(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 713 040**

(51) Int. CI.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C09D 5/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/IB2012/001061**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12164380**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12732869 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2714719**

(54) Título: **Dispersión y desprendimiento de agregados celulares**

(30) Prioridad:

31.05.2011 US 201161491756 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2019

(73) Titular/es:

HUTCHISON BIOFILM MEDICAL SOLUTIONS LIMITED (100.0%)
Offshore Group Chambers P.O. Box CB-12751
Nassau, New Providence, BS

(72) Inventor/es:

ZLOTKIN, AMIR

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

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

DISPERSIÓN Y DESPRENDIMIENTO DE AGREGADOS CELULARES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud prioritaria de los EE.UU. US 61/491,756, presentada el 31/05/2011.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0002] La presente invención se refiere a composiciones y métodos para dispersar o desprender un organismo unicelular de una superficie o de otras células u organismos unicelulares, especialmente cuando el organismo está en una biopelícula.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0003] Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales que nadan libremente en el medio ambiente (por ejemplo, plancton), o pueden crecer como comunidades multicelulares altamente organizadas encerradas en una matriz polimérica autoproducida en estrecha asociación con superficies e interfaces. Este último estilo de vida microbiano se conoce como biopelículas. La formación de biopelículas representa un modo de crecimiento antiguo y protegido que permite la supervivencia microbiana en ambientes hostiles y permite que los microorganismos se dispersen y colonicen nuevos nichos [Hall-Stoodley et al, Nat Rev Microbiol. (2004) 2 (2): 95-108]. La composición de las biopelículas es compleja y variable entre diferentes especies microbianas e incluso dentro de la misma especie en diferentes condiciones ambientales. No obstante, la formación de biopelículas representa el estilo de vida normal de los microorganismos en el medio ambiente y todos los microbios pueden producir biopelículas. Estudios previos revelaron que la formación de biopelículas bacterianas progresa a través de múltiples etapas de desarrollo que difieren en los perfiles de proteínas [Sauer et al., J Bacteriol. (2002) 184 (4): 1140-54], comenzando con el apego a la superficie, seguido de la inmigración y la división para formar microcolonias y, finalmente, la maduración que implica la expresión de polímeros de matriz. Las bacterias dentro de cada etapa de biopelícula muestran fenotipos y poseen propiedades que son marcadamente diferentes de las del mismo grupo que crece de manera planctónica [Sauer et al., J. Bacteriol. (2004) 186 (21): 7312-26]. Las biopelículas son una causa importante de infecciones sistémicas (por ejemplo, infecciones nosocomiales) en humanos.

[0004] La composición de las biopelículas es compleja y variable entre diferentes especies microbianas e incluso dentro de la misma especie en diferentes condiciones ambientales. No obstante, la formación de biopelículas representa el estilo de vida normal de los microorganismos en el medio ambiente y todos los microbios pueden producir biopelículas. Estudios previos revelaron que la formación de biopelículas bacterianas progresa a través de múltiples etapas de desarrollo que difieren en los perfiles de proteínas [Sauer et al., J Bacteriol. (2002) 184 (4): 1140-54], comenzando con el apego a la superficie, seguido de la inmigración y la división para formar microcolonias y, finalmente, la maduración que implica la expresión de polímeros de matriz. Las bacterias dentro de cada etapa de biopelícula muestran fenotipos y poseen propiedades que son marcadamente diferentes de las del mismo grupo que crece de manera planctónica [Sauer et al., J Bacteriol. (2004) 186 (21): 7312-26].

[0005] En el cuerpo, las biopelículas pueden asociarse con tejidos (por ejemplo, oídos internos, dientes, encías, pulmones, válvulas cardíacas y el tracto urogenital) y pueden ser una fuente importante de infecciones sistémicas. Se estima que el 65% de las infecciones bacterianas en los seres humanos son biopelículas en la naturaleza. Además, después de formar biopelículas, los microorganismos tienden a cambiar sus características, a veces drásticamente, de modo que las dosis de antibióticos que normalmente matan a los organismos en cultivos suspendidos son completamente ineficaces contra los mismos microorganismos cuando los organismos están en forma de biopelícula unida o conglomerada. Ver U.S. Pat. No. 7,189,351.

[0006] Una de las principales preocupaciones con respecto a los productos que se introducen en el cuerpo (por ejemplo, lentes de contacto, catéteres venosos centrales, válvulas cardíacas mecánicas y marcapasos) o que proporcionan una vía hacia el cuerpo es la infección microbiana e invariablemente la formación de biopelículas. Como estas infecciones son difíciles de tratar con antibióticos, a menudo es necesario retirar el dispositivo, lo que es traumático para el paciente y aumenta el coste médico. La solicitud PCT No. WO 06/006172 describe el uso de agentes anti-amiloides, tales como compuestos aromáticos, para inhibir la formación o desintegrar una biopelícula preexistente. La solicitud describe que los compuestos que previenen la formación de fibrillas amiloides en la enfermedad de Alzheimer pueden actuar contra la formación de fibrillas en las biopelículas, y concluye que los aminoácidos que tienen un brazo aromático son eficaces contra las biopelículas. Sin embargo, el análisis se limitó a secuencias de longitud completa.

[0007] Las biopelículas pueden causar, entre una amplia gama de efectos negativos, la corrosión acelerada en los

sistemas industriales, la acidificación de aceites y la bioincrustación. La agregación bacteriana puede ocurrir en la agricultura [Monier et al., Applied and Environmental Microbiology, 70 (1): 346-355 (2004).); Biofilms in the food and beverage industries, Edited by P M Fratamico, B A Annous and N W Guenther, USDA ARS, EE. UU., Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition No. 181, Chapter 20, pages 517-535] y en sistemas de agua [Carlson et al., Zentralbl Bakteriol Orig B, 161 (3): 233-247 (1975)]. La bioincrustación puede ser causada por la adhesión de organismos a cualquier superficie en un ambiente marino o de agua dulce, incluidas torres de enfriamiento, tuberías y filtros de agua en instalaciones de enfriamiento o desalinización, estaciones de riego y energía, y membranas, como las que se utilizan en sistemas de aguas residuales y desalinización. La bioincrustación también ocurre en sistemas de acuicultura en piscifactorías. Además, las flotas comerciales del mundo consumen aproximadamente 300 millones de toneladas de combustible al año. Sin medidas antiincrustantes, el consumo de combustible aumentaría hasta en un 40%, equivalente a 120 millones de toneladas de combustible por año. El coste económico de esto se estimó en alrededor de $ 7.5 mil millones en 2000; una estimación más reciente es de $ 30 mil millones. En general, las biopelículas son muy difíciles de eliminar ya que los microbios que crecen en su interior están altamente organizados y pueden soportar ambientes hostiles, como altas temperaturas y agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos).

