

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 376**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)
A61L 29/16 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011 PCT/EP2011/052062**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11098579**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011 E 11703001 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2533801**

54 Título: **Compuestos de desoxirribonucleasa bacteriana y métodos para la disrupción y prevención de biopelículas**

30 Prioridad:

12.02.2010 GB 201002396

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE
(100.0%)
King's Gate
Newcastle Upon Tyne NE1 7RU, GB**

72 Inventor/es:

**BURGESS, JAMES GRANT;
HALL, MICHAEL JOHN y
NIJLAND, REINDERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 645 376 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

Compuestos de desoxirribonucleasa bacteriana y métodos para la disrupción y prevención de biopelículas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a composiciones y métodos para la disrupción y prevención de biopelículas. Esta invención se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos para la disrupción de biopelículas y la prevención de biopelículas en pacientes. La invención se refiere también a composiciones bioincrustantes y métodos para la disrupción de la biopelícula y la prevención de la biopelícula sobre superficies. La invención también se refiere a la eliminación del material biológico de las superficies.

Antecedentes

10 Los microorganismos viven generalmente unidos a superficies en muchos entornos naturales, industriales y médicos, encapsulados por sustancias extracelulares que incluyen biopolímeros y macromoléculas. La capa resultante del microorganismo encapsulado en lodo se denomina biopelícula. Las biopelículas son el modo predominante de crecimiento de bacterias en el medio ambiente natural, y las bacterias que crecen en biopelículas muestran propiedades fisiológicas distintas. Comparado con sus homólogos cultivados planctónicamente, las bacterias en una biopelícula son más resistentes a antibióticos, irradiación UV, a los detergentes y a la respuesta inmune del huésped (Gristina y colaboradores. 1988. Journal of the American Medical Association, 259: 870-874; Stewart. 1994 Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 38(5): 1052-1058; Costerton y colaboradores. 1995. Annu. Rev. Microbiol., 49: 711-745; Maira-Litran y colaboradores; 2000. Journal of Applied Microbiology, 88: 243-247). Una biopelícula puede incluir uno o más microorganismos, incluyendo bacterias gram-positivo y gram-negativo, algas, protozoos, y/o hongos y virus de levadura o filamentosos y/o bacteriófagos. Ejemplos de biopelículas problemáticas son la placa dental, infecciones en implantes médicos, pero también el ensuciamiento inicial en los cascos de los buques (Satuito y colaboradores. 1997. Hydrobiologia, 358: 275-280). Las biopelículas se atribuyen a la patogénesis de muchas infecciones en seres humanos y son un problema significativo en la industria en términos de bioincrustación de las superficies expuestas donde la colonización de la biopelícula puede formar el componente base de un ecosistema localizado que puede interrumpir e interferir con procesos o componentes industriales. Se requieren nuevas estrategias para inhibir la formación de la biopelícula, dispersar la biopelícula existente y poner en movimiento bacterias en una biopelícula para volver al estado planctónico sensible a los antibióticos.

Muchos tipos de microbios crecen naturalmente en un contexto de biopelícula, tal como bacteria, hongo, alga etc.

30 Se sabe en la técnica que las biopelículas pueden tener, como un componente, DNA (denominado DNA extracelular o eDNA) aunque su función allí, permanece desconocida. Ciertos grupos han tratado de emplear enzimas nucleasas para interrumpir las biopelículas. Sin embargo, el uso de nucleasas de la técnica anterior en este respecto se ha limitado a DNasa humana y DNasa I, una enzima purificada a partir de páncreas bovino y vendido comercialmente.

35 Por ejemplo, el documento de Patente WO 06/017816 describe composiciones y métodos para la inhibición de la formación de biopelículas o la reducción de las biopelículas existentes o en desarrollo en un paciente. Los métodos incluyen administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar biopelículas un compuesto o formulación que inhibe la formación o polimerización de microfilamentos de actina o depolimeriza microfilamentos de actina en o próxima al sitio de formación de la biopelícula. Tal compuesto se puede administrar en combinación con un compuesto o formulación que inhiba la acumulación o actividad de células que probablemente sufran necrosis en o próxima al sitio de formación de la biopelícula (por ejemplo, neutrófilos). Los métodos y composiciones pueden incluir además el uso de compuestos anti-DNA y/o antimucina.

40 El documento de Patente WO 2009/121183 describe una composición anti-biopelícula que comprende dos o más agentes seleccionados del grupo que consiste en DispersinaB (RTM), 5-Fluorouracilo, Desoxirribonucleasa I (DNasa I bovina) y Proteínasa K para prevenir el crecimiento y proliferación de microorganismos embebidos en la biopelícula.

45 Estudios previos de la técnica han demostrado que la DNasa I bovina previene tanto la formación de la biopelícula como (hasta cierto punto) la disolución de las colonias de biopelícula existentes. Se concluyó que el DNA extracelular es necesario para el establecimiento inicial de biopelículas de *P. aeruginosa*, que es reforzado después por otras sustancias tales como exopolisacáridos y proteínas (Whitchurch y colaboradores. 2002. Science, 295: 1487).

50 Se demostró que la DNasa1L2 humana recombinante purificada suprime la formación de la biopelícula por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Eckhart y colaboradores. 2007. British Journal of Dermatology, 156(6): 1342-1345; Tetz y colaboradores. 2009. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 53(3): 1204-1209).

Se ha demostrado que los pili tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* se unen al DNA, y que esta función se conserva a través de los pili de tipo IV en bacterias (van Schaik y colaboradores. 2005. Journal of Bacteriology, 187(4) 1455-

1464). Tanto el DNA como los pili de tipo IV están involucrados en la unión a una superficie, el estado inicial de la formación de la biopelícula.

Además, se ha descrito recientemente que en especies de biopelículas únicas de *Bacillus cereus* o la bacteria fotosintética marina *Rhodovulum* sp. no sólo el DNA sino también el RNA está presente en la matriz extracelular (Vilain y colaboradores. 2009. Applied and Environmental Microbiology, 75(9): 2861-2868; Ando y colaboradores. 2006. Journal of Biochemistry, 139: 805-811).

En vista de lo anterior, está claro que el DNA y RNA son componentes estructurales de la biopelícula y que las enzimas nucleasas alternativas más eficaces, distintas de la DNasa 1 bovina serían beneficiosas en términos de disrupción y prevención de la biopelícula en una gama de aplicaciones, que incluyen aplicaciones anti biocontaminación médica y no médica.

En particular, la eliminación de las biopelículas en contextos médicos plantea actualmente problemas significativos ya que las bacterias presentes en la biopelícula son altamente resistentes a muchos compuestos antimicrobianos. Además, métodos previos de la técnica para la disrupción de la biopelícula implican composiciones activas principalmente sólo contra proteobacterias gram negativas y muestran una actividad muy específica frente a un número limitado de cepas. Esto limita significativamente su utilidad. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos métodos y estrategias de disrupción y prevención de biopelículas que implican composiciones con propiedades mejoradas.

L. Eckhart y colaboradores, "DNasa1L2 suppresses biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*", BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, (20070601), vol. 38, no. 6, Páginas 209 – 1345 describe el uso de DNasa 1 bovina y streptocócica, incluyendo DNasa1L12 que interrumpe la formación de la biopelícula conduciendo a un mejor efecto antibacteriano.

Compendio de la invención

Aunque la técnica anterior reconoce el DNA y RNA como componentes estructurales de la biopelícula, los presentes inventores han descubierto que sorprendentemente, los microbios emplean activamente sus propias nucleasas, en particular desoxirribonucleasas, con el fin de influir en la biopelícula en la que crecen naturalmente. Por tanto, antes del descubrimiento actual, no se dio cuenta o apreció que los microbios tienen lo que parece ser una relación mucho más dinámica con la biopelícula. Aunque las moléculas de DNA son componentes estructurales de las biopelículas, están, sorprendentemente, lejos de ser ingredientes meramente "pasivos" como se consideró anteriormente. Los inventores actuales han descubierto que los microbios secretan nucleasas, en particular desoxirribonucleasas que pueden degradar el DNA dentro de la biopelícula y que los microbios han desarrollado la capacidad de hacer esto de una manera controlada y precisa para manipular así cuidadosamente las propiedades de la biopelícula y por tanto el medio ambiente en el que crecen naturalmente.

Como tal, basándose en este sorprendente descubrimiento, es evidente que las desoxirribonucleasas microbianas poseerán una actividad superior de disrupción y prevención de la biopelícula entre otras cosas porque han evolucionado, entre otras, la capacidad para degradar con precisión el DNA extracelular específico de la biopelícula.

Por tanto, la invención proporciona una composición farmacéutica o una composición anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula o la prevención de la formación de la biopelícula que comprende un polipéptido de desoxirribonucleasa microbiana aislado y un excipiente en donde la desoxirribonucleasa microbiana es una desoxirribonucleasa bacteriana de tipo *Bacillus*, de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

El componente de nucleasa microbiana de la composición puede ser una desoxirribonucleasa bacteriana de *Bacillus licheniformis*.

El componente de nucleasa microbiana de la composición puede ser una desoxirribonucleasa bacteriana de la cepa EI-34-6 de *Bacillus licheniformis*.

El componente de nucleasa microbiana de la composición puede ser una desoxirribonucleasa bacteriana de nucB.

El componente de nucleasa microbiana de la composición puede ser una desoxirribonucleasa bacteriana de nucB de la cepa EI-34-6 de *Bacillus licheniformis* definido por SEQ ID NO. 6 o una desoxirribonucleasa que es al menos un 95%, 90%, 85%, 80%, 75% o 70% idéntica a la misma.

Las composiciones farmacéuticas y anti-biocontaminación de la invención pueden comprender una o más de las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí en cualquier combinación.

En cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí la desoxirribonucleasa(s) microbiana pueden ser desoxirribonucleasas extracelulares.

En cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí la composición se puede formular como un líquido, loción, crema, aerosol, gel, pomada, jabón en polvo, o agente limpiador tal como una

solución limpiadora, un líquido limpiador, una loción limpiadora, una crema limpiadora, un aerosol limpiador, un gel limpiador y similares.

5 En cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí la composición se puede formular como una pasta dental, un dentífrico líquido, un enjuague bucal, un trocisco o una pomada de masaje gingival.

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí se puede formular para uso en el tratamiento de una amplia gama de indicaciones médicas.

10 Las composiciones anti-bioincrustación descritas aquí se pueden formular para uso en una amplia variedad de aplicaciones de limpieza. Por tanto, las composiciones anti-bioincrustación en una realización se pueden formular, por ejemplo, como una composición en polvo para el lavado, como una composición limpiadora de superficies, como un líquido, una crema para loción, aerosol, gel, pomada o solución limpiadora.

Cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí pueden comprender además uno o más de un compuesto antibacteriano, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiviral y un compuesto antifúngico.

15 El compuesto antiparasitario puede ser uno o más de un benzazol, tal como albendazol, mebendazol y tiabendazol; un azol, tal como metronidazol y tinidazol; un macrociclo, tal como anfotericina B, rifampina e ivermectina; pamoato de pirantel; dietilcarbamazina; niclosamida; praziquantel; melarsoprol; y eflornitina.

20 El compuesto antiviral puede ser uno o más de un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido, tal como aciclovir, didanosina, stavudina, zidovudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina y entecavir; un inhibidor sin recubrimiento tal como amantadina, rimantadina y pleconaril; un inhibidor de proteasa tal como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir y amprenavir; zanamivir; oseltamivir; y rifampina.

25 Un compuesto antibacteriano puede ser uno o más de un aminoglicósido tal como gentamicina, kanamicina y streptomycin; una beta lactama tal como penicilina, ampicilina y imipenem; una cefalosporina tal como ceftazidima, una quinolona tal como ciprofloxacino; un macrólido tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina y telitromicina; una oxazolidinona tal como linezolid; una ansamicina tal como rifamicina; una sulfonamida; una tetraciclina tal como doxiciclina; un glicopéptido tal como vancomicina; sulfisoxazol, trimetoprim, novobiocina, daptomicina y linezolid.

30 El compuesto antifúngico puede ser uno o más de un azol, tal como miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y abafungina; un macrociclo, tal como natamicina, rimocidina, filipin, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina; una alilamina tal como terbinafina, naftifina y butenafina; una equinocandina tal como andidulafungina, caspofungina y micafungina; u otros tales como poligodial, ciclopirox, tolnaftato, ácido benzoico, ácido undecilénico, flucitosina y griseofulvina.

35 Cuando la composición es una composición farmacéutica, dicha composición puede ser para administrar a un paciente animal. El paciente animal puede ser un paciente mamífero. El paciente mamífero puede ser un ser humano.

Cuando la composición es una composición anti-bioincrustación, el compuesto antibacteriano puede ser adicionalmente uno o más de un éster del ácido parahidroxibenzoico (parabens), tal como metil-paraben, etil-paraben, propil-paraben, butil-paraben y bencil-paraben.

40 Una realización también proporciona el polipéptido(s) de nucleasa microbiana aislado anteriormente mencionado para uso como producto farmacéutico, junto con un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.

Una realización también proporciona cualquier polipéptido(s) de nucleasa microbiana aislado anteriormente mencionado para uso como un medicamento.

45 Cualquier polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana aislado anteriormente mencionado, se proporciona cuando usado como un producto farmacéutico o cuando se usa como medicamento, se puede utilizar en el tratamiento de afecciones que incluyen placa dental; caries dental; periodontitis; endocarditis de la válvula natural, prostatitis bacteriana crónica; otitis media; infecciones asociadas con los dispositivos médicos tales como válvulas cardiacas artificiales, marcapasos artificiales, lentes de contacto, articulaciones protésicas, suturas, catéteres y derivaciones arteriovenosas; infecciones asociadas con heridas, laceraciones, llagas y lesiones de las mucosas tales como úlceras; infecciones de la boca, orofaringe, nasofaringe y faringe laríngea; infecciones del oído externo; 50 infecciones del ojo; infecciones del estómago, del intestino delgado y del intestino grueso; infecciones de la uretra y la vagina; infecciones de la piel; infecciones intranasales, tales como infecciones de los senos nasales.

La descripción también proporciona un método de disrupción de una biopelícula en un paciente que comprende poner en contacto una biopelícula en un paciente con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas aquí.

5 La invención también proporciona un método para prevenir la formación de una biopelícula en un paciente que comprende poner en contacto una superficie de un paciente susceptible de formar una biopelícula con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas aquí.

