS (ID. SEC. nº 12),
 15 SVHSFDYDWYNVS (ID. SEC. nº 13),
 SVHSFDYDWYNVSD (ID. SEC. nº 14),
 KSVHSFDYDWYNVSD (ID. SEC. nº 15),
 KSVHSFDYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 16),
 NKSVDYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 17),
 20 NKSVDYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 18),
 QNKSVHSFDYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 19),
 QNKSVHSFDYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 20),
 SQNKSVHSFDYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 21),
 SQNKSVHSFDYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 22),
 25 FSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 23),
 FSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 24),
 SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 25),
 SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3),
 CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 26) y
 30 CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 1),

o combinaciones de las mismas.

Se proporciona también una composición que comprende el péptido ciclado.

El péptido está ciclado.

35 El péptido puede ser aislado de cualquier animal no humano. Preferiblemente, el animal es un vertebrado, tal como, por ejemplo, un pez, un anfibio (incluyendo una rana, un sapo, un tritón o una salamandra), un ave, un reptil (tal como un cocodrilo, un lagarto, una serpiente o una tortuga) o un mamífero.

40 El péptido está también presente en el organismo marino *Ciona intestinalis*, que pertenece al filo Chordata. En este organismo, la proteína muestra similitud con la proteína GPCR 137b de los vertebrados superiores y, puesto que este organismo está rodeado de microorganismos, el péptido que incluye la secuencia FNFDWY es también parte de la patente.

El péptido de la presente invención puede comprender opcionalmente al menos dos de las secuencias anteriores unidas por un conector de algún tipo, de modo que el extremo N de una primera secuencia peptídica esté unido al extremo C del conector, y el extremo C de una segunda secuencia peptídica esté unido al extremo N del conector.

45 Como se emplea en esta memoria, el término "conector" se refiere a cualquier enlace químico o molécula para unir dos péptidos o para ciclar un péptido como el descrito en esta memoria. El conector también puede comprender opcionalmente un polímero de cualquier número adecuado de unidades monoméricas. Sin embargo, en cualquier caso, el conector presenta preferiblemente un grupo activo, y/o está derivatizado para incluir dicho grupo activo, en al menos dos posiciones con objeto de unir dos o más péptidos y/o ciclar un péptido como el descrito en esta memoria.

50 Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden ser mejor comprendidos con referencia a los dibujos y las descripciones adjuntas.

55 Antes de la explicación al detalle de al menos una realización de la invención, se ha de entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la descripción siguiente o ejemplificados mediante los Ejemplos. La invención puede tener otras realizaciones o ser llevada a la práctica o a cabo de diversos modos. Además, se ha de entender que la fraseología y la terminología empleadas en esta memoria tienen la finalidad de descripción y no deben ser consideradas restrictivas.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un péptido aislado de una fuente humana, péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: FDYDWY (ID. SEC. nº 2),

5 SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3) y
CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 1).

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método *in vitro* para prevenir la adhesión de un organismo de una sola célula a una superficie, método que comprende poner la célula en contacto con una composición que comprende un péptido aislado de una fuente humana, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FDYDWY (ID. SEC. nº 2), SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3) y CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 1), previniendo por ello la adhesión de una célula a una superficie.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se proporciona preferiblemente un dominio que comprende al menos uno de los péptidos anteriores y que es eficaz contra la adhesión celular a una superficie. Más preferiblemente, el dominio está incluido como parte de una proteína. Opcional y lo más preferiblemente, el dominio presenta un comportamiento antiadhesivo, por ejemplo, para la prevención de la formación de una biopelícula y/o para el tratamiento de una biopelícula, pero no presenta un comportamiento citotóxico.

Como se emplea en esta memoria, el término "aislada" se refiere a una composición que ha sido separada de su emplazamiento *in vivo*. Preferiblemente, las composiciones aisladas de la presente invención están sustancialmente exentas de otras sustancias (por ejemplo, otras proteínas que no comprenden efectos antiadhesivos) que están presentes en su emplazamiento *in vivo* (es decir, están purificadas o semipurificadas). Los péptidos aislados pueden ser opcionalmente sintéticos o ser obtenidos de fuentes naturales, incluyendo opcionalmente el ser expresados *in vivo* usando técnicas de ingeniería genética.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones de la presente invención están desprovistas de actividad citotóxica o citostática; por ejemplo, no son bactericidas ni bacteriostáticas.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, las composiciones de la presente invención son resistentes a la liofilización; por ejemplo, sus actividades se conservan después de una liofilización.

Como se emplea en esta memoria, la frase "organismo de una sola célula" se refiere a un organismo unicelular también denominado microorganismo o microbio. El organismo de una sola célula de la presente invención puede ser un organismo eucarionte de una sola célula (por ejemplo, protozoos u hongos, tales como, por ejemplo, levaduras) o un organismo procarionte de una sola célula (por ejemplo, bacterias o arqueas). Los organismos de una sola célula de la presente invención pueden estar en cualquier entorno celular, tal como, por ejemplo, en una biopelícula, como células aisladas o como una suspensión de células.

Como se emplea en esta memoria, el término "biopelícula" se refiere a una matriz extracelular en que unos microorganismos están dispersos y/o forman colonias. La biopelícula está típicamente compuesta de polisacáridos y otras macromoléculas.

Las células bacterianas ejemplares, cuya adhesión puede ser prevenida de acuerdo con el método de la presente invención, incluyen bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

La expresión "bacterias Gram positivas", como se emplea en esta memoria, se refiere a bacterias caracterizadas por tener, como parte de su estructura de pared celular, peptidoglicano así como polisacáridos y/o ácidos teicoicos, y se caracterizan por su reacción de color azul-violeta en el procedimiento de tinción de Gram. Las bacterias Gram positivas representativas incluyen: *Actinomyces* spp., *Bacillus anthracis*, *Bifidobacterium* spp., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium* spp., *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium jeikeium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Eubacterium* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Gemella morbillorum*, *Leuconostoc* spp., *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium haemophilium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Nocardia* spp., *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdanicus*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus schleiferi*, *Staphylococcus similans*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus xylosum*, *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A), *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*.

La expresión "bacterias Gram negativas", como se emplea en esta memoria, se refiere a bacterias caracterizadas por la presencia de una doble membrana que rodea cada célula bacteriana. Las bacterias Gram negativas

representativas incluyen *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Fusobacterium* spp., *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Prevotella* spp., *Proteus* spp., *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rochalimaea* spp., *Salmonella* spp., *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Shigella sonnei*, *Treponema carateum*, *Treponema pallidum*, *Treponema pallidum endemicum*, *Treponema pertenue*, *Veillonella* spp., *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pestis*.