[0008] Dado que las plantas y animales marinos-acuáticos están continuamente expuestos a una gran diversidad y abundancia de microorganismos potencialmente dañinos en forma de biopelícula, y se sabe que la vida marina produce péptidos antimicrobianos, es posible que factores naturales de amplio espectro que interfieran con la formación de biopelículas también puedan estar presentes en la vida marina.

[0009] La publicación U.S. No. 20070098745 describe medios para prevenir la formación de biopelículas mediante el uso de microflora de peces de arrecife. Esta invención describe sustancias anti-biopelículas derivadas de bacterias aisladas de las superficies mucosas epiteliales de peces sanos de arrecifes de coral (por ejemplo, Sparisoma ninidae y Lutjanus purpureus). Los aislamientos bacterianos producen señales o toxinas que impiden la formación de biopelículas.

[0010] El agrupamiento celular no se limita a las biopelículas microbianas, sino que puede existir *in vivo.* La enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, involucra grupos de neuronas (es decir, placas neuríticas) en el cerebro [Tiraboschi et al., J. Neurology, 62 (11): 1984-1989 (2004)]. En el cuerpo, la agregación bacteriana puede ocurrir por vía oral [Duffau et al., 16 September 2005 RAI Congress, #0299; Liljemark et al., Infect. Immun., 31 (3): 935-941 (1981)]; en la sepsis [Reid et al., Current Microbiology, 20 (3): 185-190 (1990)]; diarrea [Bieber et al., Science, 280 (5372): 2114-2118 (1998)]; en infecciones nosocomiales [Bortz et al., Bulletin of Mathematical Biology, Volume 70, Number 3, 745-768]; en relación con la eficacia del fármaco [Kraal et al., J Dent Res 58 (11): 2125-2131 (1979).)]; en relación con la diálisis peritoneal [Reid et al., Peritoneal Dialysis International, 10: 21-24 (1990)]; enfermedades pulmonares [Sanchez et al., PLoS Pathog 6 (8)]; y la enfermedad de Crohn [Isenmann et al., Digestive Diseases and Sciences, 47 (2): 462-468 (2002).)].

[0011] La agrupación de células también puede ocurrir entre los glóbulos blancos *in vivo.* Por ejemplo, los glóbulos blancos se pueden agregar a la sangre completa como resultado del consumo de cigarrillos y provocar una oclusión y daño microvascular [Hill et al., J. R. Soc. Med., 86 (3): 139-140 (1993)]. La agregación de glóbulos blancos también puede ocurrir en la enfermedad vascular [Belch et al., Thrombosis Research, 48 (6): 631-639 (1987).)]. La agrupación de macrófagos y linfocitos se correlaciona con la artritis reumatoide [Webb et al., Macrophage-lymphocyte clustering in rheumatoid arthritis, Ann. rheum. Dis. (1975), 34, 38] Adicionalmente, Sun et al. afirman que "Tanto la agregación plaquetaria como la agregación de glóbulos blancos están involucradas en procesos patológicos como la trombosis, la aterosclerosis y la inflamación crónica. Es probable que las personas en los grupos de mayor edad sufran enfermedades cardiovasculares y puedan tener un aumento de agregación de glóbulos blancos y plaquetas que podría contribuir a este riesgo aumentado ".[Sun et al., A study of whole blood platelet and white cell aggregation using a laser flow aggregometer, Platelets (2003), Mar 14 (2): 103-8.] Además, la adhesión y la agregación de los glóbulos blancos de la sangre están involucradas en las enfermedades vasculares y la trombosis [Belch et al., Whole blood white cell aggregation: a novel technique, Thrombosis Research, 48; 631-639 (1987)].

[0012] La agrupación de células también se produce en la restenosis, que puede desarrollarse como resultado de stents médicos implantados [Dangas et al., Circulation, 105: 2586 (2005)]. Dicha agrupación puede llevar a la oclusión de un vaso sanguíneo y reducir drásticamente el flujo sanguíneo. Uno de los síntomas de la segunda etapa de restenosis, que tiende a aparecer de 3 a 6 meses después de la cirugía, es la agregación plaquetaria en el sitio de la lesión [Michael Kirchengast *, Klaus Munter. Endothelin and restenosis. Cardiovascular Research 39 (1998) 550-555] y la carga de placa residual fuera del stent [Prati et al., In-Stent Neointimal Proliferation Correlates With the Amount of Residual Plaque Burden Outside the Stent. An Intravascular Ultrasound Study, Circulation, (1999) 99: 1011-1014.], siendo ambos fenómenos las principales causas de la proliferación neointimal en el stent. Patri et al concluyen con lo siguiente: "La proliferación neointimal tardía en el stent tiene una correlación directa con la cantidad de carga de placa residual después de la implantación del stent coronario, lo que apoya la hipótesis de que la extracción de la placa antes de la implantación del stent puede reducir la restenosis".

[0013] WO 2010/035107 describe los péptidos y su uso en la prevención de la adhesión celular.

[0014] WO 2007/089272 se refiere al uso de péptidos derivados de Pseudomonas para prevenir o inhibir la formación de biopelículas.

[0015] Devemy and Blaschuk (2009), Peptides 30, 1539-1547, describe un péptido "SWELYYPLRANL" que se dice que es capaz de interrumpir las monocapas de células de cáncer de mama.

[0016] Daep et al. (2006), Infection and Immunity 74 (10), 5756-5762, describe la "inhibición mediada por péptidos de la formación de biopelículas de Porphyromonas gingivalis".

[0017] Overhage (2008), Infection and Immunity 76 (9), 4176-4182, describe "el péptido de defensa del huésped humano LL-37 previene la formación de biopelículas bacterianas".

[0018] Kaplan (2010) J Dent Res 89 (3), 205-2010, es una revisión sobre la dispersión de biopelículas. Kaplan explica, entre otras cosas, que "en la literatura y en esta revisión, los términos 'desprendimiento', y 'dispersión' se usan indistintamente para referirse a la fase de desprendimiento de células del proceso de dispersión". Además, Kaplan describe agentes que podrían usarse para dispersar biopelículas, como enzimas de alto peso molecular, moléculas químicas pequeñas, señales de detección de quórum, surfactantes y moléculas pequeñas inhibidores de de diaguanilato ciclasas bacterianos.