El paciente puede ser un paciente animal. El paciente puede ser un paciente mamífero. El paciente puede ser un ser humano.

10 Una realización también proporciona un método para prevenir la formación de una biopelícula en un dispositivo médico que comprende poner en contacto una superficie de un dispositivo médico con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas o composiciones anti-bioincrustación descritas aquí. Opcionalmente, la desoxirribonucleasa(s) microbiana de dichas composiciones se puede unir a dicha superficie. El dispositivo médico puede ser cualquier dispositivo médico descrito aquí.

15 Como tal, una realización proporciona también un dispositivo médico permanente como se describe aquí caracterizado porque al menos una porción de una superficie que puede estar en contacto con el paciente de dicho dispositivo está recubierta con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas o anti-bioincrustación descritas aquí. Tal dispositivo puede ser, por ejemplo, un catéter o una cánula. En tales dispositivos, la desoxirribonucleasa(s) microbiana de la composición se puede unir a dicha al menos una porción de la superficie que puede estar en contacto con el paciente.

20 También se proporciona un método de disrupción de una biopelícula en una superficie que comprende poner en contacto una biopelícula en una superficie con cualquiera de las composiciones anti-bioincrustación descritas aquí.

También se proporciona un método para prevenir la formación de una biopelícula en una superficie que comprende poner en contacto una superficie con cualquiera de las composiciones anti-bioincrustación descritas aquí.

25 En cualquiera de estos métodos la desoxirribonucleasa(s) microbiana de la composición anti-bioincrustación se puede unir a dicha superficie.

En cualquiera de estos métodos la biopelícula puede comprender bacterias gram positiva.

30 Una realización también proporciona para el uso de uno cualquiera de los polipéptidos de deoxirribonucleas microbiana aislados descritos aquí en la fabricación de una composición anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula o prevención de la formación de la biopelícula. Tal composición se puede formular por ejemplo como un polvo, un líquido, un gel o una pasta.

Por ejemplo, la composición se puede formular como un líquido, loción, crema, aerosol, gel, pomada, jabón en polvo, o agente de limpieza tal como solución de limpieza, líquido de limpieza, loción de limpieza, crema de limpieza, aerosol de limpieza, gel de limpieza y similares.

35 Tal composición puede ser para aplicar a una superficie, en la que dicha superficie es al menos una porción de una superficie de una cocina, tal como una unidad de suelo, plataforma, pared o fregadero; o un electrodoméstico, tal como un horno, refrigerador o congelador. En tales aplicaciones, típicamente la composición será un aerosol líquido o una formulación para aplicación tópica, tal como un gel, pasta, crema, aerosol o solución de limpieza.

40 Tal composición puede ser para aplicar en al menos una porción de una superficie de un componente de, por ejemplo, un aparato de distribución de agua, un aparato de almacenamiento de agua, un aparato de transferencia de calor; un aparato de tratamiento de agua, un aparato de refrigeración; un casco de una embarcación náutica tal como un barco, una lancha, un yate o un submarino. En estas aplicaciones, opcionalmente el polipéptido(s) de nucleasa microbiana de tal composición se puede unir a una superficie.

Una realización también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica cualquier polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana descrito anteriormente.

45 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra una gráfica de la concentración de fracciones de Superose 12 (RTM) del sobrenadante AMS de la cepa EI-34-6 de *B. licheniformis* concentrado de TCA (línea de puntos) frente al porcentaje de actividad de dispersión de la biopelícula (línea continua).

50 La Figura 2 muestra un gel de Tris-Triceno teñido con Coomassie del sobrenadante AMS crudo de la cepa EI-34-6 de *B. licheniformis* (carril 1) y fracciones de Superose 12 (RTM) concentradas (carriles 2, 3 & 4). Se destacan las bandas de 12, 30 y 36 kDa sometido a la toma de huellas peptídicas (carril 4).

La Figura 3 muestra un mapa del plásmido que contiene secuencias de polinucleótidos del gen de la nucleasa NucB de la cepa EI-34-6 de *B. licheniformis*.

5 La Figura 4 muestra la secuencia de proteínas de NucB a partir del genoma secuenciado DSM13 de *B. licheniformis* en comparación con la secuencia de proteínas de NucB a partir del aislamiento ambiental de EI-43-6-de *B. licheniformis*.

La Figura 5 muestra una comparación de la disrupción de la biopelícula entre el sobrenadante AMS de nucB de la cepa EI-34-6 de *B. licheniformis* y la DNasal purificada del páncreas bovino.

La Figura 6 muestra una secuencia de DNA de nucB de *Bacillus licheniformis* a partir de la cepa EI-34-6 (SEQ ID No: 1).

10 La Figura 7 muestra una secuencia de DNA de nucB de *Bacillus licheniformis* a partir de la cepa DSM13 (SEQ ID No: 2).

La Figura 8 muestra la secuencia derivada del precursor de la proteína de nucB de *Bacillus licheniformis* a partir de la cepa EI-34-6. La secuencia subrayada es la secuencia peptídica de la señal predicha (SEQ ID No:3).

15 La Figura 9 muestra la secuencia derivada de del precursor de la proteína de nucB de *Bacillus licheniformis* a partir de la cepa EI-34-6 sin la secuencia peptídica de la señal predicha (SEQ ID No:4).

La Figura 10 muestra la secuencia derivada del precursor de la proteína de nucB de *Bacillus licheniformis* a partir de la cepa DSM13. La secuencia subrayada es la secuencia peptídica de la señal predicha (SEQ ID No:5).

La Figura 11 muestra micrografías de contraste de fase de una biopelícula de *Pseudomonas* no tratada (panel superior) y tratada con NucB (panel inferior).

20 La Figura 12 muestra el efecto del tratamiento con NucB en varias biopelículas microbianas (bacterianas y de levadura).

La Figura 13 muestra el efecto del tratamiento con NucB en lentes de contacto sucias.

Descripción detallada de la invención

25 Como se ha indicado anteriormente, las biopelículas están asociadas con la patogénesis de un número significativo de infecciones en humanos y otros organismos y originan problemas significativos en la industria en términos de incrustación. En consecuencia, se requieren nuevas estrategias para inhibir la formación de biopelículas y dispersar las biopelículas preexistentes. En aplicaciones médicas e industriales, la disrupción de una biopelícula preexistente puede conducir per se a la erradicación de los microorganismos debido a la disrupción del medio ambiente que soporta el crecimiento microbiano. La disrupción puede hacer también a los habitantes microbianos de la biopelícula más susceptibles a los compuestos anti-microbianos.

30 La presente invención se basa en el descubrimiento de que, sorprendentemente, los microbios pueden modificar activamente la biopelícula en la que crecen mediante la secreción de enzimas nucleasas. Como tal, el ácido nucleico extracelular, en particular DNA, componentes de la biopelícula parecen ser componentes estructurales de la biopelícula que pueden dirigirse específicamente para la degradación por habitantes microbianos mediante nucleasas particularmente desoxirribonucleasas. La composición única y dura de la biopelícula, que comprende una aglomeración viscosa de matriz polimérica, macromoléculas y similares, indica un requisito para nucleasas con mayor actividad específica para el componente de ácido nucleico extracelular de la biopelícula. Como tales, las desoxirribonucleasas microbianas proporcionan agentes de degradación de ácidos nucleicos extracelulares específicos más efectivos para biopelículas.

35 Una realización por lo tanto proporciona composiciones que comprenden desoxirribonucleasas microbianas para la disrupción de la biopelícula o prevención de la formación de la biopelícula tanto en aplicaciones médicas como no médicas (anti-bioincrustación o limpieza) como se describe a continuación con más detalle.

40 Como se describe aquí, polipéptidos de desoxirribonucleasa microbiana se identificaron mediante la biopelícula que altera el fraccionamiento dirigido a la actividad del medio de crecimiento de *B. licheniformis* seguido de la espectrometría de masas de la huella peptídica y posterior clonación de genes que codifican proteínas específicas de la fracción activas. Los polipéptidos de desoxirribonucleasa microbiana se pueden aislar y formular para composiciones farmacéuticas y anti-bioincrustantes para la disrupción de biopelículas y prevención de la formación de biopelículas como se describe aquí.

45 Un polipéptido de desoxirribonucleasa microbiano "aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido de desoxirribonucleasa microbiana que se ha separado de otras proteínas, lípidos, ácidos nucleicos u otras macromoléculas con las que se produce/asocia naturalmente o el polipéptido se puede sintetizar sintéticamente y purificar por técnicas estándar. El polipéptido se separa también de sustancias, por ejemplo, anticuerpos o matriz de

gel, por ejemplo, poliacrilamida, que puede utilizar para purificarla. Preferiblemente, el polipéptido constituye en peso al menos el 60% o más, 70% o más, 80% o más, 90% o más o 95% o más de una preparación de nucleasa microbiana purificada para su uso en las composiciones de la invención.

5 Los términos nucleasa o desoxirribonucleasa como se usan aquí se pueden referir a un polipéptido(s) de longitud completa. El término se puede referir también a un fragmento biológicamente activo de dicho polipéptido(s), tal como un polipéptido truncado, o una forma genéticamente modificada o un fragmento de longitud completa o truncado, siempre que se mantenga la actividad biológica de la molécula.

10 Las formulaciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí se pueden administrar, entre otras por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, oral y por inhalación.

15 Las formulaciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí se pueden formular para administración tópica (por ejemplo, como una loción, crema, aerosol, gel, o pomada). Tales formulaciones tópicas son útiles en el tratamiento o inhibición de la presencia microbiana o fúngica o infecciones en dispositivos biológicos, superficies contaminadas, el ojo, piel, y membranas mucosas tales como boca, vagina y similares.

20 Ejemplos de formulaciones incluyen lociones tópicas, cremas, jabones, toallitas y similares. Pueden formularse en liposomas, para reducir la toxicidad o aumentar la biodisponibilidad. Otros métodos para el suministro incluyen métodos orales que implican la encapsulación del polipéptido o péptido en microesferas o proteínoides, administración de aerosoles (por ejemplo, a los pulmones), o administración transdérmica (por ejemplo, iontoforesis o electroporación transdérmica). Otros métodos de rutina de administración serán conocidos por los expertos en la técnica.

25 Cualquier excipiente adecuado farmacéuticamente aceptable se puede utilizar en la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí. Tales excipientes, portadores, vehículos etc son conocidos por aquellos expertos en la técnica y están descritos en libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985.

Formulaciones farmacéuticas, que contienen una cualquiera de las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí, adecuadas para la administración oral se pueden proporcionar en formas unitarias convenientes que incluyen cápsulas, tabletas, geles, pastas, pomadas etc.

30 Composiciones orales que contienen las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana de la invención se pueden preparar y utilizar en varias formas aplicables a la boca tales como pasta de dientes, dentífricos líquidos, enjuages bucales, trociscos, pastas dentales, pomadas de masaje gingival, y otras realizaciones adecuadas. Tales composiciones orales pueden incluir además ingredientes adicionales bien conocidos dependiendo del tipo y forma de la composición oral particular.

35 La composición oral puede tener un carácter sustancialmente líquido, tal como un enjuague bucal o enjuague. En dicha preparación el vehículo es típicamente una mezcla agua-alcohol, incluyendo posiblemente un humectante como se describe a continuación. Generalmente, la relación en peso de agua a alcohol está en el rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. La cantidad total de la mezcla agua-alcohol en este tipo de preparación es típicamente de aproximadamente 70 a aproximadamente 99,9% en peso de la preparación. El alcohol es típicamente isopropanol, preferiblemente etanol.

40 El pH de dicho líquido y otras composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí está generalmente en el intervalo desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 9 y típicamente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 7. El pH se puede controlar con ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ejemplo, hidróxido de sodio) o tamponado (como con citrato, benzoato, carbonato o bicarbonato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio, dihidrógeno fosfato de sodio, etc).

45 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí pueden tener un carácter sustancialmente sólido o pastoso, tal como polvo dental, una tableta dental, una pasta dentífrica, una crema/pomada dental y un gel dentífrico.

50 En una pasta de dientes, el vehículo líquido puede comprender agua y un humectante, típicamente el humectante está presente en una cantidad de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 80% en peso. Humectantes adecuados incluyen glicerina, sorbitol, propilenglicol, y polipropilenglicol. Son ventajosas las mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles transparentes, se emplean preferiblemente aproximadamente 2,5 – 30% peso/peso de agua, de 0 a aproximadamente 70% peso/peso de glicerina y aproximadamente 20 – 80% peso/peso de sorbitol.

55 La pasta de dientes, cremas y geles contienen típicamente un espesante o agente gelificante natural o sintético en proporciones de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a

aproximadamente 5% peso/peso. Espesantes adecuados incluyen hectorita sintética, musgo irlandés, carragenano iota, goma tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietil propil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, y sílice coloidal.

5 También se pueden incluir agentes solubilizantes tales como polioles humectantes tales como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, celosolves tales como metil celosolve y etil celosolve, aceites vegetales y ceras que contienen al menos aproximadamente 12 átomos de carbono en una cadena lineal tal como el aceite de oliva, aceite de ricino y petrolato y ésteres tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo.

10 Se pueden utilizar tensioactivos aniónicos, tales como sulfatos de alquilo superiores tales como lauril sulfato de sodio, alquilsulfo-acetatos superiores, ésteres de ácidos grasos superiores del sulfonato de 1,2-hidroxi propano, sulfonatos de alquilarilo tales como el dodecil benceno sulfonato de sodio, y sales solubles en agua de monoglicéridos monosulfatos de ácidos grasos superiores. Otros tensioactivos específicos incluyen N-lauroil sarcosina; las sales de sodio, potasio y etanolamina de N-lauroil, N-miristoil, o N-palmitoil sarcosina. Ejemplos de tensioactivos no iónicos solubles en agua adecuados para su uso son los productos de condensación de óxido de etileno con varios compuestos reactivos que contienen hidrógeno reactivo con aquellos que tienen cadenas hidrofóbicas largas (por ejemplo, cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen restos de polioxietileno hidrofílico, tal como los productos de condensación de poli (óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihídricos (por ejemplo, monoestearato de sorbitan) y óxido de polipropileno (por ejemplo, materiales plurónicos).