El término "hongos", como se emplea en esta memoria, se refiere a los organismos heterótrofos caracterizados por la presencia de una pared celular de quitina y, en la mayoría de las especies, un crecimiento filamentoso en forma de hifas multicelulares. Los hongos representativos cuya adhesión puede ser prevenida de acuerdo con el método de la presente invención incluyen *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida dubliniensis*.

Como se emplea en esta memoria, la frase "prevenir la adhesión" se refiere a reducir o eliminar la fijación de células a una superficie (por ejemplo, reduciendo la velocidad de crecimiento sobre una superficie). Preferiblemente, las composiciones de la presente invención previenen la adhesión celular en tanto como un 10%, más preferiblemente un 20%, más preferiblemente un 30%, más preferiblemente un 40%, más preferiblemente un 50%, más preferiblemente un 60%, más preferiblemente un 70%, más preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% y lo más preferiblemente un 100%, según se mide mediante un ensayo de adhesión celular. Más adelante y en la posterior sección Ejemplos se describen ensayos de adhesión celular ejemplares. Se apreciará que las composiciones de la presente invención pueden ser también capaces de prevenir la agregación de células (es decir, la agregación de células no a una superficie).

La presente invención contempla la prevención de la adhesión celular a una gran variedad de superficies, incluyendo tejidos, fibras, espumas, películas, hormigones, materiales de albañilería, vidrio, metales, plásticos, polímeros, y similares.

De acuerdo con una realización, la superficie está comprendida en un dispositivo que es susceptible de formación de biopelículas. Los dispositivos ejemplares cuyas superficies son contempladas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cascos de navíos, superficies de automóviles, superficies de aviones, membranas, filtros y equipos industriales.

La superficie puede estar también comprendida en dispositivos, instrumentos e implantes médicos. Los ejemplos de dichos dispositivos, instrumentos e implantes médicos incluyen cualquier objeto que pueda ser implantado temporal o permanentemente en un organismo mamífero, tal como un ser humano. Los dispositivos, instrumentos e implantes médicos representativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos, injertos vasculares, estents y articulaciones protésicas. Más adelante se describen métodos para prevenir la fijación de células a dispositivos médicos y otros ejemplos de los mismos.

Como se mencionó, el método de la presente invención se efectúa poniendo la célula en contacto con una composición de un organismo capaz de prevenir la adhesión de la célula a una superficie.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "puesta en contacto" se refiere a la colocación de las composiciones de la presente invención para que estén en contacto directo o indirecto con las células adhesivas de tal modo que el agente activo comprendido dentro sea capaz de prevenir la adhesión de las células. De este modo, la presente invención contempla aplicar las composiciones de la presente invención a una superficie deseable y/o directamente a las células adhesivas.

La puesta de las composiciones en contacto con una superficie puede ser efectuada utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pulverización, extensión, humectación, inmersión, baño, pintura, soldadura ultrasónica, soldadura, enlace y adherencia. Las composiciones de la presente invención pueden ser fijadas como monocapas o como capas múltiples.

De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, los péptidos anteriores pueden ser opcionalmente alterados con objeto de formar compuestos análogos no peptídicos, incluyendo, pero sin limitarse a, la sustitución de uno o más enlaces por enlaces menos lábiles, la ciclación (descrita más adelante con mayor detalle) y similares. Adicional o alternativamente, se puede convertir opcionalmente un péptido en una molécula pequeña por medio de modelado informático, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud PCT n° WO/2007/147098, incorporada a esta memoria por referencia como si estuviera totalmente expuesta.

Un "grupo orgánico peptidomimético" puede sustituir opcionalmente a restos de aminoácido de un péptido de acuerdo con la presente invención, como sustituciones tanto conservativas como no conservativas. Estos grupos son también denominados "aminoácidos no naturales" y pueden sustituir opcionalmente a restos de aminoácido o a aminoácidos o actuar como grupos espaciadores dentro de los péptidos en lugar de aminoácidos suprimidos. Los grupos orgánicos peptidomiméticos tienen opcional y preferiblemente unas propiedades estéricas, electrónicas o de configuración similares a las del aminoácido sustituido, y dichos compuestos peptidomiméticos se utilizan para sustituir a aminoácidos en las posiciones esenciales y son considerados sustituciones conservativas. Sin embargo, no se requieren necesariamente dichas similitudes. La única restricción al uso de compuestos peptidomiméticos es que la composición conserve al menos sustancialmente su actividad fisiológica en comparación con el péptido nativo de acuerdo con la presente invención.

Los compuestos peptidomiméticos pueden ser opcionalmente utilizados para inhibir la degradación de los péptidos por procesos enzimáticos u otros procesos degradativos. Los compuestos peptidomiméticos pueden ser opcional y preferiblemente producidos mediante técnicas sintéticas orgánicas. Los ejemplos no restrictivos de compuestos peptidomiméticos adecuados incluyen los D-aminoácidos de los correspondientes L-aminoácidos, tetrazol [Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110: 5875-5880 (1988)]; isómeros de enlaces amida [Jones et al., Tetrahedron Lett. 29: 3853-3856 (1988)]; y ácido LL-3-amino-2 propenidona-6-carboxílico (LL Acp) [Kemp et al., J. Org. Chem. 50: 5834-5838 (1985)]. Se muestran compuestos análogos similares en Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5081-5082 (1988), así como en Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5057-5060 (1988); Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 4935-4938 (1988); y Kemp et al., J. Org. Chem. 54: 109-115 (1987). Se muestran otros compuestos peptidomiméticos adecuados pero ejemplares en Nagai y Sato, Tetrahedron Lett. 26: 647-650 (1985); Di Maio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1687 (1985); Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30: 2317 (1989); Olson et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 323-333 (1990); y Garvey et al., J. Org. Chem. 56: 436 (1990). Otros compuestos peptidomiméticos ejemplares adecuados incluyen hydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoleína-3-carboxilato [Miyake et al., J. Takeda Res. Labs 43: 53-76 (1989)]; 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoleína-3-carboxilato [Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 2275-2283 (1991)]; ácido histidina-isoquinolona-carboxílico (HIC) [Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991)]; y (2S, 3S)-metil-fenilalanina, (2S, 3R)-metil-fenilalanina, (2R, 3S)-metil-fenilalanina y (2R, 3R)-metil-fenilalanina [Kazmierski y Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)].