[0019] WO 2007/079076 no dice nada sobre la capacidad anti-biopelícula de los péptidos descritos allí.

[0020] Hall-Stoodley (2004) Nature Reviews 2, 95-107 es una revisión sobre biopelículas bacterianas.

[0021] WO 2009/154988, Wang et al. (2011) 121 (1), 238-248, Hou et al. (2010), Applied and Environmental Microbiology 76 (6), 1967-1974 and Johansson et al. (2008) Chemistry & Biology 15, 1249-1257 describen agentes para el desprendimiento de biopelículas.

[0022] WO 2010/076642 describe péptidos que tienen una secuencia FDYDWY o FNFDWY y su uso para prevenir la adhesión de organismos unicelulares.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0023] La presente invención proporciona un péptido cíclico, en el que el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0024] En algunas realizaciones, el péptido es soluble. En algunas realizaciones, el péptido está unido a un linker. En algunas realizaciones, el linker es polietilenglicol o ácido palmítico. En otras realizaciones, el péptido es sintético.

[0025] La presente invención también proporciona una composición que comprende un péptido cíclico, en donde dicha composición es capaz de desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares, en donde el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0026] En algunas realizaciones, el péptido es soluble. En otras realizaciones, el péptido está unido a un linker. En algunas realizaciones, el linker es polietilenglicol o ácido palmítico. En algunas realizaciones, el péptido es sintético. En algunas realizaciones, el organismo está en una biopelícula. En algunas realizaciones, el organismo es un microorganismo acuático. En algunas realizaciones, los organismos están unidos en un grupo o agregado. En algunas realizaciones, la composición es capaz de romper o dispersar dicho grupo o agregado. En algunas realizaciones, el desprendimiento afecta a la capacidad de dicho organismo para producir matriz de polisacárido. En algunas realizaciones, la superficie se selecciona del grupo que comprende un tejido, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, una mampostería, un vidrio, un metal y un plástico.

[0027] La presente invención también proporciona un método in vitro para desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares, que comprende poner en contacto dicho organismo con una composición que comprende un péptido, en el que dicho péptido es un péptido cíclico, en el que el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV; y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0028] En algunas realizaciones, el péptido es soluble. En otras realizaciones, el péptido está unido a un linker. En algunas realizaciones, el linker es polietilenglicol o ácido palmítico. En algunas realizaciones, el péptido es sintético. En algunas realizaciones, la superficie se selecciona del grupo que comprende un tejido, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, una mampostería, un vidrio, un metal y un plástico. En algunas realizaciones, el organismo está en una biopelícula. En algunas realizaciones, el organismo es un microorganismo acuático. En algunas realizaciones, los organismos están unidos en un grupo o agregado. En algunas realizaciones, la composición rompe o dispersa dicho grupo o agregado. En algunas realizaciones, la composición evita que dicho organismo produzca matriz de polisacárido. En algunas realizaciones, la superficie se selecciona del grupo que comprende un tejido, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, una mampostería, un vidrio, un metal y un plástico.

[0029] La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición que comprende un péptido cíclico, en donde la composición es capaz de desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares, en donde el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S y donde la composición farmacéutica comprende un vehículo o diluente farmacéuticamente aceptable.

[0030] La presente invención también proporciona dicha composición farmacéutica para uso en un método para prevenir o tratar una infección por patógeno en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una proteína o péptido, en donde dicha composición es capaz de separar un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares.

[0031] La presente invención también proporciona un método para aumentar la eficacia de la composición farmacéutica descrita en el presente documento, el método que comprende administrar una composición que comprende una proteína o péptido, en donde la composición es capaz de separar un microorganismo de una superficie o de otros microorganismos a un sujeto en necesidad de la composición farmacéutica.

[0032] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un antibiótico.

[0033] La presente invención también proporciona un método para identificar una composición anti-biopelículas, comprendiendo el método: (a) poner en contacto dicha biopelícula con una pluralidad de las composiciones descritas en este documento, comprendiendo cada composición un péptido; (b) ensayar la capacidad de dicha biopelícula para resistir la actividad anti-biopelícula, en donde dicha actividad anti-biopelícula comprende separar dicha biopelícula de una superficie o romper dicha biopelícula; y (c) identificando a partir de dicha pluralidad de composiciones, al menos una composición que tiene dicha actividad anti-biopelícula por encima de un umbral predeterminado, identificando de ese modo la composición anti-biopelícula.

[0034] La presente invención también proporciona un dispositivo médico que comprende la composición descrita en el presente documento que comprende un péptido, en el que la composición es capaz de separar un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares.

[0035] La presente invención también proporciona un método para dispersar una biopelícula o desprender la formación de biopelículas de una superficie, el método que comprende tratar el agua con o recubrir dicha superficie con la composición descrita en este documento que comprende un péptido, en donde la composición es capaz de separar un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares.

[0036] La presente invención también proporciona el péptido cíclico descrito en el presente documento para uso en un método para tratar una enfermedad, que comprende administrar el péptido.

[0037] En algunas realizaciones, la enfermedad es una enfermedad autoinmune, inflamatoria o degenerativa. En algunas realizaciones, la enfermedad es la enfermedad de Alzheimer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0038]

FIG. 1 muestra el desprendimiento de biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos después de incubar el microorganismo durante la noche para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con péptido Eqt2Z-cyc durante la noche.

FIG. 2A muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 2 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con diferentes concentraciones de péptido Eqt2Z-cyc y control negativo de Abac10 durante la noche.

FIG. 2B muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 2 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con diferentes concentraciones de péptido Eqt2Z-cyc y control negativo de Abac10 durante 24 horas.

FIG. 3 muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 2 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con péptido grZ14s-nvcyc durante la noche.

FIG. 4 muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 24 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con péptido Eqt2-cyc durante 24 horas.

FIG. 5 muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 24 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con péptido grZ14s-nvcyc durante 24 horas.

FIG. 6 muestra el desprendimiento de la biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa* de un pocillo después de incubar el microorganismo durante 24 horas para crear la biopelícula y posteriormente incubar la biopelícula con péptido Physco-cyc durante la noche.

FIG. 7 muestra la mejora de la actividad de Imipenem con grZ14s-nvCyc.

FIG. 8 muestra la mejora de la actividad de la ampicilina con grZ14s-nvCyc.

FIG. 9 muestra la mejora de la actividad de vancomicina con grZ14s-nvCyc.