20 Excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para su uso en formulaciones de tabletas incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegración, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Las tabletas pueden estar recubiertas o se pueden recubrir por técnicas conocidas para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y de este modo proporcionar una acción sostenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como el monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

30 Para formulaciones de cápsula de gelatina dura, el ingrediente activo se puede mezclar con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o kaolina. Para formulaciones de cápsula de gelatina blanda el ingrediente activo se puede mezclar con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

35 Excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas incluyen agentes de suspensión, por ejemplo carboximetil celulosa de sodio, metilcelulosa, hidropropilmetil celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfático natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilén sorbitán.

40 Las suspensiones acuosas pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo benzoatos, tales como p-hidroxibenzoato de etilo, o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

45 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo los ingredientes activos en un aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes aromatizantes y agentes edulcorantes. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como el ácido ascórbico.

50 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí se pueden formular también para administración parenteral, tal como por inyección, por ejemplo inyección en bolo o infusión continua, y se puede proporcionar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringas precargadas, infusión de pequeño volumen o en envases multidosis, por ejemplo, con un conservante añadido.

55 Las preparaciones para administración parenteral de las formulaciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones, y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales (por ejemplo aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen agua, solución salina y medio tamponado, soluciones alcohólicas/acuosas, y emulsiones o suspensiones. Ejemplos de vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer, y aceites fijos. Vehículos intravenosos incluyen reponedores

de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquellos basados en la dextrosa de Ringer), y similares. También se pueden incluir conservantes y otros aditivos tales como, otros agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares.

5 Para administración tópica a la epidermis, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana se puede formular como una pomada, crema, o loción. Las pomadas y cremas, pueden, por ejemplo, formularse con una base acuosa u oleosa con la adición de agentes espesantes y/o gelificantes adecuados. Las lociones pueden formularse con una base acuosa u oleosa y en general contendrán también uno o más agentes emulsionantes, agentes estabilizantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, o agentes colorantes. Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas, por ejemplo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto; las pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina o sacarosa y acacia; y lavados bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

15 Para administración tópica en el ojo, cualquiera de las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana puede prepararse en solución o suspensión en un vehículo acuoso o no acuoso estéril adecuado. También se pueden incluir los aditivos tales como tampones (por ejemplo metabisulfito de sodio o edeato de disodio) y agentes espesantes tales como hipromelosa.

20 Para administración intranasal, cualquiera de las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana se puede proporcionar en un polvo líquido pulverizable o dispersable o en la forma de gotas. Las gotas se pueden formular con una base acuosa o no acuosa que comprende también uno o más agentes dispersantes, agentes solubilizantes, o agentes de suspensión.

25 Para la administración por inhalación, cualquiera de las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana se puede suministrar por insuflador, por ejemplo, un nebulizador o un envase presurizado u otro medio conveniente de suministro de una pulverización de aerosol. Los envases presurizados pueden comprender un propulsor adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la dosis unitaria se puede determinar proporcionando un valor para suministrar una cantidad medida.

30 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí pueden tomar la forma de una composición de polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del componente activo y un polvo base adecuado tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, cápsulas, cartuchos o envases tipo blíster de gelatinas, a partir de las cuales el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador o insuflador.

Los apósitos para las heridas tales como esponjas, gasas, vendas, escayolas etc pueden impregnarse con las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana para prevenir o inhibir la adhesión bacteriana o fúngica y reducir el riesgo de infección de la herida.

35 Los escudos para catéteres así como otros materiales utilizados para cubrir los sitios de inserción del catéter pueden cubrirse o impregnarse con las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana para inhibir la unión de la biopelícula bacteriana o fúngica al mismo.

40 Dispositivos médicos adicionales que pueden recubrirse con las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana incluyen catéteres venosos centrales, catéteres intravasculares, catéteres urinarios, catéteres de Hickman, catéteres de diálisis peritoneal, catéteres endotraqueales, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos cardíacos, derivaciones arteriovenosas, hebilla escleral, articulaciones protésicas, tubos de timpanostomía, tubos de traqueotomía, prótesis de voz, prótesis de pene, esfínteres urinarios artificiales, cabestrillo pubovaginal sintético, suturas quirúrgicas, anclajes óseos, tornillos óseos, lentes intraoculares, lentes de contacto, dispositivos intrauterinos, injertos aortofemorales e injertos vasculares. Ejemplos de soluciones para impregnar gasas o esponjas, escudos para catéteres y apósitos adhesivos o revestimiento de los escudos para catéteres y otros dispositivos médicos incluyen, pero no se limitan a, soluciones salinas tamponadas con fosfato (pH aproximadamente 7,5) y tampón bicarbonato (pH aproximadamente 9,0).

50 Las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí pueden incorporarse en una solución desinfectante líquida. Tales soluciones pueden comprender además agentes antimicrobianos o antifúngicos tales como alcohol, solución de yodona yodado y antibióticos así como conservantes. Estas soluciones se pueden utilizar, por ejemplo, como desinfectantes de la piel o del área circundante antes de la inserción o la implantación de un dispositivo tal como un catéter, como sellado de catéteres y/o soluciones de lavado, y como un enjuague antiséptico para cualquier dispositivo médico que incluye, pero no se limita a componentes del catéter tales como agujas, conectores luer-lok, conectores sin aguja y concentradores así como otros dispositivos implantables. Estas soluciones se pueden utilizar también para recubrir o desinfectar los instrumentos quirúrgicos.

55 La cantidad de desoxirribonucleasa microbiana necesaria para su uso en el tratamiento variará, por supuesto, no sólo con el polipéptido particular sino también con la vía y la forma de administración, la naturaleza y la gravedad de la afección a tratar, y la edad y condición del organismo.

Además, la medida de la disrupción de la biopelícula se puede modular, como se necesite, mediante la dosis del componente de desoxirribonucleasa microbiana de la composición. Por ejemplo, una dosis más pequeña del componente de desoxirribonucleasa microbiana puede conducir a la permeabilización de la biopelícula, en lugar de la disrupción estructural mayor que se podría lograr a dosis más altas. Tal permeabilización puede conducir a portales en la biopelícula a través de la cual los microbios atrapados pueden salir y/o a través de la cual componentes antimicrobianos adicionales de la composición pueden entrar.

Por lo tanto, concentraciones apropiadas de la desoxirribonucleasa microbiana activa que se van a incorporar en las composiciones farmacéuticas se pueden determinar de manera rutinaria por los expertos en la técnica de acuerdo con las prácticas estándar.

En vista de lo anterior, una dosis eficaz del componente de desoxirribonucleasa microbiana es una dosis que se evalúa para dar lugar a una disrupción detectable de la biopelícula, o reducción en la formación de la biopelícula, si se compara con la ausencia del componente de desoxirribonucleasa microbiana. Por ejemplo, las dosis puede incluir desde aproximadamente 1 miligramo kilogramo⁻¹ hasta 1 gramo kilogramo⁻¹ por peso corporal del animal que se va a tratar, desde aproximadamente 0,01 miligramo kilogramo⁻¹ hasta 100 miligramo kilogramo⁻¹ por peso corporal del animal que se va a tratar, entre aproximadamente 0,01 microgramo kilogramo⁻¹ y aproximadamente 10 miligramo kilogramo⁻¹ por peso corporal del animal que se va a tratar, entre aproximadamente 0,1 microgramo y aproximadamente 10 microgramo kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, entre aproximadamente 1 microgramo y aproximadamente 10 miligramo kilogramo⁻¹ por peso corporal de un animal, entre aproximadamente 5 microgramo y aproximadamente 10 miligramo kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, entre aproximadamente 10 microgramos y aproximadamente 10 miligramos kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal, entre 0,1 miligramos y aproximadamente 5 miligramos kilogramo⁻¹ de peso corporal de un animal.

Las formulaciones farmacéuticas que comprende composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí pueden incluir también un agente antimicrobiano tal como detergentes y antibióticos. Antibióticos adecuados incluyen aminoglicósidos (por ejemplo, gentamicina, kanamicina y estreptomina), beta-lactamas (por ejemplo, penicilina, ampicilina, imipenem y cefalosporinas tales como Ceftazidima), quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacino), macrólidos tales como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina y telitromicina, oxazolidinonas tales como linezolid, ansamicinas tales como rifamicina, sulfonamidas, tetraciclinas tales como Doxiciclina. Antibióticos adicionales incluyen glicopéptidos tales como vancomicina, sulfisoxazol, trimetoprim, novobiocina, daptomicina y linezolid.

Generalmente, el agente antimicrobiano se administra en una cantidad microbicida. Sin embargo, el agente antimicrobiano también se puede administrar en cantidades microbiostáticas. Independientemente, las formulaciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí proporcionan para una actividad antimicrobiana elevada, en virtud de la disrupción de la biopelícula en la que existe el microbio en particular, junto con los compuestos antimicrobianos adicionales si es necesario.

Las biopelículas pueden albergar también parásitos y virus. En consecuencia, compuestos antiparasitarios y/o antivirales se pueden incluir también en las composiciones farmacéuticas descritas aquí, opcionalmente junto con un compuesto antibacteriano, tal como aquellos especificados anteriormente.

Los compuestos antiparasitarios que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de una realización incluyen los benzazoles (albendazol, mebendazol, tiabendazol, etc.), los azoles (metronidazol, tinidazol, etc.), macrociclos (anfotericina B, rifampina, ivermectina etc.) y otros tales como pamoato de pirantel, dietilcarbamicina, niclosamida, praziquantel, melarsoprol y eflornitina.

Los compuestos antivirales que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de una realización incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (Aciclovir, didanosina, stavudina, zidovudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, entecavir, etc.), inhibidores sin recubrimiento (amantadina, rimantadina, pleconaril, etc.), inhibidores de proteasa (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, etc.) y otros tales como zanamivir, oseltmivir, rifampina.

Los compuestos antivirales que se pueden incluir en las composiciones farmacéuticas de una realización incluyen un azol, tal como miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y abafungina; un macrociclo, tal como natamicina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina; una alil amina tal como terbinafina, naftifina y butenafina; una equinocandina tal como andidulafungina, caspofungina y micafungina; u otros tales como poligodial, ciclopirox, tolnaftato, ácido benzoico, ácido undecilénico, flucitosina y griseofulvina.

Aunque el tratamiento de pacientes humanos está claramente previsto, las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana de una realización encuentran igualmente utilidad en el tratamiento de mamíferos no humanos y otros animales. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de una realización encuentran utilidad en la medicina y tratamiento veterinario.

Aunque no limitantes de la invención, se mencionan a continuación varios microbios que pueden afectarse por las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí.

5 Las bacterias que se pueden afectar por las composiciones farmacéuticas de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí incluyen tanto bacterias gram-negativas como gram-positivas. Por ejemplo, las bacterias que se pueden afectar incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes* (grupo A), *Streptococcus sp.* (grupo viridans), *Streptococcus agalactiae* (grupo B), *S. bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, y *Enterococcus sp.*; cocos gram-negativo tales como, por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, y *Branhamella catarrhalis*; bacilos gram-positivos tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Corynebacterium* especies que son dipteroides (aeróbicos y anaeróbicos), *Listeria monocytogenes*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Enterobacter species*, *Proteus mirabilis* y otras especies., *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Serratia*, y *Campylobacter jejuni*. La infección con una o más de estas bacterias puede dar como resultado enfermedades tales como bacteremia, neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, sinusitis, artritis, infecciones del tracto urinario, tétanos, gangrena, colitis, gastroenteritis aguda, impétigo, acné, acné rosáceo, infecciones de heridas, infecciones de los recién nacidos, fascitis, bronchitis, y una variedad de abscesos, infecciones nosocomiales, e infecciones oportunistas.

20 Los organismos microbianos fúngicos que también se pueden afectar por las formulaciones farmacéuticas que comprenden las composiciones de desoxirribonucleasa microbiana descritas aquí incluyen dermatofitos (por ejemplo, *Microsporum canis* y otros *Microsporum sp.*; y *Trichophyton sp.*, tales como *T. rubrum*, y *T. mentagrophytes*), levaduras (por ejemplo, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, u otras especies *Candida*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Epidermophyton floccosum*, *Malassezia furfur* (*Pityrosporon orbiculare*, o *P. ovale*), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, y otras especies de *Aspergillus*, *Zygomycetes* (por ejemplo, *Rhizopus*, *Mucor*), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, y *Sporothrix schenckii*.

25 Los microbios que pueden colonizar la boca y la orofaringe y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Eikenella corrodens*, *Enterobacteriaceae*, *Fusobacterium*, *Haemophilus sp.* Incluyendo *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Peptostreptococcus*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermidis*, *Strep. viridans*, *Strep. pyogenes*, *Strep pneumoniae*, *Treponema* y *Pseudomonas aeruginosa*.

30 Los microbios que pueden colonizar la nasofaringe y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staph. Aureus*, *Staph. epidermidis*, *Strep. viridans* y *Strep. pneumoniae*.

35 Los microbios que pueden colonizar el oído externo y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staph. epidermidis* y *Strep. pneumoniae*.

Los microbios que pueden colonizar el ojo y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Haemophilus* y *Staph. epidermidis*.

40 Los microbios que pueden colonizar el estómago y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Helicobacter pylori*, *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

45 Los microbios que pueden colonizar el intestino delgado y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Bacteroides*, *Candida*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, y *Streptococcus*.

Los microbios que pueden colonizar el intestino grueso y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Bacteroides*, *Candida*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

50 Los microbios que pueden colonizar la uretra anterior y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Candida*, *Corynebacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Staph. epidermidis*, *Streptococcus* y *Ureaplasma*.

55 Los microbios que pueden colonizar la vagina y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Actinomyces*, *Bacteroides*,

Candida, Clostridium, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Fusobacterium, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus, Mobiluncus, Mycoplasma, Staphylococcus, Streptococcus, Torulopsis y Ureaplasma.