Los aminoácidos no naturales, ejemplares e ilustrativos pero no restrictivos incluyen beta-aminoácidos (beta3 y beta2), homoaminoácidos, aminoácidos cíclicos, aminoácidos aromáticos, derivados de Pro y Pyr, derivados de alanina 3- sustituida, derivados de glicocola, derivados de Phe y Tyr con sustitución anular, aminoácidos de núcleo lineal y diaminoácidos. Son asequibles de una diversidad de proveedores, tal como, por ejemplo, de Sigma-Aldrich (EE.UU.).

En la presente invención, cualquier parte de un péptido puede opcionalmente ser químicamente modificada, es decir, cambiada por adición de grupos funcionales. La modificación puede ser llevada opcionalmente a cabo durante la síntesis de la molécula si se sigue un proceso sintético químico, por ejemplo, añadiendo un aminoácido químicamente modificado. Sin embargo, también es posible la modificación química de un aminoácido cuando ya está presente en la molécula (modificación "in situ").

El aminoácido de cualquiera de las regiones secuenciales de la molécula puede ser opcionalmente modificado de acuerdo con cualquiera de los tipos ejemplares de modificación siguientes (en el péptido conceptualmente considerado como "químicamente modificado"). Los tipos ejemplares de modificación no restrictivos incluyen carboximetilación, acilación, fosforilación, glicosilación, y acilación con ácidos grasos. Se pueden utilizar opcionalmente enlaces éter para unir el hidroxilo de la serina o la treonina con el hidroxilo de un azúcar. Se pueden utilizar opcionalmente enlaces amida para unir los grupos carboxilo del glutamato o el aspartato con un grupo amino de un azúcar [Garg y Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, volumen 43, Academic Press (1985); Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26: 294-308 (1987)]. También se pueden formar opcionalmente enlaces acetal y cetel entre aminoácidos y carbohidratos. Se pueden preparar opcionalmente derivados acílicos de ácidos grasos, por ejemplo, por acilación de un grupo amino libre (por ejemplo, de lisina) [Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, redactado por Rivier y Marshal, ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)].

Como se emplea en esta memoria, la expresión "modificación química", cuando hace referencia a un péptido de acuerdo con la presente invención, se refiere a un péptido en que al menos uno de sus restos de aminoácido es modificado, sea por procesos naturales, tales como las modificaciones de procesamiento u otras modificaciones postraduccionales, o sea por técnicas de modificación química que son bien conocidas en este campo técnico. Los ejemplos de las numerosas modificaciones conocidas incluyen típicamente, pero no se limitan a: acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, fijación covalente de un lípido o un derivado lipídico, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación, y cualquier proceso similar.

Como se mencionó, los dispositivos médicos y los implantes resultan comúnmente infectados por bacterias oportunistas y otros microorganismos infecciosos (por ejemplo, hongos), necesiándose en algunos casos la eliminación de los dispositivos implantables. Dichas infecciones pueden también dar lugar a enfermedades, estancias prolongadas en hospitales e incluso la muerte. Por lo tanto, es muy deseable la prevención de la formación de biopelículas y de la infección de dispositivos médicos.

De este modo, la presente invención también contempla dispositivos médicos a los que están fijadas las composiciones anteriormente descritas.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "dispositivo médico" se refiere a cualquier implante, instrumento, aparato, herramienta, máquina o dispositivo, o cualquier otro objeto similar o relacionado (incluyendo cualquier componente o accesorio), que está destinado a ser utilizado en el diagnóstico, el tratamiento, la curación o la prevención de una enfermedad u otros estados. Dicho dispositivo médico está destinado a ser empleado en el hombre u otros animales, y se espera que afecte a la estructura o cualquier función del cuerpo. Dicho dispositivo médico no alcanza sus previstas finalidades primarias a través de una acción química y no depende de ser metabolizado para la consecución de sus previstas finalidades primarias.

Como se emplea en esta memoria, el término "implante" se refiere a cualquier objeto destinado a la colocación en un cuerpo humano, que no es un tejido vivo. El implante puede ser temporal o permanente. Un implante puede ser un artículo que comprenda componentes artificiales, tales como catéteres y marcapasos. Los implantes también pueden incluir objetos de procedencia natural que hayan sido procesados para que sus tejidos vivos resulten desvitalizados. Como un ejemplo, los injertos óseos que han sido procesados para que sus células vivas sean eliminadas (desprovistos de células), pero de modo que se conserve su forma para que sirva como molde para el crecimiento hacia dentro de hueso de un huésped. Como otro ejemplo, se puede procesar coral de origen natural para obtener preparaciones de hidroxiapatita que puedan ser aplicadas al cuerpo para ciertas terapias ortopédicas y dentales.

Por lo tanto, la presente invención prevé el revestimiento de dispositivos médicos con las composiciones de la presente invención para evitar la adherencia de células a los mismos con objeto de reducir/eliminar cualesquier posibles agregación celular y formación de biopelícula que se sabe que ocurren después de la implantación. Las infecciones relacionadas con dispositivos son normalmente el resultado de la introducción de microorganismos, principalmente bacterias, durante el procedimiento de inserción o implantación del dispositivo, o de la fijación de organismos de transmisión sanguínea al dispositivo recién insertado y su subsiguiente propagación sobre su superficie. Por lo tanto, el revestimiento del dispositivo médico con las composiciones de la presente invención inhibirá la formación de biopelículas de una o más especies microbianas, evitará infecciones relacionadas con el dispositivo médico y, en consecuencia, reducirá la necesidad de un tratamiento con antibióticos o la extracción del dispositivo médico del sujeto.