FIG. 10 muestra la mejora de la actividad de la anfotericina con grZ14s-nvCyc.

FIG. 11 muestra la mejora de la actividad de fluconazol con grZ14s-nvCyc

FIG. 12 muestra la mejora de la actividad de Kanamicina con grZ14s-nvCyc

FIG. 13A muestra la prevención de la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* por diversos péptidos.

FIG. 13B muestra el desprendimiento de la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* por diversos péptidos.

FIG. 14A muestra la prevención de la adherencia de *Staphylococcus aureus* por diversos péptidos.

FIG. 14B muestra el desprendimiento de la adherencia de *Staphylococcus aureus* por diversos péptidos.

FIG. 15A muestra la prevención de la adherencia de *Candida albicans* por diversos péptidos.

FIG. 15B muestra el desprendimiento de la adherencia de *Candida albicans* por diversos péptidos.

FIG. 16A muestra la prevención de la adherencia de *Escherichia coli* por diversos péptidos.

FIG. 16B muestra el desprendimiento de la adherencia de *Escherichia coli* por diversos péptidos.

FIG. 17 muestra la prevención de la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* por varias modificaciones de Eqt2Z-Cyc.

FIG. 18 muestra la tinción con Rojo Congo de Eqt2Z-Cyc incubada con *Pseudomonas aeruginosa.*

FIG. 19 muestra la tinción con Rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubada con *Pseudomonas aeruginosa.*

FIG. 20 muestra la tinción con Azul Tripán de grZ14s-nvCyc incubada con *Pseudomonas aeruginosa*

FIG. 21 muestra la tinción con Rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubada con *Candida albicans.*

FIG. 22 muestra la tinción con Rojo Congo de Eqt2Z-Cyc incubada con *Candida albicans.*

FIG. 23 muestra la tinción con Rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubada con *Staphylococcus aureus.*

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0039] La presente invención se refiere a composiciones y métodos que comprenden un péptido que tiene uno o más efectos relacionados con el desprendimiento de un organismo unicelular de una superficie u otros organismos unicelulares, especialmente cuando el organismo está en una biopelícula.

[0040] En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la literatura. Ver, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se establece en U.S. Pat. Nos. 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 y 5,272,057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology "Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen extensamente en la patente y en la literatura científica, ver, por ejemplo, U.S. Pat. Nos. 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,9 6,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 y 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology "Vol. 1-317, Academic Press; " PCR Protocols: A Guide to Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization- A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Los procedimientos en el mismo se proporcionan para la conveniencia del lector.

DEFINICIONES

[0041] Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una composición que se ha eliminado de su ubicación in vivo. Preferiblemente, las composiciones aisladas de la presente invención están sustancialmente libres de otras sustancias (por ejemplo, otras proteínas que no comprenden efectos anti-adhesivos) que están presentes en su ubicación in vivo (es decir, purificadas o semi-purificadas). Las proteínas y los péptidos aislados pueden ser opcionalmente sintéticos u obtenidos de fuentes naturales, incluso opcionalmente expresándose in vivo utilizando técnicas de ingeniería genética.

[0042] Como se usa en este documento, la frase "organismo de una sola célula" se refiere a un organismo unicelular también denominado microorganismo o microbio. El organismo unicelular de la presente invención puede ser un organismo unicelular eucariota (por ejemplo, protozoos u hongos, por ejemplo, levadura) o un organismo unicelular procariota (por ejemplo, bacterias o arqueas). Los organismos unicelulares de la presente invención pueden estar en cualquier entorno celular, tal como, por ejemplo, en una biopelícula, como células aisladas o como una suspensión celular.

[0043] El término "bacterias Gram-positivas", como se usa en el presente documento, se refiere a las bacterias caracterizadas por tener como parte de su estructura de la pared celular peptidoglicano, así como polisacáridos y / o ácidos teicoicos y se caracterizan por su reacción de color azul-violeta en el procedimiento de tinción de Gram. Las bacterias gram-positivas representativas incluyen: Actinomyces spp., Bacillus anthracis, Bifidobacterium spp., Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Clostridium spp., Clostridium tetani, Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium jeikeium, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Erysipelothrix rhusiopathiae, Eubacterium spp.,Gardnerella vaginalis, Gemella morbillorum, Leuconostoc spp., Mycobacterium abscessus, Mycobacterium avium complex, Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium haemophilium, Mycobacterium kansasii, Mycobacterium leprae, Mycobacterium marinum, Mycobacterium scrofulaceum, Mycobacteriumsmegmatis, Mycobacterium terrae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium ulcerans, Nocardia spp., Peptococcus niger, Peptostreptococcus spp., Proprionibacterium spp., Sarcina lutea, Staphylococcus aureus, Staphylococcus auricularis, Staphylococcus capitis, Staphylococcus cohnii, Staphylococcus epidermis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, Staphylococcus lugdanensis, Staphylococcus saccharolyticus, Staphylococcus saprophyticus, Staphylococcus schleiferi, Staphylococcus similans, Staphylococcus warneri, Staphylococcus xylosus, Streptococcus agalactiae (estreptococo del grupo B), Streptococcus anginosus, Streptococcus bovis, Streptococcus canis, Streptococcus equi, Streptococcus milleri, Streptococcus mitior, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes (estreptococo del grupo A), Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguis.

[0044] El término "bacterias gram-negativas", como se usa en el presente documento, se refiere a bacterias caracterizadas por la presencia de una doble membrana que rodea a cada célula bacteriana. Las bacterias gram-negativas representativas incluyen Acinetobacter calcoaceticus, Acinetobacter baumannii, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Aeromonas hydrophila, Alcaligenes xylosoxidans, Bacteroides, Bacteroides fragilis, Bartonella bacilliformis, Bordetella spp., Borrelia burgdorferi, Branhamella catarrhalis, Brucella spp., Campylobacter spp., Chlamydia pneumoniae, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis, Chromobacterium violaceum, Citrobacter spp., Eikenella corrodens, Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Flavobacterium meningosepticum,

Fusobacterium spp., Haemiphilus influenzae, Haemiphilus spp, Helicobacter pylori, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella spp., Legionella spp., Leptospira spp., Moraxella catarrhalis, Morganella morganii, Mycoplasma pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Pasteurella multocida, Plesiomonas shigelloides, Prevotella spp., Proteus spp., Providencia rettgeri, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas spp., Rickettsia prowazekii, Rickettsia rickettsii, Rochalimaea spp., Salmonella spp., Salmonella typhi, Serratia marcescens, Shigella spp., Shigella sonnei, Treponema carateum, Treponema pallidum, Treponema pallidum endemicum, Treponema pertenue, Veillonella spp., Vibrio cholerae, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis.