5 Los microbios que pueden colonizar la piel y que pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí incluyen los siguientes. *Candida, Clostridium, Corynebacterium, Propionibacterium, Staph. aureus, Staph. epidermidis y Strep. pyogenes.*

10 Enfermedades e infecciones específicas están asociadas con la biopelícula (Costerton y colaboradores. Science 1999 284:1318-1322; Donlan, R. M. 2001 Emerging Infect. Dis. 7:277-281, Donlan, R. M., and J. W. Costerton. 2002. Clin. Microbiol. Rev. 15:167-193.). Por ejemplo, las enfermedades incluyen caries dental, periodontitis, endocarditis de la válvula nativa, prostatitis bacteriana crónica y otitis media. Además, las biopelículas se han asociado con la
 15 aquellas asociadas con catéteres, especialmente catéteres intravasculares, son comunes en pacientes hospitalizados y se asocian con una alta morbilidad y mortalidad. Las biopelículas se ha demostrado que desempeñan un papel importante en las infecciones en las suturas, los sitios de salida, derivaciones arteriovenosas, catéteres del tracto urinario, catéter venoso central y catéter de Hickman y dispositivos ortopédicos, y otros dispositivos similares. Los hongos (por ejemplo, *Candida albicans*) también forman biopelículas asociadas a enfermedades. Los microbios asociados con infecciones de los pulmones y las infecciones relutantes de heridas, laceraciones, llagas, úlceras y otras tales como lesiones pueden tratarse con las composiciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí.

20 Una cualquiera de las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí, o combinaciones de las mismas, se pueden recubrir sobre la superficie de al menos una porción de un dispositivo médico destinado para el contacto con un paciente, así como para prevenir la formación de la biopelícula en las superficies de tales dispositivos susceptibles de formar la biopelícula. Además, las desoxirribonucleasas descritas aquí, o combinaciones de las mismas, se pueden inmovilizar sobre dichas superficies.

25 Las estrategias para la inmovilización de proteínas y péptidos sobre las superficies derivatizadas son bien conocidas en la técnica y se han empleado en muchas aplicaciones, por ejemplo en la fabricación de chips de proteínas (véase por ejemplo, Yeo y colaboradores. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening. 2004. 7(3): 213-221; Camarero J. Biopolymers. 2008. 90(3): 450-458; Köhn, M. Journal of Peptide Science 2009. 5(6): 393-397). Dichas estrategias se pueden emplear en una manera análoga en la fijación de las desoxirribonucleasas microbianas de la
 30 invención a superficies apropiadas.

35 El documento de Patente WO 2007/007052, por ejemplo, describe el uso de un polímero de polisilano para la unión de, entre otras cosas, moléculas biológicamente activas a superficies sin pérdida de la actividad biológica. El polímero forma una red porosa sustancialmente tridimensional sobre la cual y dentro de la cual se pueden absorber las moléculas biológicas. Se describen dispositivos, tales como dispositivos médicos, que están funcionalizados con biomacromoléculas que utilizan la tecnología descrita.

La inmovilización sobre superficies susceptibles de formar biopelículas se relacionará típicamente con los dispositivos médicos permanentes de la variedad disponible, o dispositivos destinados para un único uso. Tales dispositivos serán típicamente catéteres, cánulas y similares.

40 Las enfermedades periodontales, que pueden implicar biopelículas, van desde la simple inflamación de las encías hasta enfermedades graves asociadas con los dientes. Las enfermedades periodontales incluyen gingivitis y periodontitis. Bacterias, tales como *P. gingivalis*, causan inflamación de las encías, una afección conocida como gingivitis. En la gingivitis, las encías se vuelven rojas, hinchadas y pueden sangrar con facilidad. Cuando la gingivitis no se trata, puede avanzar a periodontitis donde las encías se desprenden de los dientes y forman bolsas que pueden infectarse y que pueden conducir posteriormente a la disrupción de las encías, hueso subyacente y tejido
 45 conectivo que soportan los dientes, conduciendo finalmente a la pérdida del diente si no se trata.

50 Aquellos expertos en la técnica de la medicina pueden emplear fácilmente criterios convencionales para identificar sujetos apropiados para el tratamiento con las formulaciones farmacéuticas que comprenden las desoxirribonucleasas microbianas descritas aquí. Sin embargo, ejemplos de otras enfermedades que pueden tratarse con las composiciones descritas aquí incluyen esencialmente cualquier infección asociada con las bacterias gram-positivas o gram-negativas o un hongo y se sabe o se sospecha que están involucradas en el crecimiento directo de la biopelícula. Las enfermedades y afecciones que pueden tratarse incluyen fiebre, choque tóxico, fallo orgánico, síndrome de dificultad respiratoria en adultos y similares.

55 La presente invención encuentra también utilidad en aplicaciones no médicas anti-bioincrustación/limpieza en la prevención de la formación de la biopelícula o disrupción de la biopelícula establecida en superficies naturales y artificiales de en, por ejemplo, ambientes industriales, comerciales, agricultura y domésticos.

Las biopelículas pueden conducir a la contaminación de una amplia variedad de superficies en dichos contextos, tal como se describe después, tales como las redes de distribución de agua, equipos de almacenamiento de agua, equipos de tratamiento de aguas, equipos de transferencia de calor, torres de enfriamiento y así sucesivamente.

5 El término “superficie” se pretende que incluya cualquier superficie en dichos contextos no médicos que puede estar en contacto con el agua, en cualquiera de sus fases sólida, líquida o gaseosa, particularmente agua líquida, vapor de agua, vapor etc de tal forma que la formación de la película indeseable y la acumulación puede surgir como resultado de la colonización por microorganismos. Típicamente, tal formación y acumulación puede ocurrir en medios ligeramente húmedos, húmedos, brumosos y húmedos. La formación de la biopelícula puede ocurrir también en medios sumergidos, en medios sumergidos que periódicamente se pueden exponer también al aire (por ejemplo, cascos de buques en el mar y en situaciones en dique seco) y típicamente en las interfases agua/aire. Como tal, la realización encuentra utilidad en una amplia gama de aplicaciones no médicas antibioincrustaciones/limpieza.

10 Por tanto, una realización proporciona composiciones anti-bioincrustantes para la disrupción de una biopelícula y para la prevención de la formación de la biopelícula, comprendiendo los polipéptidos de desoxirribonucleasa microbiana aislados descritos aquí y un excipiente. Una composición “anti bioincrustante” como se describe aquí es una composición destinada al contacto con cualquier “superficie” adecuada como se describió anteriormente.

15 Los sistemas de agua típicos contienen siempre una población microbiana y rara vez son estériles. Generalmente existe el potencial para la multiplicación bacteriana, crecimiento y floración en las condiciones adecuadas (Industrial Antimicrobial Agents: Applications and Markets in Various Global Regions 2000-2005-2010' (Technical Insights) publicado por Frost y Sullivan). Como tales, las estructuras sumergibles son particularmente susceptibles a la formación de la biopelícula y la posterior contaminación. Los métodos de campo típicos para el control del crecimiento microbiano son rápidos y no son completos para el control total.

20 Las biopelículas bacterianas son una preocupación importante en sistemas de aguas industriales, y están implicadas en la contaminación de los sistemas de distribución de agua, equipos de transferencia de calor y similares. Cuando se trata de torres de enfriamiento y estanques de rociado, las biopelículas de algas son un problema común. No sólo hacen que estas películas ensucien las cubiertas de distribución y el relleno de la torre, sino que las algas proporcionarán los nutrientes para la proliferación de las bacterias y hongos. La formación de biopelículas también conduce al atrapamiento de sales inorgánicas y la formación de incrustaciones que destruye más los equipos industriales.

25 Otro problema que se asocia con las biopelículas es el de la corrosión. Los microorganismos dentro de las biopelículas pueden influir en la corrosión mediante la formación de células diferenciales localizadas, la producción de ácidos minerales y orgánicos, producción de amoniaco, y reducción de sulfatos. El control eficaz de los microorganismos con agentes antimicrobianos para el tratamiento del agua mantiene la eficacia del sistema en uso y reduce los peligros potenciales para la salud.

30 La contaminación de los cascos de los barcos, aparejos y similares es todavía otra consecuencia de la biopelícula problemática. Dicha contaminación empieza por la acumulación de una biopelícula bacteriana, seguida de algas, percebes y otros organismos marinos. Para prevenir la formación inicial de la biopelícula bacteriana, se puede prevenir el establecimiento de otros organismos de contaminación más problemáticos.

35 Así las composiciones anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula y para la prevención de la formación de la biopelícula se pueden aplicar a al menos una porción de una superficie de un componente de, por ejemplo, un aparato de distribución de agua; un aparato de almacenamiento de agua; un aparato de transferencia de calor; un casco de una embarcación náutica tal como un barco, una lancha, un yate o un submarino. Se prevén otras muchas aplicaciones de este tipo.

40 La formación de la biopelícula es también un problema significativo en la cría de animales, por ejemplo en la acuicultura. El desarrollo de la biopelícula en los tanques de acuicultura puede proporcionar una fuente de contaminación para patógenos oportunistas que pueden ser perjudiciales para la salud de los animales (particularmente en el desarrollo de etapas tempranas, por ejemplo, en el estadio larvario) en instalaciones de acuicultura (Weitz y colaboradores. 2009. Systematic and Applied Microbiology, 32: 266-277). Métodos de tratamiento anti-bioincrustación adicionales encontrarán utilidad en dichas situaciones.

45 Las biopelículas también pueden surgir en entornos domésticos u otros contextos similares. Por ejemplo, la formación indeseable de la biopelícula puede constituir la base de la contaminación de refrigeradores, equipos de almacenamiento y suministro de agua domésticos, desagües, servicios etc.

50 Así las composiciones anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula y para la prevención de la formación de la biopelícula se puede aplicar a al menos una porción de una superficie de una cocina, tal como una unidad de suelo, plataforma, pared o fregadero; o un electrodoméstico, tal como un horno, refrigerador o congelador.

55 Las composiciones anti-bioincrustación de una realización pueden formularse de manera diferente dependiendo de la aplicación particular prevista. Las tecnologías de formulación en seco y líquido para composiciones basadas en

enzimas son bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo los documentos de Patente EP0304332, EP0458845, US5558812, y US6242405). En particular, las enzimas biológicas se usan comúnmente en composiciones de detergentes, por ejemplo para aplicaciones de limpieza de productos textiles y de cocina para aumentar la eficacia de la limpieza. Las formulaciones de detergentes que contienen enzimas son bien conocidas en la técnica y las enzimas nucleasas de una realización pueden formularse de una manera análoga (véase por ejemplo los documentos de Patente US4106991, EP0170360, EP0193829, EP1420878, WO 92/19709 y EP0511456 y las referencias en ellas).

Las biopelículas se han postulado para actuar como sitios de unión y desunión para virus y parásitos protozoarios, y, como tal, pueden facilitar la acumulación, el amparo y diseminación de tales patógenos en los sistemas de distribución de agua que resultan en las enfermedades de transmisión por agua. De hecho, recientemente se ha mostrado que los parásitos protozoarios *Cryptosporidium parvum* (ooquistes) y *Giardia lamblia* (quistes), así como los virus Poliovirus-1, PhiX174 y MS1, pueden adherirse a y persistir en la película del agua potable (Karim y colaboradores. Applied and environmental microbiology. 2008. 74(7): 2079-88). Además, tales parásitos y virus pueden transferirse desde la biopelícula a la fase de agua, confirmando que las biopelículas pueden actuar como una fuente de contaminación parasitaria y viral de los sistemas de distribución del agua y similares.

De este modo, la invención proporciona composiciones anti-bioincrustación para el tratamiento de parásitos y virus en sistemas expuestos al agua donde el desarrollo de la biopelícula y el crecimiento no es deseable.

Las composiciones anti-bioincrustación de una realización puede incluir adicionalmente uno o más de un compuesto antimicrobiano, un compuesto antiparasitario, un compuesto antiviral y un compuesto antifúngico. Una plétora de dichos compuestos está disponible y está limitada meramente en la medida en que deben ser compatibles con las nucleasas microbianas biológicamente activas. Dicha compatibilidad puede evaluarse y establecerse fácilmente por métodos rutinarios.

Con respecto a los compuestos antimicrobianos, se prefieren los compuestos no oxidantes. Tales compuestos actúan principalmente alterando la permeabilidad de la pared celular, interfiriendo de este modo con la delicada presión osmótica implicada en la respiración bacteriana y la transferencia de nutrientes a través de la membrana. La tasa de muerte de estos sofisticados agentes antimicrobianos es más lenta que la de los oxidantes pero proporciona protección a más largo plazo frente al organismo presente y los que surgan de otras fuentes de infección. Los nooxidantes tienen un espectro de actividad mas amplio y tienen buena compatibilidad con otros productos químicos de tratamiento de aguas.

Los no oxidantes biológicamente compatibles incluyen compuestos de la clase basada en fenol. Se pueden utilizar ésteres del ácido parahidroxi benzoico (Parabenos), tal como metil paraben, etil paraben, propil paraben, butil paraben y bencil paraben y combinaciones de los mismos. Las sales de sodio y potasio de parabenos permiten una mejor solubilidad en agua fría, y por lo tanto, compatibilidad con sistemas acuosos que no se pueden calentar.

Otros compuestos antibacterianos que pueden incluirse en las composiciones anti-bioincrustación de la invención incluyen uno o más de un aminoglicósido tal como gentamicina, kanamicina y estreptomycin; una beta-lactama tal como penicilina, ampicilina y imipenem; una cefalosporina tal como ceftazidima, una quinolona tal como ciprofloxacino; un macrólido tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina y telitromicina; una oxazolidinona tal como linezolid; una ansamicina tal como rifamicina; una sulfamida; una tetraciclina tal como doxiciclina; un glicopéptido tal como vancomicina; sulfisoxazol, trimetoprim, novobiocina, daptomicina y linezolid.

Los compuestos antiparasitarios que se pueden incluir las composiciones anti-bioincrustación de una realización incluyen los benzazoles (albendazol, mebendazol, tiabendazol, etc), los azoles (metronidazol, tinidazol, etc), macrociclos (amfotericina B, rifampina, ivermectina, etc.) y otros tales como pamoato de pirantel, dietilcarbamazina, niclosamida, praziquantel, melarsoprol y eflornitina.

Los compuestos virales que se pueden incluir en las composiciones anti-bioincrustación de una realización incluyen los inhibidores de transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (aciclovir, didanosina, stavudina, zidovudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina, entecavir, etc.), inhibidores sin recubrimiento (amantadina, rimantadina, pleconaril etc.), inhibidores de proteasa (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, etc.) y otros tales como zanamivir, oseltamivir, rifampina.

Los compuestos antifúngicos que se pueden incluir en las composiciones anti-bioincrustación de una realización incluyen un azol, tal como miconazol, ketoconazol, clorimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y abafungina; un macrociclo, tal como natamicina, rimocidina, filipin, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina; una alil amina tal como terbinafina, naftifina y butenaftina; una equinocandina tal como anidulafungina, caspofungina y micafungina; u otros tales como poligodial, ciclopirox, tolnaftato, ácido benzoico, ácido undecilénico, flucitosina y griseofulvina.