Los dispositivos médicos que pueden ser revestidos de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, vasos sanguíneos artificiales, catéteres y otros dispositivos para la extracción o el suministro de fluidos a pacientes, corazones artificiales, riñones artificiales, clavos ortopédicos, articulaciones protésicas, placas e implantes; catéteres y otros tubos (incluyendo tubos urológicos y biliares, tubos endotraqueales, catéteres venosos centrales periféricamente insertables, catéteres para diálisis, catéteres venosos centrales tunelizados de larga duración, catéteres venosos periféricos, catéteres venosos centrales de corta duración, catéteres arteriales, catéteres pulmonares, catéteres Swan-Ganz, catéteres urinarios y catéteres peritoneales), dispositivos urinarios (incluyendo dispositivos urinarios de larga duración, dispositivos urinarios de unión a tejido, esfínteres urinarios artificiales y dilatadores urinarios), derivaciones ("shunts") (incluyendo derivaciones ventriculares y arteriovenosas); prótesis (incluyendo implantes de mama, prótesis penianas, prótesis de injerto vascular, dispositivos para reparación de aneurismas, válvulas cardíacas mecánicas, articulaciones artificiales, laringes artificiales e implantes otológicos), dispositivos anastomóticos, puertos para catéteres vasculares, estents vasculares, grapas, dispositivos embólicos, tubos para drenaje de heridas, lentes oculares, implantes dentales, derivaciones para hidrocefalia, marcapasos y desfibriladores implantables, conectores sin aguja, prótesis de voz y similares.

Otra posible aplicación de las composiciones de la presente invención es el revestimiento de superficies halladas en los entornos médico y dental. Dichas superficies incluyen los aspectos interno y externo de diversos instrumentos y dispositivos, sean desechables o estén destinados a un uso repetido. Dichas superficies incluyen el espectro completo de artículos adaptados para uso médico, incluyendo, sin limitación, escalpelos, agujas, tijeras y otros dispositivos usados en procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos invasivos, y filtros sanguíneos. Otros ejemplos resultarán en seguida evidentes a los profesionales de estas técnicas.

Las superficies halladas en el entorno médico también incluyen los aspectos interno y externo de piezas del equipo médico y las herramientas médicas usadas o llevadas por el personal en el marco de la asistencia sanitaria. Dichas superficies pueden incluir superficies diseñadas como barreras biológicas para organismos infecciosos en marcos médicos, tales como guantes, delantales y pantallas faciales. Los materiales comúnmente utilizados para las barreras biológicas son materiales termoplásticos o polímeros tales como polietileno, Dacron, nailon, poliésteres, politetrafluoroetileno, poliuretano, látex, silicona y vinilo. Otras superficies pueden incluir encimeras y elementos fijos en zonas empleadas para procedimientos médicos o para preparar aparatos, tubos y recipientes médicos usados en tratamientos respiratorios, incluyendo las administraciones de oxígeno, de fármacos solubilizados en nebulizadores y de agentes anestésicos. Otras de tales superficies pueden incluir asas y cables para un equipo médico o dental no destinado a ser estéril. Además, dichas superficies pueden incluir aquellas superficies externas no estériles de tubos y otros aparatos hallados en zonas donde se encuentran comúnmente sangre o fluidos corporales u otros biomateriales peligrosos.

Las composiciones de la presente invención pueden ser empleadas sobre la superficie de, o dentro de, estos dispositivos médicos para proporcionar una protección de larga duración frente a la colonización de microorganismos y reducir la incidencia de infecciones relacionadas con dispositivos. Estas composiciones pueden ser también incorporadas a revestimientos para dispositivos médicos en combinación con un agente antimicrobiano (por ejemplo, un agente antibiótico). Dicha combinación matará o inhibirá suficientemente las bacterias colonizadoras iniciales y evitará infecciones relacionadas con dispositivos con tal de que la sustancia se presente en una concentración inhibitoria en la interfase dispositivo-microbio.

Las composiciones de la presente invención se pueden incorporar directamente a la matriz polimérica del dispositivo médico en la fase de síntesis del polímero o en la fase de fabricación del dispositivo. Las composiciones se pueden también fijar covalentemente al polímero del dispositivo médico. Estos y muchos otros métodos para revestir dispositivos médicos resultan evidentes a quien tiene una experiencia normal en la técnica.

Superficies adicionales que pueden ser tratadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen los aspectos interno y externo de aquellos artículos implicados en la purificación de agua, el almacenamiento de agua y el suministro de agua, y aquellos artículos implicados en el procesamiento de alimentos. De este modo, la presente invención prevé el revestimiento de una superficie sólida de un recipiente de comida o bebida para prolongar el tiempo de conservación de sus contenidos.

Las superficies relacionadas con la salud pueden incluir también los aspectos interno y externo de aquellos artículos domésticos implicados en proporcionar nutrición, saneamiento o prevención de enfermedades. De este modo, las composiciones de la presente invención pueden ser usadas para la eliminación de microorganismos causantes de enfermedades de las superficies externas. Éstas pueden incluir, por ejemplo, equipos de procesamiento de alimentos para uso doméstico, materiales para el cuidado de los niños, tampones, jabón, detergentes, productos para la salud y el cuidado de la piel, productos de limpieza domésticos y tazas de retrete.

La superficie también puede ser artículos de laboratorio, incluyendo, pero sin limitarse a, un portaobjetos microscópico, una campana de cultivo, una placa Petri o cualquier otro tipo adecuado de vasija o recipiente para cultivo tisular conocidos en la técnica.

Los inventores de esta solicitud también prevén el uso de las composiciones de la presente invención como agentes antiincrustantes.

Como se emplea en esta memoria, la expresión "agentes antiincrustantes" se refiere a los compuestos usados para proteger las superficies subacuáticas de la fijación de organismos de una sola célula. Estos organismos de una sola célula incluyen microorganismos tales como bacterias y hongos.

Estas superficies subacuáticas incluyen cualquier superficie sumergida en agua, incluyendo cascos de navíos/barcos (es decir, el cuerpo o armazón de un navío o un barco), vehículos de sumersión, accesorios para navegación, pantallas, redes, construcciones, plataformas flotantes o emplazadas en el litoral (por ejemplo, dársenas), boyas, equipos de señalización y artículos que entran en contacto con agua marina o agua salada. Otras superficies subacuáticas incluyen estructuras expuestas al agua marina, incluyendo pilotes, marcadores marinos, medios de transmisión bajo el mar tales como cableados y tuberías, redes para la pesca, mamparos, torres de refrigeración, y cualquier dispositivo o estructura que funcione sumergida.

Las composiciones de la presente invención pueden ser incorporadas a revestimientos marinos para limitar la indeseable incrustación marina. De este modo, los agentes antiincrustantes de la presente invención pueden ser formulados para que no contengan materiales tóxicos (tales como metales pesados) y aún conserven su eficacia. La pintura antiincrustante de la presente invención puede contener además aglutinante(s), pigmento(s), disolvente(s) y aditivo(s).