[0045] El término "hongos", como se usa en el presente documento, se refiere a los organismos heterótrofos caracterizados por la presencia de una pared celular quitinosa, y en la mayoría de las especies, el crecimiento filamentoso como hifas multicelulares. Los hongos representativos cuya adhesión se puede prevenir de acuerdo con el método de la presente invención incluyen Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae, Candida glabrata, Candida parapsilosis y Candida dubliniensis.

[0046] Como se usa en el presente documento, el término "biopelícula" se refiere a una matriz extracelular en la que se pueden dispersar organismos unicelulares y / o formar colonias. La biopelícula está típicamente hecha de polisacáridos y otras macromoléculas.

[0047] Como se usa en este documento, el término "desprender" se refiere a la eliminación de un solo organismo celular, *in vitro* o *in vivo*, desde una superficie a la que se adhiere la célula (por ejemplo, reduciendo la velocidad de crecimiento en una superficie) o retirando la célula de otros organismos unicelulares a los que están adheridos. Preferiblemente, las composiciones de la presente invención desprenden a las células de la adherencia hasta en un 10%, más preferiblemente en un 20%, más preferiblemente en un 30%, más preferiblemente en un 40%, más preferiblemente en un 50%, más preferiblemente en un 60%, más preferiblemente en un 70%, más preferiblemente en un 80%, más preferiblemente en un 90% y lo más preferiblemente en un 100% medido por un ensayo de adhesión. Ensayos de desprendimiento a modo de ejemplo se describen a continuación en el presente documento y en la sección de ejemplos que sigue.

[0048] El "desprendimiento" de una biopelícula ocurre cuando un solo o grupo de organismo(s) celulare(s) en la biopelícula se desprende de la superficie y la "dispersión" de una biopelícula ocurre cuando los organismos unicelulares en la biopelícula se desprenden unos de otros.

[0049] Tal como se usa en el presente documento, el término "contacto" se refiere al posicionamiento de las composiciones de la presente invención de modo que estén en contacto directo o indirecto con los organismos unicelulares adhesivos de tal manera que el agente activo incluido dentro sea capaz de desprenderse de las células. Por lo tanto, la presente invención contempla la aplicación de las composiciones de la presente invención a una superficie deseable y / o directamente a las células adhesivas. Poner en contacto las composiciones con una superficie puede efectuarse utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo pulverización, esparcimiento, humectación, inmersión, inmersión, pintura, soldadura por ultrasonidos, soldadura, unión o adherencia. Las composiciones de la presente invención pueden unirse como monocapas o capas múltiples.

[0050] Un "resto orgánico peptidomimético" puede estar opcionalmente sustituido por residuos de aminoácidos en un péptido de acuerdo con la presente invención tanto en sustituciones conservativas como no conservativas. Estos restos también se denominan "aminoácidos no naturales" y pueden reemplazar opcionalmente los residuos de aminoácidos, aminoácidos o actuar como grupos espaciadores dentro de los péptidos en lugar de los aminoácidos eliminados. Los restos orgánicos peptidomiméticos opcionalmente y preferiblemente tienen propiedades estéricas, electrónicas o de configuración similares al aminoácido reemplazado y tales peptidomiméticos se usan para reemplazar aminoácidos en las posiciones esenciales, y se consideran sustituciones conservativas. Sin embargo, tales similitudes no son necesariamente requeridas. La única restricción en el uso de peptidomiméticos es que la composición al menos conserva sustancialmente su actividad fisiológica en comparación con el péptido nativo de acuerdo con la presente invención.

[0051] Como se usa en el presente documento, el término "modificación química", cuando se refiere a un péptido de acuerdo con la presente invención, se refiere a un péptido en el que al menos uno de sus residuos de aminoácidos se modifica mediante procesos naturales, como el procesamiento u otras modificaciones posteriores a la traducción, o por técnicas de modificación química que son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos de las numerosas modificaciones conocidas típicamente incluyen, pero no se limitan a: acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación, o cualquier proceso similar.

[0052] Tal como se usa en el presente documento, el término "dispositivo médico" se refiere a cualquier implante, instrumento, aparato, implemento, máquina, dispositivo o cualquier otro objeto similar o relacionado (incluido cualquier componente o accesorio), que esté destinado al uso en el diagnóstico, tratamiento, cura o prevención de enfermedades u otras afecciones. Dicho dispositivo médico está destinado para su uso en el hombre u otros animales y se prevé que afecte la estructura o cualquier función del cuerpo. Dicho dispositivo médico no logra sus propósitos primarios previstos mediante la acción química y no depende de su metabolización para lograr sus propósitos primarios previstos.

[0053] Como se usa en el presente documento, el término "implante" se refiere a cualquier objeto destinado a ser colocado en un cuerpo humano que no sea un tejido vivo. El implante puede ser temporal o permanente. Un implante puede ser un artículo que comprende componentes artificiales, como catéteres o marcapasos. Los implantes también pueden incluir objetos derivados de la naturaleza que se han procesado de modo que sus tejidos vivos se han desvitalizado. Como ejemplo, los injertos óseos que se han procesado para que sus células vivas se eliminen (acelularizan), pero para que su forma se retenga para servir como una plantilla para el crecimiento de hueso de un huésped. Como otro ejemplo, el coral natural puede procesarse para producir preparaciones de hidroxiapatita que se pueden aplicar al cuerpo para ciertas terapias ortopédicas y dentales. Por lo tanto, la presente invención prevé recubrir dispositivos médicos con las composiciones de la presente invención para evitar la adherencia de microorganismos a los mismos a fin de reducir / eliminar cualquier posible agregación celular y formación de biopelícula que se produzca después de la implantación. Las infecciones relacionadas con el dispositivo generalmente resultan de la introducción de microorganismos, principalmente bacterias, durante la inserción del dispositivo o el procedimiento de implantación, o de la unión de organismos de transmisión sanguínea al dispositivo recién insertado y su posterior propagación en su superficie. El recubrimiento del dispositivo médico con las composiciones de la presente invención, por lo tanto, inhibirá la formación de biopelículas de una o más especies microbianas, evitará infecciones relacionadas con el dispositivo médico y, en consecuencia, reducirá la necesidad de tratamiento con antibióticos o la eliminación del dispositivo médico del sujeto.