Aunque no limitan la invención, se mencionan a continuación diversos microbios que se pueden afectar por las composiciones anti-bioincrustación de nucleasa microbiana descritas aquí.

Las bacterias que pueden tratarse con las composiciones de la invención incluyen las siguientes: *Achrombacter sp.* incluyendo *Aerobacter aerogeus*; *Alicalignes sp.*; *Bacillus sp.* incluyendo *Bacillus cerius*, *Bacillus subtilis*; 5 *Beggiatoa sp.*; *Brevibacterium sp.*; *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter sp.*; *Clostridium sp.*; *Corynebacterium sp.*; *Crenothrix sp.*; *Desulfobacter sp.*; *Desulfovibrio sp.*; *Enterobacter.*; incluyendo *Enterobacter aerogeus*; *Escherichia sp.* Incluyendo *Escherichia coli.*; *Flavobacterium sp.*; *Gallionella sp.*; *Klebsiella sp.*; *Leptotrix sp.*; *Pseudomonas sp.* Incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas oleoverans*, *Pseudomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*; *Proteus sp.* Incluyendo *Proteus morganella*; *Proteus-Prov sp.*; *Salmonella sp.*; *Sarcina sp.*; *Serratia sp.* Incluyendo *Serratia marscens*; 10 *Shigella sp.*; *Sphaerotilus sp.*; *Staphylococcus sp.* Incluyendo *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus sp.*; *Thiobacillus sp.*; *Xanthomonas sp.*

Los hongos que se pueden tratar con las composiciones de la invención incluyen los siguientes. *Alternaria sp.*; *Amorphotheca sp.*; *Aspergillus niger*, *Aureobasidium sp.*; *Cephalosporium sp.*; *Chaetomium globosum*, *Cladosporium sp.*; *Fungi imperfecti*; *Fusarium sp.*; *Geotricum sp.*; *Gloeophyllum sp.*; *Lentinus sp.*; *Mucro sp.*; *Penicillium sp.*; *Phoma sp.*; *Rhizopus sp.*; *Saccharomyces sp.*; *Trichoderma sp.*; *Tricophyton sp.*; *Trichosporon sp.* 15

Las algas que se pueden tratar con las composiciones de la invención incluyen las siguientes. *Anabaena sp.*; *Anacystis sp.*; *Ankistrodesmus sp.*; *Ascomycetes*; *Basidiomycetes*; *Chlorella sp.*; *Calothrix sp.*; *Chlorococcum sp.*; *Coccomyxa sp.*; *Microcystis sp.*; *Nostoc sp.*; *Oscillatoria sp.*; *Pleurococcus*; *Phormidium sp.*; *Phordium luridum*; 20 *Scenedesmus sp.*; *Schizothrix sp.*; *Selenastrum sp.*; *Spirogyra sp.*; *Ulothrix sp.*

Las levaduras que se pueden tratar con las composiciones de la invención incluyen las siguientes. *Candida sp.*; *Rhodotorula sp.*; *Saccharomyces sp.*

Se apreciará fácilmente que los microbios existen en su entorno natural (más a menudo en un hábitat de biopelícula) en un amplio intervalo de condiciones y temperaturas. Por ejemplo, *Bacillus licheniformis* (por nombrar sólo uno) se encuentra a menudo, entre otros, en entornos de suelos, y puede crecer en las plumas de las especies de aves que habitan en el suelo y en zonas acuáticas. En consecuencia, las nucleasas que modifican la biopelícula de microbios deben necesariamente poder desempeñar su función biológica en un intervalo correspondientemente amplio de condiciones ambientales y temperaturas, y, además, dichas nucleasas deben estar adaptadas para actuar dentro del entorno relativamente restrictivo de la propia biopelícula. Como tal, las composiciones anti-bioincrustación de la invención se espera sean resistentes a las fluctuaciones en las condiciones de operación y encontrarán utilidad, por tanto, a través de un amplio espectro de aplicaciones diferentes y en combinación con una amplia gama de excipientes, siempre que tales excipientes proporcionados sean biológicamente compatibles que puede ser fácilmente evaluado por métodos de rutina. 25 30

Como se ha descrito anteriormente para aplicaciones médicas, el alcance de la disrupción de la biopelícula en las aplicaciones anti-bioincrustación, se puede modular, según se requiera, por la dosis del componente de desoxirribonucleasa microbiana de la composición. Además, la dosis del componente de desoxirribonucleasa microbiana dependerá de la aplicación particular y puede evaluarse por métodos de rutina. 35

Como se ha descrito también anteriormente para aplicaciones médicas, una cualquiera de las desoxirribonucleasas microbianas (o cualquier combinación de las mismas) de las composiciones anti-bioincrustación descritas aquí se pueden recubrir o fijar a una superficie susceptible de formar una biopelícula para prevenir dicha formación. Las técnicas de derivatización de la superficie y de fijación son bien conocidas en la técnica, como se ha descrito anteriormente, y las personas expertas pueden evaluar fácilmente la idoneidad de las superficies para dicha fijación. 40

Las nucleasas microbianas pueden expresarse por medios recombinantes y purificarse para su uso en las composiciones.

Los polinucleótidos que codifican las desoxirribonucleasas microbianas se pueden insertar en cualquier vector de expresión apropiado conocido en la técnica. El término vector de expresión se refiere a una construcción genética tal como un plásmido, virus u otro vehículo conocido en la técnica que puede ser modificado genéticamente para contener un polinucleótido que codifica una nucleasa microbiana. Tales vectores de expresión son típicamente plásmidos que contienen una secuencia promotora que facilita la transcripción de la secuencia genética insertada en una célula huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, y un promotor, así como genes que permiten la selección fenotípica de las células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Se pueden emplear diversos promotores apropiados, incluyendo promotores inducibles y constitutivos, conocidos en la técnica. 45 50

La transformación o transfección de una célula huésped con un polinucleótido se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede facilitar la captación de DNA utilizando los métodos de CaCl_2 , MgCl_2 o RbCl conocidos en la técnica. Alternativamente, se pueden utilizar medios físicos, tales como electroporación o microinyección. La electroporación permite la transferencia de un 55

polinucleótido a una célula mediante un impulso eléctrico de alto voltaje. Además, los polinucleótidos se pueden introducir en las células huésped por fusión de protoplastos, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Se podría utilizar DNA desnudo (por ejemplo, DNA de plásmido desnudo). La introducción de una construcción que comprende un polinucleótido que codifica una nucleasa microbiana en la célula huésped se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por Dextrano DEAE, o electroporación (Davis, L. y colaboradores. 1986. Basic Methods in Molecular Biology). Uno de tales protocolos para la expresión de nucleasas microbianas implica *Bacillus subtilis* y se describe en los siguientes ejemplos.

Cualquiera de los diversos métodos conocidos en la técnica para la purificación de proteínas se puede utilizar para aislar las nucleasas microbianas expresadas. Por ejemplo, se pueden utilizar separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas (tales como aquellas que emplean anticuerpos monoclonales y policlonales). Los péptidos portadores pueden facilitar el aislamiento de las proteínas de fusión que incluyen nucleasas microbianas. Los marcadores de purificación pueden estar unidas operativamente a un polipéptido de nucleasas microbianas. Por ejemplo, la glutationa-S-transferasa (GST) permite la purificación con una columna de afinidad de glutationa agarosa. Cuando se usa la proteína A o el dominio ZZ del *Staphylococcus aureus* como marcador, la purificación se puede llevar a cabo en una sola etapa utilizando una columna de afinidad de IgG-sefarosa (RTM). Los marcadores de purificación pueden separarse posteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen específicamente a los polipéptidos de nucleasa microbiana en métodos convencionales de purificación. Las técnicas para producir dichos anticuerpos son bien conocidas en la técnica.

La producción a escala industrial de proteínas se puede lograr mediante métodos de rutina conocidos en la técnica tales como fermentación y similares. Las células huésped comunes utilizadas para dicha producción incluyen *E. coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae*.

EJEMPLOS

Se sabe que el entorno aislado de *Bacillus licheniformis* (EI-34-6), que se aisló de la superficie del alga marina *Palmaria palmata*, produce los metabolitos secundarios específicos bacitracina y pulcherrimina cuando se cultiva en un biorreactor AMS (Yan y colaboradores. 2003. Applied and Environmental Microbiology 69: 3719-3727; Nijland y colaboradores. 2009, presentado). Las bacterias se cultivaron en membranas semipermeables dentro del biorreactor permitiendo la formación de una biopelícula en la interfase aire-sólido. Los compuestos antibióticos se liberaron en el medio por debajo de las membranas utilizando este biorreactor particular, pero no cuando se cultivaron planctónicamente en matraces de agitación estándar (Yan y colaboradores. 2003. Applied and Environmental Microbiology 69: 3719-3727).

Cuando esta cepa se cultivó en un reactor de AMS se produjo también un compuesto(s) desconocido capaz de dispersar las biopelículas bacterianas de varias bacterias gram positivas y gram negativas. Los inventores actuales encontraron que cuando el medio antibiótico de la cepa EI-34-6 del *Bacillus licheniformis* se añadió al medio donde la película microbiana objetivo estaba creciendo, se indujo una respuesta fisiológica en la cepa bacteriana objetivo que condujo a la disrupción de la cepa objetivo de sus biopelículas. Se encontró que este fenómeno de disrupción ocurría en biopelículas derivadas de cepas bacterianas objetivo gram negativas pero también, sorprendentemente, en cepas bacterianas objetivo gram positivas (es decir, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Micrococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli* y varios aislamientos marinos desconocidos).

Después de un fraccionamiento guiado por un bioensayo y la toma de la huella peptídica por LC-MS-MS, se identificaron dos compuestos específicos responsables de la actividad de disrupción de la biopelícula. Se mostró que estos compuestos son una DNasa secretada (NucB) y una RNasa secretada (Barnase) que conducen a la realización de que los microbios pueden modificar activamente la biopelícula mediante la digestión de componentes extracelulares de DNA y RNA de la biopelícula utilizando enzimas endógenas de nucleasa.

Ejemplo 1

Detección de la actividad de disrupción de la biopelícula ayudada por el fraccionamiento guiado por bioensayo.

Las fracciones del sobrenadante que tienen la actividad de disrupción de la biopelícula se identificaron como se describe a continuación.

La cepa EI-34-6 de *B. licheniformis* se cultivó durante 7 días en un biorreactor AMS como se describió previamente (Yan y colaboradores. 2003. Applied and Environmental Microbiology 69: 3719-3727) en un medio NGF (caldo nutritivo (Oxoid) 13g/l, 1% de glicerol, FeCl₂ 1mM). El medio de cultivo por debajo de la membrana del filtro se recogió, se centrifugó a 7.800rpm durante 10 minutos y se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0,25µ para asegurar la esterilidad.

Las proteínas en el filtrado estéril resultante (sobrenadante de AMS) se concentraron 50 veces por precipitación con TCA (Sigma, UK) como sigue. Se añadió una solución de TCA al 100% hasta una concentración final del 15% y la mezcla se conservó en hielo durante 30 minutos antes de centrifugar las proteínas precipitadas durante 10 minutos a

7.800rpm en tubos Falcon de 50ml. Los gránulos se lavaron dos veces utilizando etanol al 96% enfriado en hielo, y secado al aire durante 30 minutos a 45°C. Los gránulos se disolvieron en 1:50 del volumen original con tampón Tris-HCL 0,05 M (pH 7,0).

5 El concentrado se fraccionó utilizando una columna de filtración en gel de Superose 12 (RTM) (GE Healthcare Life Sciences) (*altura 40 cm, diámetro 3 cm*) utilizando agua ultrapura como medio de soporte y se recogieron fracciones de 12ml cada una.

10 Las fracciones resultantes de esta etapa se ensayaron después para determinar la actividad de disrupción de la biopelícula en una instalación de placas de microtitulación de 96 pocillos, utilizando el crudo del sobrenadante de AMS de la cepa EI-34-6 de *B. licheniformis* como un control positivo y H₂O como control negativo. El ensayo de actividad se describe como sigue.

15 La actividad de disrupción de la biopelícula se ensayó utilizando placas de cultivo de tejido de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (BD-Falcon, USA). La cepa DSM13 del *Bacillus licheniformis* se cultivó durante 48-96h en medio LB (VWR, UK) a 37°C en una incubadora de agitación y se diluyó 1:100 en LB fresco. Se añadieron 200µl de este cultivo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos, y la placa se incubó a 37°C durante 20-28h para permitir el desarrollo de la biopelícula como un anillo en la interfase líquido-aire. Los compuestos de disrupción de la biopelícula se añadieron en concentraciones variables y la placa se incubó adicionalmente durante 1 hora a 37°C. Todas las células no unidas se eliminaron lavando la placa 4 veces en un recipiente que contenía agua del grifo. Las biopelículas unidas se tiñeron mediante la adición de 250µl de violeta de cristal (CV) a cada pocillo de la placa durante 10 minutos. El CV se eliminó por pipeteado y la placa se lavó otra vez en un recipiente que contenía agua del grifo hasta que no se observó ningún CV adicional que se disolviera en el agua. Las placas se secaron y se añadieron 250µl de etanol al 96% que contenía un 2% de ácido acético a cada pocillo. La adsorción a 595nm se midió utilizando un lector de placas óptico Fluostar (BMG Labtech, UK), y los datos se analizaron utilizando el paquete de software MARS (BMG Labtech, UK) y Microsoft Excel.

25 Las proteínas en la fracción activa se concentraron otra vez mediante la precipitación con TCA y se analizaron mediante SDS-PAGE.

30 La fracción del fraccionamiento por filtración en gel de Superose 12 (RTM) que mostró actividad en el ensayo de disrupción de la biopelícula se concentró 10x en solución Tris-HCL 50mM y se separó en un gel PAGE nativo (Invitrogen, UK). El gel se cortó en 5 piezas, se rompió en fragmentos pequeños haciéndolo pasar a través de una jeringa como se describió, y se permitió que las proteínas se difundieran del gel durante 1h a temperatura ambiente. La fracción líquida se recogió y se añadió a las biopelículas establecidas como se describió anteriormente para el ensayo de actividad.