Los ejemplos de disolventes que se pueden emplear incluyen hidrocarburos aromáticos tales como xileno y tolueno; hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; ésteres tales como acetato de etilo y acetato de butilo; amidas tales como N-metilpirrolidona y N,N-dimetilformamida; alcoholes tales como alcohol isopropílico y alcohol butílico; éteres tales como dioxano, THF y éter dietílico; y cetonas tales como metil-etil-cetona, metil-isobutil-cetona y metil-isoamil-cetona. Los disolventes se pueden usar solos o en combinación.

Los ejemplos de aglutinantes que se pueden emplear incluyen resinas alquídicas, emulsiones acrílicas o vinílicas, resinas de poliuretano, resinas epoxídicas, resinas basadas en silicona, resinas acrílicas, resinas basadas en silicatos inorgánicos, resinas vinílicas, particularmente un copolímero de cloruro de vinilo/acetato de vinilo, y colofonia.

Los ejemplos de pigmentos que se pueden emplear incluyen dióxido de titanio, óxido cuproso, óxido de hierro, talco, escamas de aluminio, escamas de mica, óxido férrico, tiocianato cuproso, óxido de zinc, acetato-metaarseniato cúprico, cromato de zinc, dimetilditiocarbamato de zinc, etileno-bis(ditiocarbamato) de zinc y dietilditiocarbamato de zinc.

Los ejemplos de aditivos que se pueden incorporar a la composición de revestimiento incluyen agentes

deshumidificadores, agentes humectantes/dispersivos, agentes anti-sedimentación de partículas, agentes anti-formación de piel durante el almacenamiento, agentes de secado/curado, agentes anti-deterioro y aditivos ordinariamente empleados en composiciones de revestimiento como estabilizantes y agentes antiespumantes. Además, cualquier antibiótico que sea relativamente insoluble en agua marina puede ser usado con una pintura marina antiincrustante.

En la Patente de EE.UU. nº 4.678.512, la Patente de EE.UU. nº 4.286.988, la Patente de EE.UU. nº 4.675.051, la Patente de EE.UU. nº 4.865.909 y la Patente de EE.UU. nº 5.143.545 se explican en detalle métodos para preparar pinturas marinas antiincrustantes.

Las composiciones de la presente invención pueden ser también empleadas para proporcionar propiedades antibacterianas en cosmética, para prevenir que el producto se eche a perder.

Las composiciones pueden ser además empleadas para proporcionar un efecto antibacteriano a la boca, los dientes y las encías, tal como mediante su incorporación a una pasta dentífrica, un colutorio o un chicle. Tomadas en conjunto, las presentes enseñanzas representan una gran variedad de nuevos agentes antiadhesivos aislados de organismos tales como organismos acuáticos y musgos. El amplio espectro de los efectos antiadhesión de estos agentes (por ejemplo, la inhibición de la adhesión de bacterias Gram positivas y Gram negativas) junto con su capacidad para afectar a las iniciales fases vulnerables de la formación de biopelículas microbianas, hacen de estos agentes excelentes candidatos a agentes antibiopelículas. Además, los agentes antiadhesivos descritos en esta memoria son clonables, lo que permite modificaciones y producción masiva de los mismos. Además, la estabilidad de estos agentes (es decir, su resistencia a condiciones ambientales) les hace adecuados para una diversa colección de aplicaciones.

Objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención resultarán evidentes a quien tiene una experiencia normal en la técnica tras el examen de los ejemplos siguientes, que no están destinados a ser restrictivos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se describieron anteriormente en esta memoria y como se reivindican más adelante en la sección Reivindicaciones, encuentra respaldo experimental en los ejemplos siguientes.

En general, la nomenclatura usada en esta memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de DNA recombinante. Tales técnicas se explican con detalle en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook et al. (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", volúmenes I-III, redactado por R. M. Ausubel (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (redactores), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", volúmenes 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como las expuestas en las Patentes de EE.UU. números 4.666.828, 4.683.202, 4.801.531, 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III, redactado por J. E. Cellis (1994); "Current Protocols in Immunology", volúmenes I-III, redactado por J. E. Coligan (1994); Stites et al. (redactores), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut (1994); y Mishell y Shiigi (redactores), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980). En las bibliografías científica y de patentes se describen ampliamente inmunoensayos asequibles; véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 3.791.932, 3.839.153, 3.850.752, 3.850.578, 3.853.987, 3.867.517, 3.879.262, 3.901.654, 3.935.074, 3.984.533, 3.996.345, 4.034.074, 4.098.876, 4.879.219, 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis", redactado por M. J. Gait (1984); "Nucleic Acid Hybridization", redactado por B. D. Hames y S. J. Higgins (1985); "Transcription and Translation", redactado por B. D. Hames y S. J. Higgins (1984); "Animal Cell Culture", redactado por R. I. Freshney (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning", B. Perbal (1984), y "Methods in Enzymology", volúmenes 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, California (1990); y Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSHL Press (1996); todos los cuales se incorporan por referencia como si se expusieran completamente en esta memoria. A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos de dichas referencias son bien conocidos en la técnica, y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplos

Se hace ahora referencia a los ejemplos siguientes, que junto con la descripción anterior ilustran la invención de un modo no restrictivo.

Ejemplo 1: Prevención de la fijación bacteriana por grZ-28C

El péptido sintético grZ-28C [CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNK] proporcionó una prevención de la fijación de *Pseudomonas aeruginosa* de aproximadamente el 50% en tres concentraciones: 50, 5 y 0,5 µg/ml (Figura 1). La actividad era similar a la del AbacZ17C, un péptido basado en la región activa de la citotoxina de anémona. Se sintetizó Abac10C, que fue utilizado como un péptido testigo negativo, basándose en la secuencia N-terminal de

Abac17C, sin el resto activo [CMFSVFPDYC].

En la Figura 2 se demuestra que no tiene lugar efecto de crecimiento alguno en presencia de los péptidos de ensayo.

5 En la Figura 3 se muestra la actividad anti-adherencia con los péptidos grZ35 cyc y grZ28C, basados en la secuencia de aminoácidos de GPCR 137b, sobre *P. aeruginosa*. Para el péptido grZ35 cyc, se sintetizó la secuencia peptídica SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNQLGDAGYV, que representa la región extracelular, restos 259-292, con dos cisteínas en los extremos C y N y un puente S-S. Para el péptido grZ28C, se sintetizó la secuencia peptídica SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN, que representa la región extracelular, restos 259-284, con dos cisteínas en los extremos C y N.