[0054] Como se usa en el presente documento, el término "agentes anti-bioincrustantes" se refiere a los compuestos utilizados para proteger las superficies submarinas de la unión de organismos unicelulares. Estos organismos unicelulares incluyen microorganismos tales como bacterias y hongos.

[0055] A continuación, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable", que se pueden usar indistintamente, se refieren a un portador o un diluyente que no causa una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades de los compuestos administrados. Un adyuvante se incluye en estas frases.

[0056] Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte agregada a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo.

[0057] Como se usa en el presente documento, la frase "organismo acuático sésil" se refiere a un organismo acuático que no se mueve libremente durante al menos una parte de su ciclo de vida. Los organismos sésiles acuáticos suelen estar unidos permanentemente a un sustrato sólido de algún tipo, como una roca o el casco de un barco debido al anclaje físico al sustrato, o por cualquier otro motivo (por ejemplo, peces piedra). Los organismos sésiles ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cnidarios sésiles como corales, anémonas de mar (por ejemplo, Actinia equina y Aiptasia pulchella), plumas de mar, larvas de sésiles acuáticos (por ejemplo, larvas de medusa), ceriantharia e hidroides (por ejemplo, Chlorohydra viridissima e Hydra vulgaris). Los peces ejemplares que pueden usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención son preferiblemente aquellos que habitan en aguas poco profundas o aquellos que se esconden en la capa inferior del océano, a veces en hoyos o cuevas. Tales peces incluyen la anguila y el bagre.

[0058] Como se usa en el presente documento, el término "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferiblemente un sujeto humano.

[0059] Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos nocivos de una infección por patógeno.

[0060] Como se usa en el presente documento, la frase "infección por patógeno" se refiere a cualquier afección médica causada por un organismo patógeno. Los ejemplos de infecciones por patógenos incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades virales, enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma, enfermedades arqueas y enfermedades priónicas. La infección por patógeno puede ser causada por un organismo capaz de crecer en o sobre una biopelícula. Los ejemplos de infecciones por patógenos causados por biopelículas microbianas incluyen endocarditis de válvula nativa (NVE), otitis media (OM), prostatitis bacteriana crónica, fibrosis quística (CF) y periodontitis. Las infecciones por patógenos adicionales que no se atribuyen específicamente a las biopelículas incluyen, entre otras, infecciones urinarias, infecciones del tracto genital femenino y neumonía. Las infecciones debidas a la implantación de dispositivos médicos incluyen infecciones de catéteres vasculares, infecciones protésicas arteriales, infecciones de válvulas cardíacas protésicas, infecciones de prótesis articulares, infecciones de derivaciones del sistema nervioso central, infecciones de implantes ortopédicos, infecciones de marcapasos y desfibriladores, hemodiálisis e diálisis peritoneal, infecciones oculares, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto genital femenino, infecciones asociadas con intubación endotraqueal y traqueotomía e infecciones dentales.

[0061] Como se usa en el presente documento, la frase "organismo patógeno" se refiere a cualquier organismo unicelular que es capaz de causar enfermedades, especialmente un microorganismo vivo como una bacteria u hongos. Preferiblemente, el organismo patógeno es capaz de crecer en o sobre una biopelícula. Muchos organismos patógenos comunes existen en los mamíferos (por ejemplo, los humanos) como biopelículas y causan

enfermedades. Estos incluyen, pero no se limitan a, Mannheimia haemolytica y Pasteurella multocida (causando neumonía), Fusobacterium necrophorum (causando absceso hepático), Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa (causando infecciones por herida), Escherichia coli y Salmonella spp (causando enteritis), Staphyococcus aureus y Staphylococcus epidermidis (causante de OM), y Streptococci sp., Staphylococci sp., Candida, y Aspergillus sp. (causando NVE).

APLICACIONES

[0062] La presente invención tiene muchas aplicaciones. Una aplicación es usar una composición que comprende el péptido para dispersar una biopelícula o desprender una biopelícula de una superficie. Otra aplicación es utilizar la composición para combatir infecciones sistémicas (por ejemplo, infecciones nosocomiales) en pacientes causadas por biopelículas microbianas *in vivo*. Otra aplicación es utilizar la composición para dispersar o desprender una biopelícula presente en otros campos, incluidas las industrias de alimentos, agricultura, farmacéutica, pintura, agua, transporte e ingeniería. Otra aplicación es usar la composición para dispersar o desprender una biopelícula donde ocurre la coagregación, es decir, la agregación de más de una especie que crea un solo grupo. Las aplicaciones anteriores no son limitantes y otras aplicaciones son apropiadas en las que se puede usar una composición para separar un microorganismo de una superficie o de otros microorganismos. Otra aplicación es usar la composición para tratar enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, inflamatorias y enfermedades degenerativas como la enfermedad de Alzheimer. Estas enfermedades son causadas por la agregación o agrupación celular y el uso de los péptidos de la invención para prevenir o disociar agregados celulares puede conducir a un alivio de la enfermedad. Otra aplicación es usar la composición para tratar la restenosis, incluida la restenosis causada por stents médicos implantados. Otra aplicación es usar la composición para tratar el agrupamiento de células sanguíneas, incluidos los glóbulos blancos.

[0063] Las células bacterianas ejemplares que pueden desprenderse de las superficies y entre sí de acuerdo con el método de la presente invención incluyen bacterias gram positivas y bacterias gram negativas.

[0064] Las superficies ejemplares sobre las que se pueden unir organismos unicelulares y que se contemplan en la presente invención incluyen tejidos, fibras, espumas, películas, hormigones, mamposterías, vidrio, metales, plásticos, polímeros y similares.

[0065] Los dispositivos ejemplares cuyas superficies son susceptibles a la formación de biopelículas y que están contemplados por la presente invención incluyen, entre otros, cascos de recipientes, superficies de automóviles, superficies de aviones, membranas, filtros y equipos industriales. La superficie también puede estar comprendida en dispositivos médicos, instrumentos e implantes.

[0066] Los ejemplos de dichos dispositivos médicos, instrumentos e implantes incluyen cualquier objeto que pueda implantarse temporal o permanentemente en un organismo mamífero, como un ser humano. Los dispositivos, instrumentos e implantes médicos representativos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos, injertos vasculares, endoprótesis vasculares y articulaciones protésicas.