Los ejemplos de la actividad de disrupción de la biopelícula en el fraccionamiento por filtración en gel de Superose 12 (RTM) se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

35 Identificación de las proteínas específicas en una fracción de la disrupción de la biopelícula mediante la toma de la huella peptídica

Después de las etapas de fraccionamiento, purificación y bioensayo indicadas anteriormente, se identificaron tres bandas de proteínas en el gel que corresponden a la fracción activa como se describe con más detalle a continuación.

40 La fracción de la filtración en gel de Superose 12 (RTM) (GE Healthcar Life Sciences) que tiene actividad de disrupción de la biopelícula se concentró 10x mediante la precipitación con TCA como se describió anteriormente (Nijland R, Lindner C, van Hartkamp M, Hamoen LW, Kuipers. OP 2007., J Biotechnol. 127(3): 361-72) y se separó en un gel de Tris-Tricina 4-12% utilizando tampón MES (Invitrogen, UK). Se cargó también un estándar de proteína Novex Sharp Prestained (Invitrogen, UK) para determinar el tamaño de la proteína. Después de la electroforesis, el gel se tiñó utilizando Biosafe Coomassie (Biorad, UK) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tres bandas fueron visibles en el gel, 1 banda abundante a 12kD y dos bandas más altas alrededor de 30 y 36kD (véase Figura 2).

50 Estas tres bandas se analizaron mediante LCMS después de la digestión triptica en gel como sigue. La pieza de gel cortada se puso en un pequeño volumen de NH₄HCO₃ pH 7,8 y se trituró en trozos pequeños. Las piezas de gel se lavaron con acetonitrilo al 60% y se lavaron con NH₄HCO₃ pH 7,8 antes de la reducción en 50µl de DTT 10mM en NH₄HCO₃ 100mM durante 1 hora a 56°C. Después, las cisteínas se alquilaron mediante la adición de 50µl de iodoacetamida 50 mM en NH₄HCO₃ 100mM preparado recientemente e incubación en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las piezas de gel se lavaron repetidamente con NH₄HCO₃ 100mM y acetonitrilo al 50%, se deshidrataron utilizando 70 µl de acetonitrilo al 100%. Las proteínas se digirieron en gel con 8 ng de tripsina (Promega) en NH₄HCO₃ 50mM, CaCl₂ 1 mM y se incubó durante la noche, agitando en un termomezclador a 37°C. La digestión se detuvo mediante la adición de 5% de TFA y la solución que contiene los péptidos se transfirió a un tubo nuevo. Las piezas de gel se lavaron dos veces con acetonitrilo al 60% conteniendo un 2% de TFA y los lavados

se juntaron con el sobrenadante acuoso después de la digestión. El volumen de las digestiones se redujo a 10 µl en un concentrador SpeedVac y 1 µl de éste se analizó por LCMSMS.

Los péptidos se concentraron en una columna de trampa C-18 Pepmap (300 µm ID x 5 mm) y se separó en una columna de fase reversa C18 Pepmap (Dionex, UK) (partículas de 3 µm, 75 µm ID x 250 mm) utilizando un gradiente lineal durante 42 minutos de 96% A (ácido fórmico 0,05%), 4% B (ácido fórmico 0,05%, acetonitrilo 80%) a 35% A, 65% B y una velocidad de flujo de 300 nl/min.

El voltaje de pulverización fue 1,6 kV y la temperatura del capilar calentado se estableció en 200°C. Se adquirieron exploraciones de estudio con el bloqueo de masas activado de 400-1600 Da a una resolución de 30.000 a m/z 400 después de la acumulación de 5x10⁵ iones. Los 10 iones más intensos de las exploraciones de estudio se secuenciaron simultáneamente a la adquisición de la exploración completa en el espectrómetro de masas Orbitrap por disociación inducida por colisión en el LTQ (CID, energía de colisión normalizada 35%). Los tiempos máximos de llenado fueron 50 ms para las exploraciones completas y 100 ms para las exploraciones MSMS. Se activó la detección del estado de carga de los iones precursores y se rechazaron los estados de carga no asignados y los iones cargados individualmente. La exclusión dinámica se activó durante 180s con una lista de exclusión dinámica máxima de 50 entradas y una ventana de masa relativa de - 0,5 a + 1 Da.

Los datos brutos se transformaron en lista de picos en el formato de archivo genérico mascota (*.mgf) utilizando ProteinExplorer, versión 1.0 y la configuración predeterminada. Los archivos Mgf se sometieron al motor de búsqueda X!Tandem utilizando la interfaz gpm (www.thegpm.org) y los siguientes parámetros: digestión triptica con hasta un sitio de ruptura perdido, tolerancia del ión precursor ± 20 ppm, tolerancia del ión producto 0,6 Da, carboxamidometilación de Cys como una modificación fija y Oxidación de Met como unas modificaciones variables. Las siguientes modificaciones variables adicionales se consideraron en dos etapas de refinamiento: fosforilación de Ser, Thr y Tyr, oxidación de Met y Trp, metilación de Cys, Asp, Glu, His, Lys y Arg y desaminación de Asn y Gln en la primera etapa de refinamiento y di-oxidación de Met y Trp, deshidratación de Ser y Thr, falta de carboxamidometilación de Cys, metilación de Asn y Gln, carboxamidometilación de Lys, His, Glu y Asp en la segunda etapa de refinamiento. Se realizaron búsquedas en las siguientes bases de datos: NCBI NC_006270.faa 2008.04.22 (Bacillus_licheniformis_ATCC_14580), NCBI NC_006322.faa 2008.04.22 (Bacillus_licheniformis_DSM_13), NCBI NC_000964.faa 2008.04.22 (Bacillus_subtilis) y el depósito común para proteínas adventicias (cRAP) versión 2009.05.01.

La banda más baja, cortada aproximadamente a 12kD, contenía dos proteínas pequeñas, ambas de ellas nucleasas. La proteína más abundante fue Barnase (etiqueta del locus: BL03601), una ribonucleasa secretada, y la otra proteína fue NucB (etiqueta del locus: BL00126), una desoxirribonucleasa secretada.

La segunda banda, cortada aproximadamente a 30kD, contenía tres proteínas diferentes. La proteína más abundante fue la proteína YckK (etiqueta del locus: BL01829) de la familia de enlace de soluto. También estaba presente el transportador ABC de betaína de glicina (opuAC; etiqueta de locus: "BL01556") y la ribonucleasa presente en la banda de 12 kD. La tercera bana, cortada aproximadamente a 36kD contenía tres proteínas diferentes. La proteína más abundante fue otra vez el transportador ABC de betaína de glicina. También estaba presente una proteína de unión al sustrato del sistema de transporte ABC y probablemente también la proteína putativa de unión al soluto extracelular YckB (etiqueta del locus: BL01818).

Basándose en estos resultados los dos candidatos más probables para tener actividad de disrupción de la biopelícula fueron Barnase y NucB. NucB se eligió para un estudio posterior.

Ejemplo 3

Clonación y sobre expresión de NucB de *B. licheniformis* en NZ8900 de *Bacillus subtilis*

Los cebadores se diseñaron para amplificar el gen de nucleasa NucB basado en la secuencia de genomas publicada de DSM13 de *B. licheniformis* (ATCC14580) (Rey y colaboradores. 2004. Genome Biology, 5 (10)).

Los cebadores se diseñaron para amplificar para amplificar el gen nucB de EI-34-6 del DNA cromosomal de *Bacillus licheniformis* basado en la secuencia conocida de la cepa DSM13 (Banco de genes: AE017333.1) (Véase la Tabla 1 a continuación).

El gen NucB se amplificó con éxito a partir de EI-34-6 del DNA cromosomal de *B. licheniformis* y se clonó en el vector de expresión SURE pNZ8901 (véase Figura 3) utilizando *E. coli* como huésped intermedio como se describe a continuación.

La reacción para amplificar *nucB* no produjo una sola banda, pero una banda débil estaba presente en el tamaño correcto. Esta banda se aisló del gel de agarosa (kit de aislamiento de gel Invitrogen) y se usó como plantilla para una nueva PCR.

El gen amplificado se digirió utilizando *Eco91I*, *XbaI* (*nucB*) y se unió en un vector igualmente digerido pNZ8901 (CmR). La mezcla de unión se transformó a MC1061 de *E. coli* utilizando el CaCl₂ como se describió antes

(Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Cold Spring Harbour, NY). Las colonias se seleccionaron utilizando PCR de colonias con los cebadores únicos mencionados anteriormente y se aislaron plásmidos de clones positivos. Los plásmidos se analizaron por digestión de restricción y se secuenciaron los plásmidos correctos.

- 5 El plásmido construido se transformó en NZ8900 de *Bacillus subtilis* (Bongers RS, Veening JW, Van Wieringen M, Kuipers OP, Kleerebezem M. 2005. Appl. Environ Microbiol. 71(12): 8818-24) utilizando la competencia natural como se describió anteriormente (Spizizen J. 1958. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 44: 1072-1078).

El vector se puede transformar con éxito en la cepa de expresión SURE NZ8900 de *B. subtilis*.

- 10 Los clones correctos NZ8900 + pNZ8901/2-nucB de *B. subtilis* se examinaron en el ensayo de agar de DNasa que contenía el verde de metilo (Oxoid) como sigue. Una colonia se coloreó sobre el ensayo de agar de DNasa y se cultivó O/N a 30°C. A la mañana siguiente una gota de inductor de sobrenadante del cultivo de ATCC6633 de *B. subtilis* en 1% de agar se colocó junto a la colonia. Las placas se incubaron adicionalmente durante 2 horas a 37°C y las colonias que desarrollaron un halo debido a la degradación del DNA se consideraron positivas y se transfirieron a un matraz con agitación que contenía LB y los antibióticos apropiados (Kanamicina y Cloranfenicol/Eritromicina). A una OD₆₀₀ de ~ 1,0 se añadió un 10% del sobrenadante de ATCC6633 para inducir la expresión y el sobrenadante del cultivo total se cosechó 2 horas después de la inducción. La sobreproducción de NucB se visualizó en SDS-PAGE después de la concentración de 10x sobre la precipitación con TCA como se describió anteriormente.

Ejemplo 4

- 20 Secuenciación del gen *nucB* de EI-34-6 de *B. licheniformis*

Después de la amplificación con éxito de *nucB* a partir del cromosoma EI-34-6 de *B. licheniformis*, como se describió anteriormente, el gen se secuenció para identificar las diferencias potenciales con la cepa secuenciada (DSM13). *nucB* (22 pares de bases de los 428 pares de bases totales = 5,1%) contenía sustituciones de pares de bases, dando lugar a 4 cambios de aminoácidos en la proteína NucB (véase Figura 4).

- 25 Ejemplo 5

Ensayo del NucB sobreproducido heterológamente para las actividades de DNasa y disrupción de la biopelícula

- 30 El sobrenadante de NZ8900 de *B. subtilis* que contenía la construcción de sobreexpresión inducida de *nucB* (como se describió en el Ejemplo 3) se ensayó para determinar su capacidad para dispersar las biopelículas establecidas en el ensayo de disrupción de la biopelícula descrito en el Ejemplo 1. El sobrenadante fue capaz de dispersar las biopelículas funcionales en concentraciones de hasta 3 ng/ml. La concentración de la proteína *nucB* presente en el sobrenadante se cuantificó después de la separación de proteínas por SDS-PAGE y visualización utilizando métodos estándar.

- 35 En un ensayo de disrupción se comparó la eficacia de la disrupción de NucB y de la DNasa bovina obtenida comercialmente. Basándose en este ensayo se demostró que NucB tenía la capacidad para dispersar completamente una biopelícula establecida a una concentración 5 veces menor (peso/volumen) que la DNasa. Por ejemplo, la disrupción del 100% de la biopelícula se puede observar con DNasa sólo a concentraciones de 15 ng/ml y mayores. En contraste, sin embargo, una actividad de disrupción de la biopelícula del 100% se pudo observar con NucB a concentraciones tan bajas como 3 ng/ml (véase Figura 5).

- 40 La actividad de la DNasa se ensayó mediante la incubación de DNA del plásmido purificado con la DNasa que contenía fracciones de 30 minutos a 37°C. Las muestras se cargaron en un gel de agarosa para visualizar la degradación del DNA.

- 45 El sobrenadante AMS de EI-34-6 de *B. licheniformis* se ensayó para la dispersión de las biopelículas que crecen en varias superficies. En todas las condiciones ensayadas el sobrenadante AMS fue capaz de eliminar la biopelícula bacteriana. Las superficies ensayadas incluyen plástico (placas de 96 y 24 pocillos de microtitulación de poliestireno), vidrio (botellas de vidrio de borosilicato y portaobjetos de microscopio de vidrio) y acero (cupones y pasadores de acero inoxidable).

- 50 Se ensayó la actividad de la biopelícula que dispersa nucleasas, cuando se diluyó a un máximo de 1000 veces, ya sea en agua desmineralizada, medio de crecimiento LB, tampón de reacción de DNasa I que contiene cloruro de magnesio y cloruro de calcio (Fermentas), y mezcla de los anteriores. En todas las condiciones, se encontró actividad de dispersión de la biopelícula.

También se ensayó la Benzonasa (RTM) para la actividad de disrupción de la biopelícula y se encontró también que es altamente eficaz. La Benzonasa (RTM) es una nucleasa genéticamente modificada con actividad de desoxirribonucleasa derivada de *Serratia marcescens*, una bacteria gram-negativa de la familia de Enterobacteriaceae.

Ejemplo 6

Visualización de la actividad de disrupción de la biopelícula de NucB

Las biopelículas con matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) se ensayaron para la actividad de disrupción de la biopelícula de NucB.

- 5 La matriz EPS de biopelículas de *Pseudomonas* se expusieron a enzimas NucB purificadas usadas a 3 ng/ml. Después se tomaron imágenes de contraste de fase de una hora utilizando un aumento 40x (Leica). Las imágenes se presentan en la Figura 11 mostrando el efecto de NucB en la dispersión de la biopelícula (panel inferior) en comparación con las muestras no tratadas (panel superior).

Ejemplo 7

- 10 Efecto de la actividad de disrupción de la biopelícula de NucB en una gama de biopelículas microbianas

Varias biopelículas microbianas se ensayaron para la actividad de disrupción de la biopelícula de NucB.

Las biopelículas derivadas de una gama de microbios (*Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, *B. Licheniformis DSM13*, *Arthrobacter sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.* y *levadura*) se expusieron a la enzima NucB purificada utilizada a 3 ng/ml. La actividad de dispersión de la biopelícula se midió después de una hora.