10 En la Figura 4 se muestran los efectos de los péptidos grZ35 cyc y grZ28C sobre el crecimiento de *P. aeruginosa*, que indican que el crecimiento de las bacterias no resultó inhibido. Este resultado es importante en cuanto a que los péptidos de la presente invención muestran deseablemente poca o ninguna inhibición del crecimiento de bacterias.

Aunque la invención ha sido descrita con respecto a un número limitado de realizaciones, se apreciará que se pueden realizar muchas variaciones, modificaciones y otras aplicaciones de la invención.

15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido ciclado que tiene la actividad de prevenir la formación de biopelículas y que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 FDYDWY (ID. SEC. nº 2),
 SFDYDWY (ID. SEC. nº 7),
 SFDYDWYN (ID. SEC. nº 8),
 HSFYDWYN (ID. SEC. nº 9),
 HSFYDWYNV (ID. SEC. nº 10),
 VHSFYDWYNV (ID. SEC. nº 11),
 10 VHSFYDWYNVS (ID. SEC. nº 12),
 SVHSFYDWYNVS (ID. SEC. nº 13),
 SVHSFYDWYNVSD (ID. SEC. nº 14),
 KSVHSFYDWYNVSD (ID. SEC. nº 15),
 KSVHSFYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 16),
 15 NKSVMHSFYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 17),
 NKSVMHSFYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 18),
 QNKSVMHSFYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 19),
 QNKSVMHSFYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 20),
 SQNKSVMHSFYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 21),
 20 SQNKSVMHSFYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 22),
 FSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 23),
 FSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 24),
 SFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 25),
 SFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3),
 25 CSFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 26), y
 CSFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKNC (ID. SEC. nº 1),

o combinaciones de las mismas.

2. Una composición que comprende un péptido ciclado aislado de una fuente animal, péptido que tiene la actividad de prevenir la formación de biopelículas, en donde dicho péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 FDYDWY (ID. SEC. nº 2),
 SFDYDWY (ID. SEC. nº 7),
 SFDYDWYN (ID. SEC. nº 8),
 HSFYDWYN (ID. SEC. nº 9),
 35 HSFYDWYNV (ID. SEC. nº 10),
 VHSFYDWYNV (ID. SEC. nº 11),
 VHSFYDWYNVS (ID. SEC. nº 12),
 SVHSFYDWYNVS (ID. SEC. nº 13),
 SVHSFYDWYNVSD (ID. SEC. nº 14),
 40 KSVHSFYDWYNVSD (ID. SEC. nº 15),
 KSVHSFYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 16),
 NKSVMHSFYDWYNVSDQ (ID. SEC. nº 17),
 NKSVMHSFYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 18),
 QNKSVMHSFYDWYNVSDQA (ID. SEC. nº 19),
 45 QNKSVMHSFYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 20),
 SQNKSVMHSFYDWYNVSDQAD (ID. SEC. nº 21),
 SQNKSVMHSFYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 22),
 FSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADL (ID. SEC. nº 23),
 FSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 24),
 50 SFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLK (ID. SEC. nº 25),
 SFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 3),
 CSFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 21) y
 CSFSQNKSVMHSFYDWYNVSDQADLKNC (ID. SEC. nº 1),

o una combinación de las mismas.

- 55 3. El péptido de la reivindicación 1, en donde dicho péptido está desprovisto de actividad citotóxica o citostática; o la composición de la reivindicación 2, en donde dicho péptido está desprovisto de actividad citotóxica o citostática.

4. El péptido de la reivindicación 1 o 3, en donde dicho péptido es además capaz de inhibir la agregación de células; o la composición de la reivindicación 2 o 3, en donde dicho péptido es además capaz de inhibir la agregación de células.

5. Un dispositivo médico que comprende el péptido de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 2 fijados a él.
6. El dispositivo médico de la reivindicación 5, en donde el dispositivo médico es un dispositivo intracorpóreo o en donde el dispositivo médico es un dispositivo extracorpóreo.
- 5 7. Un método de tratamiento del agua para prevenir o reducir la formación de biopelículas o la incrustación de un filtro, que comprende tratar el agua con cualquiera de los péptidos de cualquiera de las Reivindicaciones 1, 3 y 4 o con composiciones de cualquiera de las Reivindicaciones 2, 3 y 4.
- 10 8. Un método *in vitro* para prevenir o reducir la formación de biopelículas en un medio fluido, que comprende tratar el medio fluido con cualquiera de los péptidos de cualquiera de las Reivindicaciones 1, 3 y 4 o con composiciones de cualquiera de las Reivindicaciones 2, 3 y 4.
9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde dicho agua o medio fluido tratados se aplica a un filtro para ósmosis inversa.
- 15 10. Un método *in vitro* para prevenir la adhesión de un organismo de una sola célula a una superficie, método que comprende poner la célula en contacto con una composición que comprende un péptido ciclado aislado de una fuente animal no humana, péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 FDYDWY (ID. SEC. nº 1),
 SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN (ID. SEC. nº 21) y
 CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNC (ID. SEC. nº 23).
11. El método de la reivindicación 10, en donde dicho péptido está desprovisto de actividad citotóxica o citostática.
- 20 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde dicho péptido es además capaz de inhibir la agregación de células.
13. El método de la reivindicación 10, en donde dicho organismo de una sola célula está comprendido en una biopelícula.
- 25 14. El método de la reivindicación 10, en donde dicho organismo de una sola célula es seleccionado del grupo que consiste en unas bacterias, un hongo, unos protozoos y unas arqueas, en donde dicho hongo puede comprender una levadura.
15. El método de la reivindicación 10, en donde dicha superficie es seleccionada del grupo que consiste en un tejido, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, un material de albañilería, un vidrio, un metal y un plástico.
- 30 16. El método de la reivindicación 10, en donde la superficie está comprendida en un dispositivo que es susceptible de formación de biopelículas.
17. El método de la reivindicación 16, en donde dicho dispositivo es un casco de navío, una superficie de automóvil, una superficie de avión, una membrana, un filtro o un equipo industrial.
18. El método de la reivindicación 10, en donde dicho animal es un vertebrado, en donde dicho animal es seleccionado del grupo que consiste en un pez, un anfibio, un ave, un reptil y un mamífero.