[0067] Los dispositivos médicos que pueden recubrirse de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen, entre otros, vasos sanguíneos artificiales, catéteres y otros dispositivos para la eliminación o suministro de fluidos a pacientes, corazones artificiales, riñones artificiales, clavos ortopédicos, prótesis. Articulaciones, placas e implantes; catéteres y otros tubos (incluidos los tubos urológicos y biliares, tubos endotraqueales, catéteres venosos centrales de inserción periférica, catéteres de diálisis, catéteres venosos centrales tunelizados a largo plazo, catéteres venosos periféricos, catéteres venosos centrales a corto plazo, catéteres arteriales, catéteres pulmonares, catéteres de Swan-Ganz, catéteres urinarios, catéteres peritoneales, dispositivos urinarios (incluidos dispositivos urinarios a largo plazo, dispositivos urinarios de unión a tejidos, esfínteres urinarios artificiales, dilatadores urinarios), derivaciones (incluidas derivaciones ventriculares o arteriovenosas); prótesis (incluidos los implantes mamarios, prótesis peneanas, prótesis vasculares, dispositivos de reparación de aneurismas, válvulas cardíacas mecánicas, articulaciones artificiales, laringes artificiales, implantes otológicos), dispositivos anastomóticos, orificios de catéteres vasculares, stents vasculares, pinzas, dispositivos embólicos, tubos de drenaje de heridas, Lentes oculares, implantes dentales, shunts de hidrocefalia, marcapasos y desfibriladores implantables, conectores sin agujas, prótesis de voz y similares. Otra posible aplicación de las composiciones de la presente invención es el recubrimiento de superficies encontradas en el entorno médico y dental. Dichas superficies incluyen los aspectos internos y externos de diversos instrumentos y dispositivos, ya sean desechables o destinados a usos repetidos. Dichas superficies incluyen todo el espectro de artículos adaptados para uso médico, incluidos, entre otros, escalpelos, agujas, tijeras y otros dispositivos utilizados en procedimientos quirúrgicos, terapéuticos o diagnósticos invasivos; filtros de sangre. Otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los practicantes en estas artes.

[0068] Las superficies que se encuentran en el entorno médico también incluyen los aspectos internos y externos de los equipos médicos, el equipo médico usado o llevado por el personal en el entorno de atención médica. Dichas superficies pueden incluir superficies diseñadas como barreras biológicas para organismos infecciosos en entornos

médicos, como guantes, delantales y protectores faciales. Los materiales comúnmente utilizados para las barreras biológicas son materiales termoplásticos o polímeros como polietileno, dacrón, nailon, poliésteres, politetrafluoroetileno, poliuretano, látex, silicona y vinilo. Otras superficies pueden incluir encimeras y accesorios en áreas utilizadas para procedimientos médicos o para preparar aparatos médicos, tubos y recipientes utilizados en tratamientos respiratorios, incluida la administración de oxígeno, de medicamentos solubilizados en nebulizadores y de agentes anestésicos. Otras superficies de este tipo pueden incluir mangos y cables para equipos médicos o dentales que no están destinados a ser estériles. Además, tales superficies pueden incluir aquellas superficies externas no estériles de tubos y otros aparatos que se encuentran en áreas donde comúnmente se encuentran la sangre o fluidos corporales u otros biomateriales peligrosos. Las composiciones de la presente invención se pueden usar en la superficie de o dentro de estos dispositivos médicos para proporcionar protección a largo plazo contra la colonización por organismos unicelulares y reducir la incidencia de infecciones relacionadas con el dispositivo. Estas composiciones también pueden incorporarse en combinación con un agente antimicrobiano (por ejemplo, un agente antibiótico) en recubrimientos para dispositivos médicos. Dicha combinación matará o inhibirá suficientemente las bacterias colonizadoras iniciales y evitará infecciones relacionadas con el dispositivo siempre que la sustancia se presente en una concentración inhibitoria en la interfaz dispositivo-microbio.

[0069] Las composiciones de la presente invención pueden incorporarse directamente en la matriz polimérica del dispositivo médico en la etapa de síntesis de polímeros o en la etapa de fabricación del dispositivo. Las composiciones también pueden unirse covalentemente al polímero del dispositivo médico. Estos y muchos otros métodos para recubrir dispositivos médicos son evidentes para un experto en la técnica.

[0070] Las superficies adicionales que pueden tratarse de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen los aspectos internos y externos de los artículos involucrados en la purificación del agua, el almacenamiento y el suministro de agua, y los artículos involucrados en el procesamiento de alimentos. Por lo tanto, la presente invención prevé recubrir una superficie sólida de un recipiente de comida o bebida para prolongar la vida útil de su contenido.

[0071] Las superficies relacionadas con la salud también pueden incluir los aspectos internos y externos de los artículos del hogar relacionados con la nutrición, el saneamiento o la prevención de enfermedades. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención se pueden usar para eliminar microorganismos causantes de enfermedades de superficies externas. Estos pueden incluir, por ejemplo, equipos de procesamiento de alimentos para uso doméstico, materiales para el cuidado de bebés, tampones, jabón, detergentes, productos para la salud y el cuidado de la piel, limpiadores domésticos y tazas de inodoros.

[0072] La superficie también puede ser artículos de laboratorio que incluyen, entre otros, portaobjetos microscópicos, una campana de cultivo, una placa de Petri o cualquier otro tipo adecuado de recipiente o recipiente de cultivo de tejidos conocido en la técnica.

[0073] Los inventores de esta solicitud también contemplan el uso de las composiciones de la presente invención como agentes anti-bioincrustantes.

[0074] Las superficies submarinas incluyen cualquier superficie sumergida en agua, incluidos los cascos de los barcos / embarcaciones (es decir, el cuerpo o el bastidor de una embarcación o barco), vehículos de inmersión, ayudas a la navegación, pantallas, redes, construcciones, plataformas marinas flotantes o emplazadas (por ejemplo, muelles), boyas, equipos de señalización y artículos que entran en contacto con agua de mar o agua salada. Otras superficies submarinas incluyen estructuras expuestas al agua de mar, como pilotes, marcadores marinos, medios de transporte submarinos como cables y tuberías, redes de pesca, mamparos, torres de enfriamiento y cualquier dispositivo o estructura que funcione sumergido.

[0075] Las composiciones de la presente invención pueden incorporarse en recubrimientos marinos para limitar la bioincrustación marina indeseable. Por lo tanto, los agentes antiincrustantes de la presente invención pueden formularse para que no contengan materiales tóxicos (como los metales pesados) y aún conserven su eficacia. La pintura anti-bioincrustante de la presente invención puede contener además aglutinante(s), pigmento(s), disolvente(s) y aditivo(s).