- 15 Como se muestra en la Figura 12, una desoxirribonucleasa de unas especies microbianas tiene una excelente actividad de dispersión de la biopelícula frente a biopelículas derivadas de una gama de otros microbios dispares.

Ejemplo 8

Efecto de la actividad de disrupción de la biopelícula de NucB en superficie de lentes de contacto

- 20 Se ensayó la capacidad de NucB para dispersar una biopelícula natural mezclada de la superficie de unas lentes de contacto.

Una biopelícula natural mezclada establecida en la superficie de una estructura de lentes de contacto se expuso a la enzima NucB purificada utilizada a 3 ng/ml. La actividad de dispersión de la biopelícula se midió después de una hora.

- 25 Como se muestra en la Figura 13, la NucB posee una excelente actividad de dispersión de la biopelícula frente a una superficie de lentes de contacto ensuciada. Un aumento en bacterias por ml liberadas de las lentes indica una descomposición de la nucleasa de la biopelícula en las lentes.

Tabla 1

Secuencia del cebador utilizado para amplificar el gen *nucB* del DNA cromosomal de EI-34-6 de *Bacillus licheniformis* basado en la secuencia conocida de la cepa DSM13.

Descripción del cebador	Secuencia del cebador (5' a 3')	SEQ ID No.
Cebador directo nucB + sitio de restricción BstI	ATAGGTGACCGTCATGATCAAAAAATGGGCGGTT CATCTGC	6
Cebador inverso nucB + sitio de restricción XbaI	ATCTCTAGATATTTGTTTTTCGCCTTTTATTG	7

30

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF NEWCASTLE UPON TYNE

5 <120> Compuestos y métodos para la disrupción y prevención de biopelículas

<130> P100724WO01

<150> GB 10 02396.8

10 <151> 12-02-2010

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 429

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

20

<400> 1

atgatcaaaa aatgggCGGT tcatctgctg ttttccgcat tggTgctgct tgggctttcg 60

ggaggggctg catattctcc tcagcatgcc gaaggcgctg caaggtatga tgacgtattg 120

tattttccgg catcgcgcta tcctgaaacc ggcgctcata taagcgacgc gatcaaagcg 180

ggccatgcag atgtctgcac aattgaaaga tcgggagcgg ataagcgccg tcaggaatca 240

ttaaagggga ttccgaccaa gccgggcttt gaccgtgacg aatggccgat ggccatgtgt 300

gaagaagggg gaaaaggagc gtctgtcaga tatgtcagct catcggataa ccgcggagcc 360

ggttcctggg tcgggaacag gctgaacggt tacgctgacg ggacgagaat tttgtttatc 420

gttcaataa 429

<210> 2

25

<211> 429

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

<400> 2

atgatcaaaa aatgggCGGT tcatctgctg ttttccgcat tggTactgct tgggctttcg 60

ggagcgccg catattctcc tcagcatgcc gaaggTgctg caaggtatga cgacatattg 120

tattttccgg catcAcgcta tcccgaacc ggcgctcata tcagcgacgc aatcaaagca 180

gggcattcag atgtctgcac gattgaaaga tcgggagcgg ataagcgccg ccaggaatca 240

ctgaagggga ttccgactaa gccgggcttt gaccgtgacg aatggccgat ggccatgtgt 300

gaagaagggg gcaaaggagc gtctgtcaga tatgtcagct catcggataa ccgcggagcc 360

ggctcctggg tcgggaacag gctgagcggT ttcgccgacg ggacgagaat tttgtttatc 420

30

gttcaataa 429

<210> 3

<211> 142

<212> PRT

35

<213> Bacillus licheniformis

<400> 3

ES 2 645 376 T3

Met Ile Lys Lys Trp Ala Val His Leu Leu Phe Ser Ala Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Ser Pro Gln His Ala Glu Gly
20 25 30