35

Figura 1

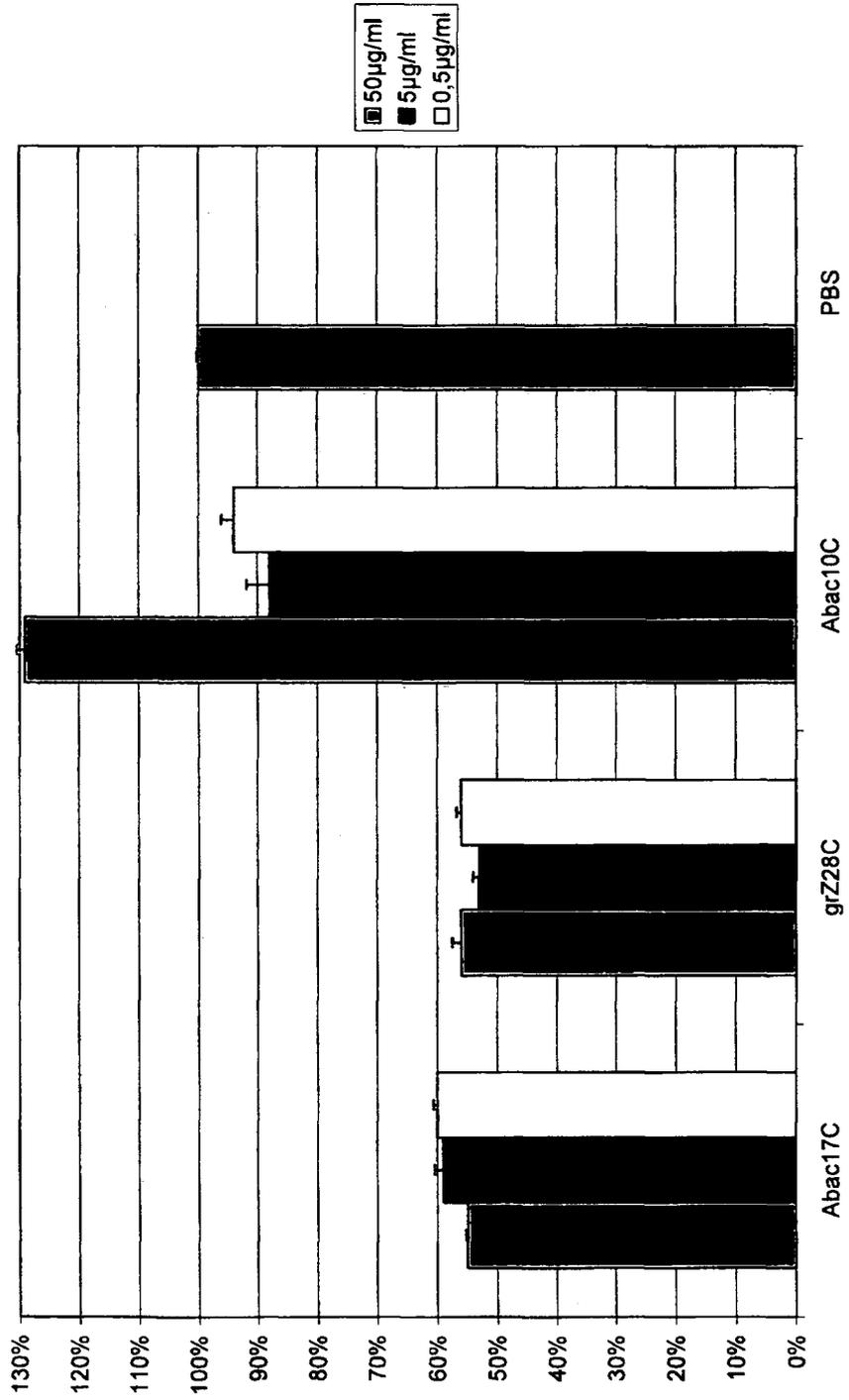
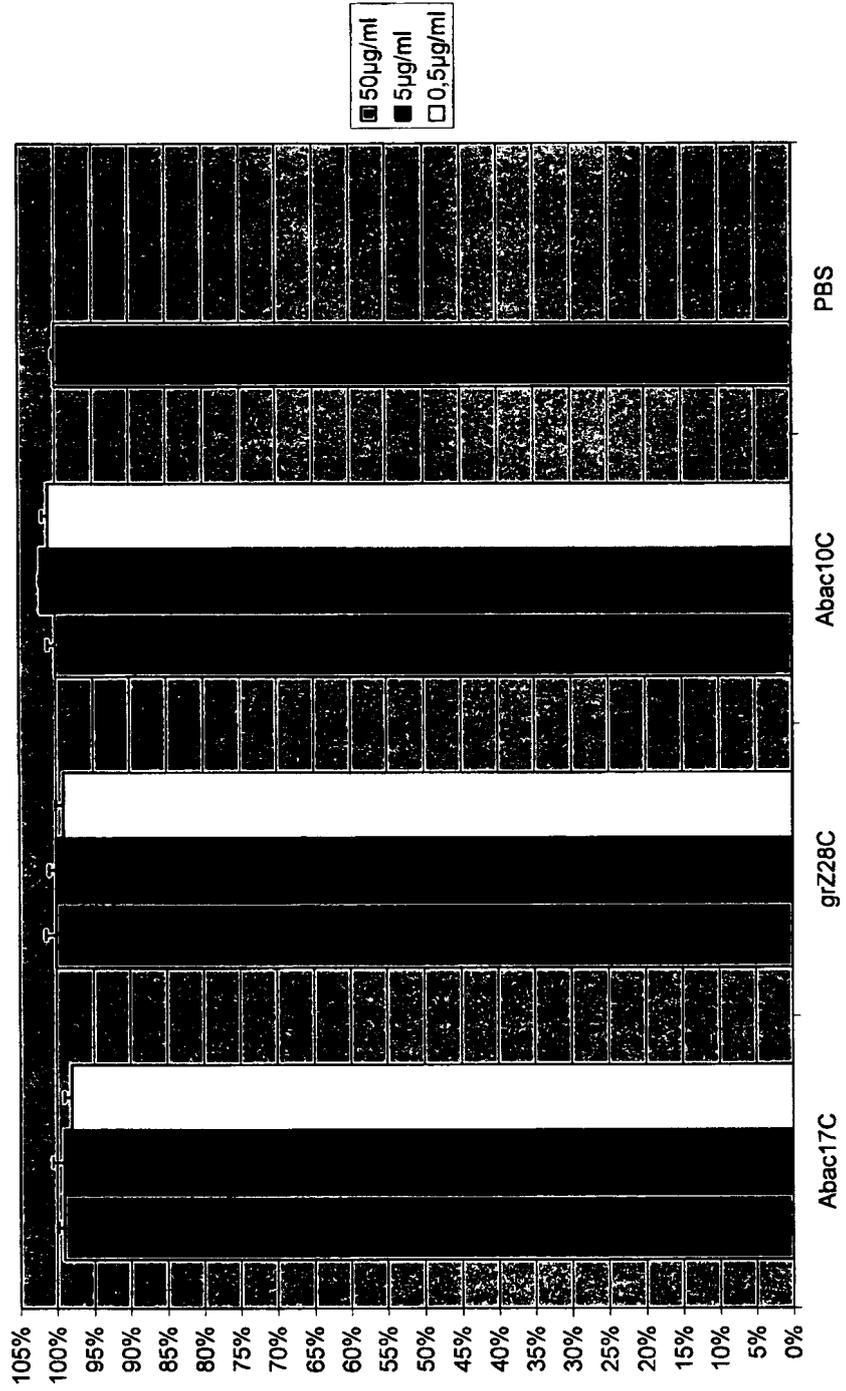