Ala Ala Arg Tyr Asp Asp Val Leu Tyr Phe Pro Ala Ser Arg Tyr Pro
35 40 45

Glu Thr Gly Ala His Ile Ser Asp Ala Ile Lys Ala Gly His Ala Asp
50 55 60

Val Cys Thr Ile Glu Arg Ser Gly Ala Asp Lys Arg Arg Gln Glu Ser
65 70 75 80

Leu Lys Gly Ile Pro Thr Lys Pro Gly Phe Asp Arg Asp Glu Trp Pro
85 90 95

Met Ala Met Cys Glu Glu Gly Gly Lys Gly Ala Ser Val Arg Tyr Val
100 105 110

Ser Ser Ser Asp Asn Arg Gly Ala Gly Ser Trp Val Gly Asn Arg Leu
115 120 125

Asn Gly Tyr Ala Asp Gly Thr Arg Ile Leu Phe Ile Val Gln
130 135 140

<210> 4

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<400> 4

Ala Arg Tyr Asp Asp Val Leu Tyr Phe Pro Ala Ser Arg Tyr Pro Glu
1 5 10 15

Thr Gly Ala His Ile Ser Asp Ala Ile Lys Ala Gly His Ala Asp Val
20 25 30

Cys Thr Ile Glu Arg Ser Gly Ala Asp Lys Arg Arg Gln Glu Ser Leu
35 40 45

Lys Gly Ile Pro Thr Lys Pro Gly Phe Asp Arg Asp Glu Trp Pro Met
50 55 60

Ala Met Cys Glu Glu Gly Gly Lys Gly Ala Ser Val Arg Tyr Val Ser
65 70 75 80

10 Ser Ser Asp Asn Arg Gly Ala Gly Ser Trp Val Gly Asn Arg Leu Asn
85 90 95

Gly Tyr Ala Asp Gly Thr Arg Ile Leu Phe Ile Val Gln
100 105

<210> 5

<211> 142

15 <212> PRT

ES 2 645 376 T3

<213> Bacillus licheniformis

<400> 5

Met Ile Lys Lys Trp Ala Val His Leu Leu Phe Ser Ala Leu Val Leu
1 5 10 15

Leu Gly Leu Ser Gly Gly Ala Ala Tyr Ser Pro Gln His Ala Glu Gly
20 25 30

Ala Ala Arg Tyr Asp Asp Ile Leu Tyr Phe Pro Ala Ser Arg Tyr Pro
35 40 45

Glu Thr Gly Ala His Ile Ser Asp Ala Ile Lys Ala Gly His Ser Asp
50 55 60

Val Cys Thr Ile Glu Arg Ser Gly Ala Asp Lys Arg Arg Gln Glu Ser
65 70 75 80

Leu Lys Gly Ile Pro Thr Lys Pro Gly Phe Asp Arg Asp Glu Trp Pro
85 90 95

Met Ala Met Cys Glu Glu Gly Gly Lys Gly Ala Ser Val Arg Tyr Val
100 105 110

Ser Ser Ser Asp Asn Arg Gly Ala Gly Ser Trp Val Gly Asn Arg Leu
115 120 125

Ser Gly Phe Ala Asp Gly Thr Arg Ile Leu Phe Ile Val Gln
130 135 140

5

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

10

<400> 6

ataggtgacc gtcgatgca aaaaatgggc gggtcatctg c 41

<210> 7

15

<211> 32

<212> DNA

<213> Bacillus licheniformis

<400> 7

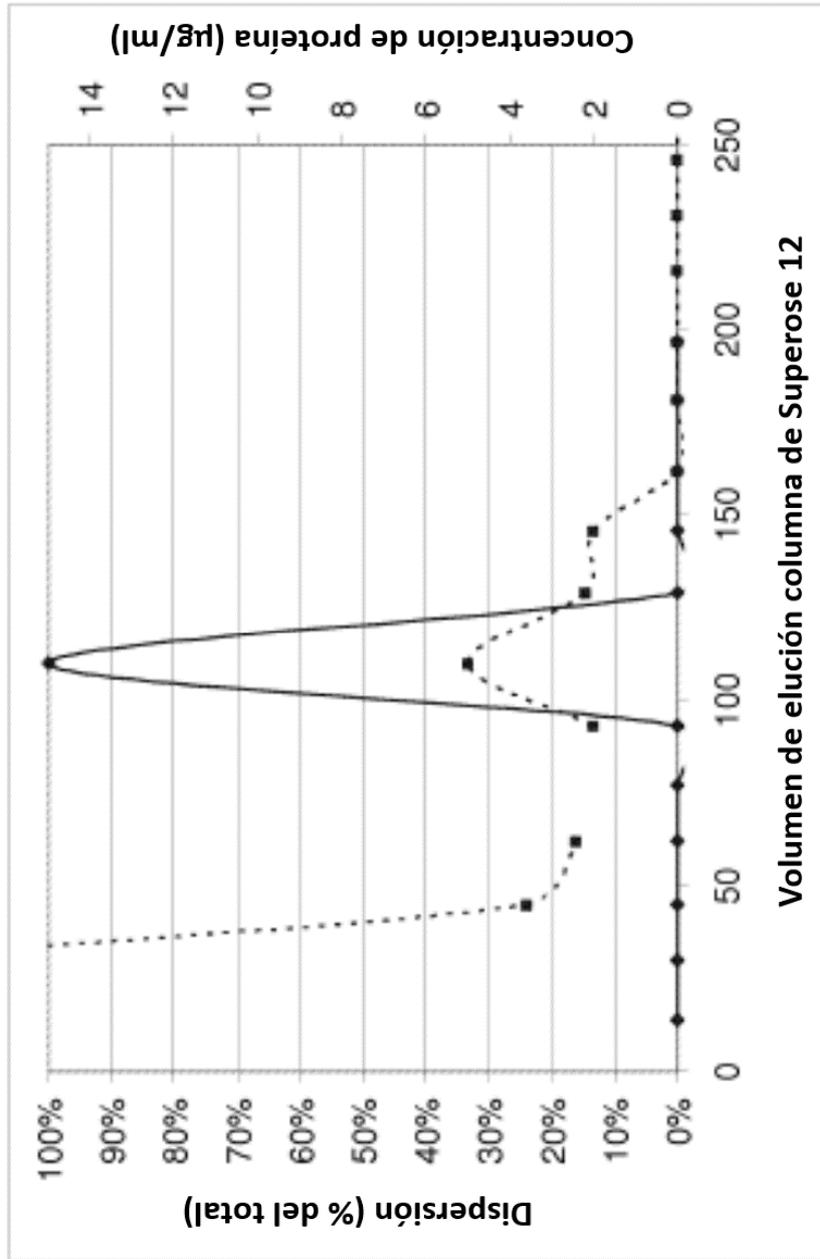
20 atctctagat attgttttt cgcctttat tg 32

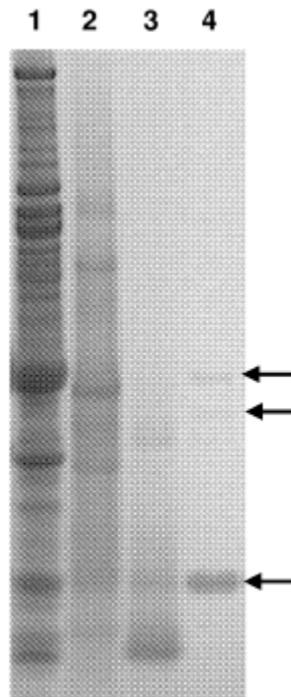
REIVINDICACIONES

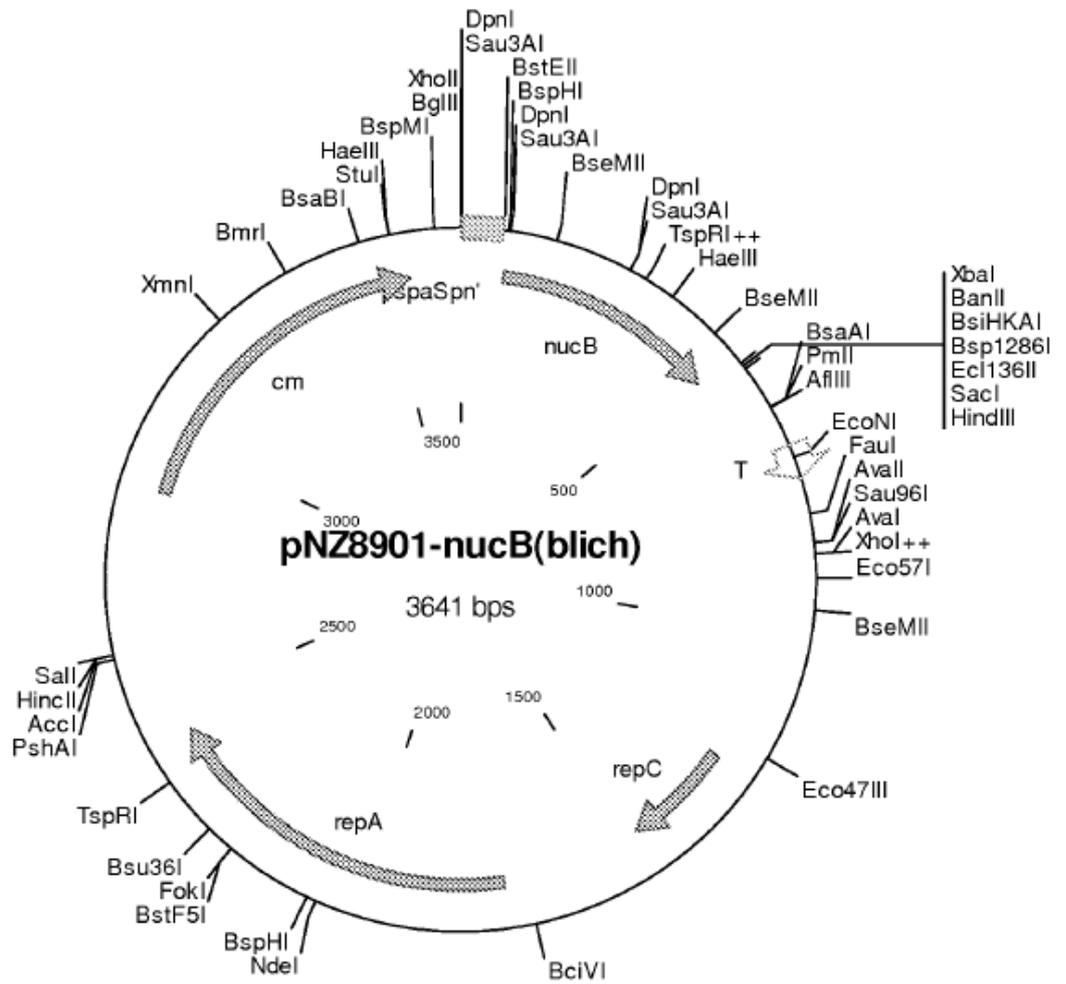
- 5 1. Una composición farmacéutica o anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula o la prevención de la formación de la biopelícula que comprende un polipéptido de desoxirribonucleasa microbiana aislada y un excipiente, en donde la desoxirribonucleasa microbiana es una desoxirribonucleasa bacteriana de clase Bacillus.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la desoxirribonucleasa microbiana es una desoxirribonucleasa bacteriana de Bacillus licheniformis.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde la desoxirribonucleasa microbiana es una desoxirribonucleasa bacteriana de la cepa EI-34-6 de Bacillus licheniformis.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la desoxirribonucleasa microbiana es una desoxirribonucleasa NucB.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la desoxirribonucleasa es la desoxirribonucleasa NucB de la cepa EI-34-6 de Bacillus licheniformis definida por SEQ ID NO. 4 o una desoxirribonucleasa que es al menos un 90% idéntica a la misma.
- 15 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición se formula como un líquido, loción, crema, aerosol, gel, pomada, jabón en polvo, o solución de limpieza.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha composición se formula como pasta dental, un líquido dentífrico, un enjuague bucal, un trocisco o una pomada de masaje gingival.
- 20 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más de un compuesto antimicrobiano, tal como un compuesto antibacteriano, un compuesto antiparasitario, un compuesto antifúngico y un compuesto antiviral.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde el compuesto antiparasitario es uno o más de un benzazol, tal como albendazol, mebendazol y tiabendazol; un azol, tal como metronidazol y tinidazol; un macrociclo, tal como anfotericina B, rifampina e ivermectina; pamoato de pirantel; dietilcarbamazina; niclosamida; praziquantel; melarsoprol; y eflornitina.
- 25 10. La composición de la reivindicación 8, en donde el compuesto antiviral es uno o más de un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleótido, tal como aciclovir, didanosina, estavudina, zidovudina, lamivudina, abacavir, emtricitabina y entecavir; un inhibidor no recubierto tal como amantadina, rimantadina y pleconaril; un inhibidor de proteasa tal como saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir y amprenavir; zanamivir; oseltamivir; y rifampina.
- 30 11. La composición de la reivindicación 8, en donde el compuesto antibacteriano es uno o más de un aminoglicósido tal como gentamicina, kanamicina y estreptomina; una beta-lactama tal como penicilina, ampicilina y imipenem; una cefalosporina tal como cetazidima, una quinolona tal como ciprofloxacino; un macrólido tal como azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina y telitromicina; una oxazolidinona tal como linezolid; una ansamicina tal como rifamicina; una sulfonamida; una tetraciclina tal como doxiciclina; un glicopéptido tal como vancomicina; sulfisoxazol, trimetoprim, novobiocina, daptomicina y linezolid.
- 35 12. La composición de la reivindicación 8, en donde el compuesto antifúngico es uno o más de un azol, tal como miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y abafungina; un macrociclo, tal como natamicina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina, hamicina; una alilamina tal como terbinafina, naftifina y butenafina; una equinocandina tal como andidulafungina, caspofungina y micafungina; u otros tales como poligodial, ciclopirox, tolnaftato, ácido benzoico, ácido undecilénico, flucitosina y griseofulvina.
- 40 13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una composición farmacéutica para la administración a un paciente animal, preferiblemente a un paciente mamífero, más preferiblemente a un ser humano.
- 45 14. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición es una composición anti-bioincrustación y el compuesto antibacteriano es uno o más de un éster del ácido parahidroxi benzoico (parabenos), tal como metil parabeno, etil parabeno, propil parabeno, butil parabeno y bencil parabeno.
- 50 15. El/los polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana aislada como se ha(n)definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso como un producto farmacéutico, junto con un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.

- 5 16. El/los polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana aislada como se ha(n)definido en la reivindicación 15, para uso en el tratamiento de placa dental; caries dental; periodontitis; endocarditis de la válvula nativa; prostatitis bacteriana crónica; otitis media; infecciones asociadas con dispositivos médicos tales como válvulas cardíacas artificiales, marcapasos artificiales, lentes de contacto, articulaciones protésicas, suturas, catéteres, y derivaciones arteriovenosas; infecciones asociadas con heridas, laceraciones, llagas y lesiones de las mucosas tales como úlceras; infecciones de la boca, orofaringe, nasofaringe y faringe laringea; infecciones del oído externo; infecciones del ojo; infecciones del estómago, del intestino delgado y del intestino grueso; infecciones de la uretra y la vagina; infecciones de la piel; infecciones intranasales, tales como infecciones de los senos nasales.
- 10 17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para uso en un método de disrupción de una biopelícula en una superficie que comprende: poner en contacto una biopelícula sobre una superficie con la composición.
- 15 18. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para uso en un método de prevención de la formación de la biopelícula en una superficie que comprende: poner en contacto una biopelícula sobre una superficie con la composición.
- 20 19. La composición de las reivindicaciones 17 o 18, en donde dicha superficie es una superficie de un catéter tal como un catéter venoso central, catéter intravascular, catéter urinario, catéter de Hickman, catéter de diálisis peritoneal, catéter endotraqueal, o la superficie de una válvula cardíaca mecánica, un marcapasos cardíaco, una derivación arteriovenosa, una hebilla escleral, una articulación protésica, un tubo de timpanostomía, un tubo de traqueotomía, una prótesis de voz, una prótesis de pene, un esfínter urinario artificial, un cabestrillo pubovaginal sintético, una sutura quirúrgica, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una lente intraocular, una lente de contacto, un dispositivo intrauterino, un injerto aortofemoral, un injerto vascular, una aguja, un conector Luer-Lok, un conector sin aguja o un instrumento quirúrgico.
- 25 20. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 en donde la desoxirribonucleasa microbiana de dicha composición anti-bioincrustación se une a dicha superficie.
- 30 21. Un dispositivo médico permanente caracterizado por que al menos una porción de una superficie de dicho dispositivo destinada a contacto con el paciente está recubierta con la composición farmacéutica o anti-bioincrustación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.
- 35 22. El dispositivo de la reivindicación 21, en donde dicho dispositivo es un catéter tal como un catéter venoso central, catéter intravascular, catéter urinario, catéter de Hickman, catéter de diálisis peritoneal, catéter endotraqueal, o en donde el dispositivo es una válvula cardíaca mecánica, un marcapasos cardíaco, una derivación arteriovenosa, una hebilla escleral, una articulación protésica, un tubo de timpanostomía, un tubo de traqueotomía, una prótesis de voz, una prótesis de pene, un esfínter urinario artificial, un cabestrillo pubovaginal sintético, una sutura quirúrgica, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una lente intraocular, una lente de contacto, un dispositivo intrauterino, un injerto aortofemoral, un injerto vascular, una aguja, un conector Luer-Lok, un conector sin aguja o un instrumento quirúrgico.
- 40 23. El dispositivo de la reivindicación 21 o 22, en donde la desoxirribonucleasa microbiana de dicha composición farmacéutica o anti-bioincrustación está unida a dicha al menos una porción de la superficie de dicho dispositivo destinada a contacto con el paciente.
- 45 24. El uso de un polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana aislada como se ha(n) definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la fabricación de una composición anti-bioincrustación para la disrupción de una biopelícula sobre una superficie o para la prevención de la formación de la biopelícula sobre una superficie.
- 50 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicha composición se formula como un polvo, un líquido, una solución, una crema, un gel o una pasta.
- 55 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, en donde dicha superficie es una superficie de un catéter tal como un catéter venoso central, catéter intravascular, catéter urinario, catéter de Hickman, catéter de diálisis peritoneal, catéter endotraqueal, o la superficie de una válvula cardíaca mecánica, marcapasos cardíaco, una derivación arteriovenosa, una hebilla escleral, una articulación protésica, un tubo de timpanostomía, un tubo de traqueotomía, una prótesis de voz, una prótesis de pene, un esfínter urinario artificial, un cabestrillo pubovaginal sintético, una sutura quirúrgica, un anclaje óseo, un tornillo óseo, una lente intraocular, una lente de contacto, un dispositivo intrauterino, un injerto aortofemoral, un injerto vascular, una aguja, un conector Luer-Lok, un conector sin aguja o un instrumento quirúrgico.
27. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 en donde dicho(s) polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana se une(n) a dicha superficie.

28. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el/los polipéptido(s) de desoxirribonucleasa microbiana como se ha(n) definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.







ES 2 645 376 T3

Homología Porcentaje de coincidencias 97 Puntuación 269 Longitud 142

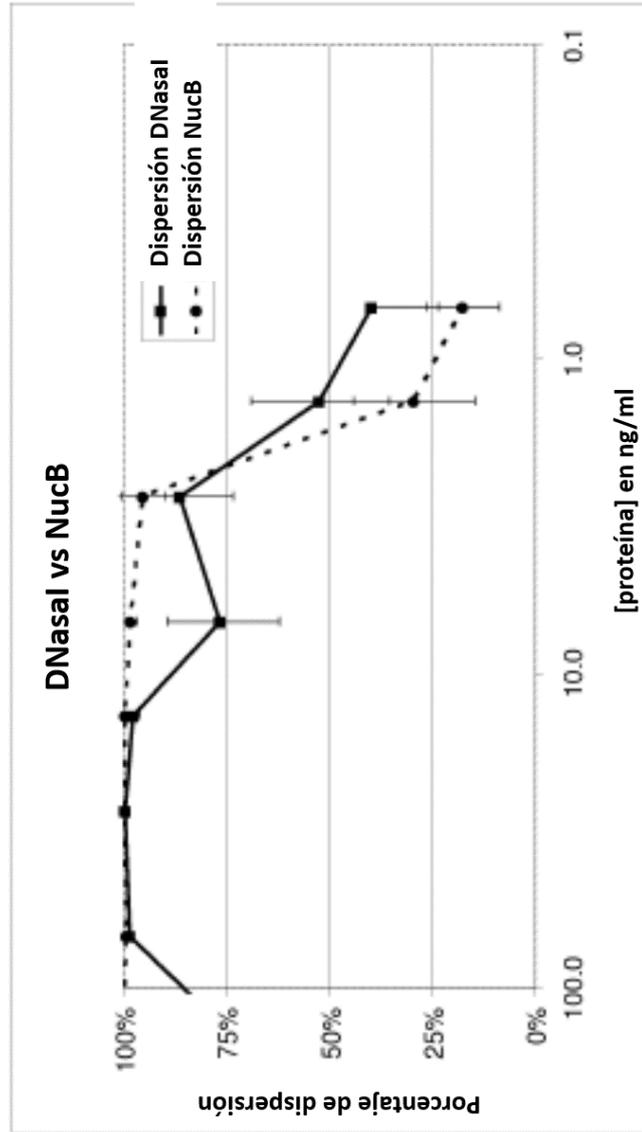
Vista de secuencias Formato de diferencias Color detrás de las no coincidencias

```

NucB (DSM13)      1 MIKKWAVHLLFSALVLLGLSGGAAAYSPQHAE GAARYDDI LYFPASRYPETGAHISDAIKA
nucB (EI-34-)    1 .....V.....

NucB (DSM13)     61 GHSDVCTIERSGADKRRQESLKGIPKPGFDRDEWPMAMCEE GKGASVRYVSSSDNRGA
nucB (EI-34-)    61 ..A.....

NucB (DSM13)     121 GSWVGNRLSGFADGTRILFIVQ
nucB (EI-34-)    121 .....E.Y.....
    
```



ATGATCAAAAAATGGGCGGTTCATCTGCTGTTTTCCGCATTGGTGCTGCTTGGGCTTTCGGG
AGGGGCTGCATATTCTCCTCAGCATGCCGAAGGGCGCTGCAAGGTATGATGACGTATTGTATT
TTCGGGCATCGCGCTATCCTGAAACCGGGCGCTCATATAAGCGACGGGATCAAAGCGGGCCAT
GCAGATGCTCTGCACAATTGAAAGATCGGGAGCGGATAAGCGCCGTCAGGAATCATTAAAGGG
GATTCCGACCAAGCCGGGCTTTGACCGTGACGAATGGCCGATGGCCATGTGTGAAGAAGGGG
GAAAAGGAGCGTCGGTCAGATATGTCAGCTCATCGGATAACCGCGGAGCCGGTTCTCTGGGTC
GGGAACAGGCTGAACGGTTACGCTGACGGGACGAGAAATTTGTTTATCGTTCAATAA

ATGATCAAAAAATGGGCGGTTTCATCTGCTGTTTTCCGCATTTGGTACTGCTTGGGCTTTCGGG
AGGCGCCGCATATTCTCCTCAGCATGCCGAAGGTGCTGCAAGGTATGACGACATATTGTATT
TTCCGGCATCACGCTATCCCGAAACCGGCGCTCATATCAGCGACGCAATCAAAGCAGGGCAT
TCAGATGTCTGCACGATTGAAAGATCGGGAGCGGATRAAGCGCCGCCAGGAATCACTGAAGGG
GATTCGGACTAAGCCGGGCTTTGACCGTGACGAATGGCCGATGGCCATGTGTGAAGAAGGGG
GCAAAGGAGCGTCTGTTCAGATATGTCAGCTCATCGGATAACCGCGGAGCCGGCTCCTGGGTC
GGGAACAGGCTGAGCGGTTTTCCCGACGGGACGAGAATTTTGTATTATCGTTCAATAA

MIKKWAVHLLFSALVLLGLSGGAAYSPQHAEGAARYDDVLYFPASRYPETGAHISDAIKAGH
ADVCTIERSGADKRRQESLKGIPTEKPGFDRDEWPMAMCEEKGGKASVRYVSSSDNRGAGSWV
GNRLNGYADGTRILFIVQ

ARYDDVLYFPASRYPETGAHISDAIKAGHADVCTIERSGADKRRQESLKGIFTKPGFDRDEW
PMANCEEGGKASVRYVSSSDNRGAGSWVGNRLNGYADGTRILFIVQ

MIKKWAVHLLFSALVLLGLSGGAAYSPQHAEGAARYDDILYFPASRYPETGAHISDAIKAGH
SDVCTIERSGADKRRQESLKGIPKPGFDRDENPMAMCEEGGKGASVKYVSSSDNRGAGSWV
GNRLSGFADGTRILFIVQ