Figura 2



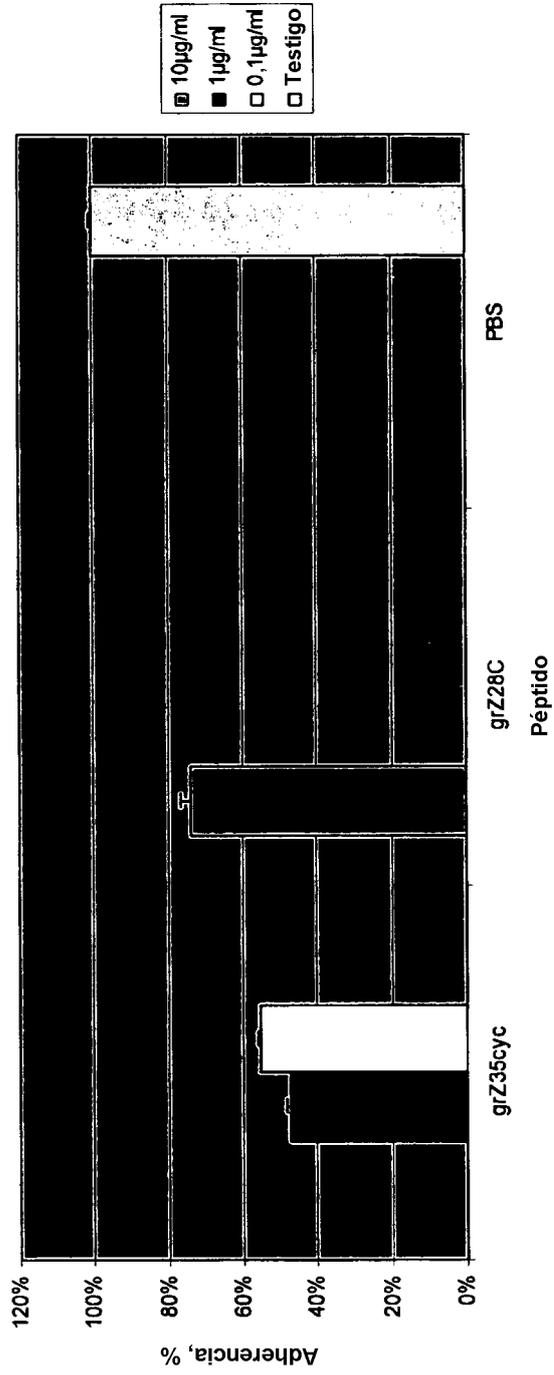


Figura 3

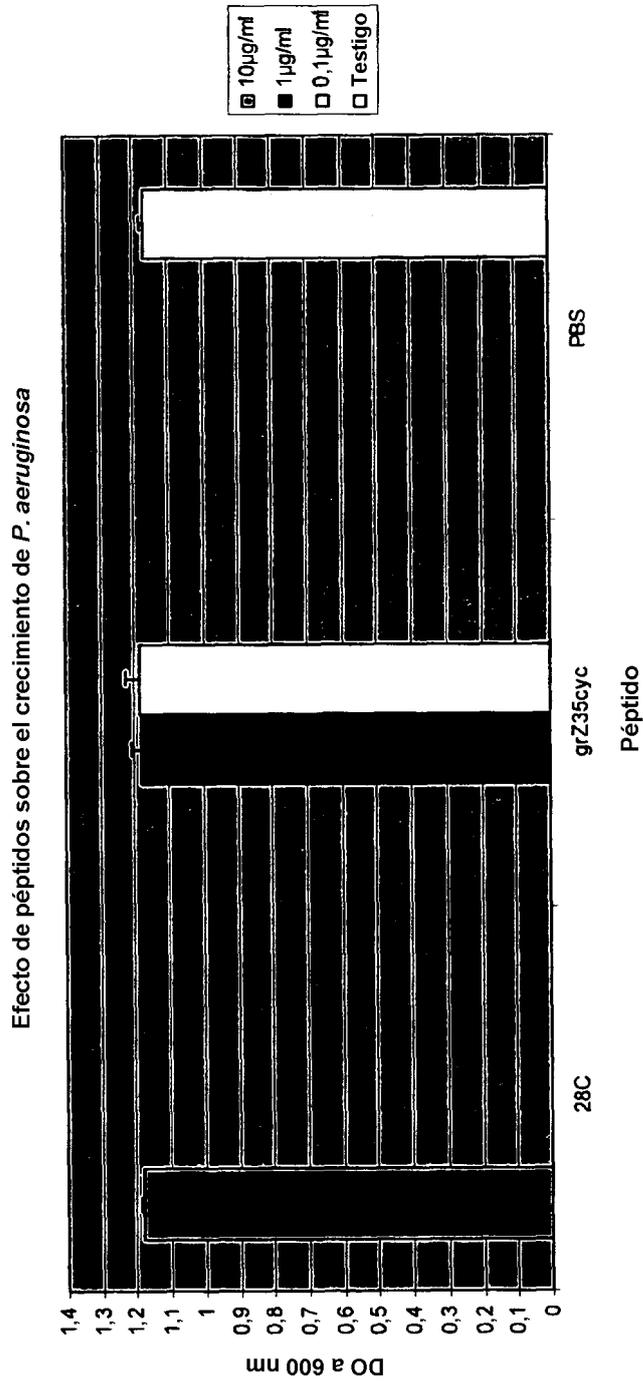


Figura 4