[0076] Los ejemplos de disolventes que pueden usarse incluyen hidrocarburos aromáticos tales como xileno y tolueno; hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano, ésteres tales como acetato de etilo y acetato de butilo; amidas tales como N-metilpirrolidona y N, N-dimetilformamida; alcoholes tales como alcohol isopropílico y alcohol butílico; éteres tales como dioxano, THF y dietil éter; y cetonas tales como metil etil cetona, metil isobutil cetona y metil isoamil cetona. Los disolventes se pueden usar solos o en combinación de los mismos.

[0077] Los ejemplos de aglutinantes que se pueden usar incluyen resinas alquídicas, emulsiones acrílicas o vinílicas, resinas de poliuretano, resinas epoxídicas, resinas basadas en silicona, resinas acrílicas, resinas basadas en silicatos inorgánicos, resinas vinílicas, particularmente un copolímero de cloruro de vinilo / acetato de vinilo y rosina. Ejemplos de pigmentos que se pueden usar incluyen dióxido de titanio, óxido cuproso, óxido de hierro, talco, escamas de aluminio, escamas de mica, óxido férrico, tiocianato cuproso, óxido de cinc, meta-arsenato de acetato cúprico, cromato de cinc, dimiti ditiocarbamato de dimetilo, cinc etileno bis (ditiocarbamato) y dietil ditiocarbamato de

zinc.

[0078] Los ejemplos de aditivos que pueden incorporarse en la composición de recubrimiento incluyen deshumidificadores, agentes humectantes / dispersantes, agentes anti-sedimentación, agentes anti-desollado, agentes de secado / curado, agentes anti-deterioro y aditivos comúnmente empleados en composiciones de recubrimiento como estabilizantes y anti- agentes espumantes. Además, cualquier antibiótico que sea relativamente insoluble en agua de mar puede usarse con una pintura marina anti-incrustante.

[0079] Los métodos de preparación de pinturas marinas anti-bioincrustantes se explican en detalle en U.S. Pat. No. 4,678,512; U.S. Pat. No. 4,286,988; U.S. Pat. No. 4,675,051; U.S. Pat. No. 4,865,909; y U.S. Pat. No. 5,143,545.

[0080] Las composiciones de la presente invención también se pueden usar para proporcionar propiedades antibacterianas en cosméticos, para evitar el deterioro del producto.

[0081] Las composiciones pueden usarse además para proporcionar un efecto antibacteriano a la boca, los dientes y las encías, tal como por incorporación en una pasta de dientes, enjuague bucal o goma de mascar. Tomadas en conjunto, las presentes enseñanzas representan una amplia gama de nuevos agentes antiadhesivos aislados de organismos tales como organismos acuáticos y musgo. El amplio espectro de los efectos de desprendimiento de estos agentes antiadhesivos (p. ej., La eliminación de la adhesión de bacterias gram positivas y gram negativas), junto con su capacidad para afectar las etapas iniciales y vulnerables de la formación de biopelículas microbianas, hace que estos agentes sean candidatos principales como anti- agentes de biopelículas. Además, los agentes antiadhesivos descritos en el presente documento son clonables, permitiendo modificaciones y la producción en masa de los mismos. Además, su estabilidad (es decir, resistencia a las condiciones ambientales) hace que estos agentes sean adecuados para una amplia gama de aplicaciones.

[0082] Se apreciará que el tratamiento de enfermedades infecciosas según la presente invención se puede combinar con otros métodos de tratamiento conocidos en la técnica (es decir, terapia de combinación). Estos incluyen, pero no se limitan a, agentes antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, aminoglucósidos, macrólidos, lincomicinas, tetraciclinas, cloranfenicol y griseofulvina. Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

[0083] Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la composición farmacéutica directamente en la región del tejido de un paciente.

[0084] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento o liofilización. Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

[0085] Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica pueden formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, los penetrantes apropiados para la barrera a permear se usan en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

[0086] Para la administración tópica, las composiciones de la presente invención se pueden formular como un gel, una crema, un lavado, un enjuague o un aerosol.

[0087] Para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos portadores permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden hacer usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar los auxiliares adecuados, según se desee, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carbometilcelulosa sódica; y / o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, como alginato de sodio.

[0088] Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados Para este propósito, se pueden usar

soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo. Las composiciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de inserción por presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga como la lactosa, aglutinantes como almidones, lubricantes como el talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, los ingredientes activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

[0089] Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de tabletas o pastillas formuladas de manera convencional.

[0090] Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro Tetrafluoroetano, o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un dispensador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, como lactosa o almidón.

[0091] La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y / o dispersión.

[0092] Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas o basadas en agua apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano.

[0093] Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos, para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución a base de agua estéril, libre de pirógenos, antes del uso.

[0094] La composición farmacéutica de la presente invención también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de ingredientes activos (por ejemplo, una composición de organismo acuático) efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una infección patógena (por ejemplo, fiebre) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

[0095] Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la dosis o la cantidad terapéuticamente efectiva se pueden estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e in vitro. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar in vitro, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos in vitro y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosificación puede variar según la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. El médico individual puede elegir la formulación exacta, la vía de administración y la dosis en función del estado del paciente. (Ver, por ejemplo, Fingl, E. et al. (1975), “The Pharmacological Basis of Therapeutics", Chp. 1, p.1.) La cantidad de dosis y los intervalos de administración pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles suficientes de plasma o cerebro del ingrediente activo para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, concentración mínima efectiva, MEC). El MEC variará para cada preparación, pero puede

estimarse a partir de datos in vitro. Las dosis necesarias para lograr el MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

[0096] Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que dura desde varios días hasta varias semanas, o hasta que se efectúe la cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad. . La cantidad de una composición que se administrará dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, la gravedad de la aflicción, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc.

[0097] Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un paquete o dispositivo dispensador, como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El paquete puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como un paquete de blíster. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El paquete o dispositivo dispensador también puede ir acompañado de una notificación en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para humanos o veterinarios. administración. Dicha notificación, por ejemplo, puede incluir el etiquetado aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para medicamentos recetados o un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y marcarse para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla con más detalle anteriormente.

[0098] Objetos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención se harán evidentes para un experto en la técnica al examinar los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos. Además, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se describe anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

PROTEINAS Y PEPTIDOS

[0099] El péptido en las composiciones se puede obtener de diferentes fuentes. Las proteínas y los péptidos naturales se pueden encontrar en animales, incluidos los humanos. Además, las plantas y organismos marinos y de agua dulce, incluidos los invertebrados de agua de cuerpo blando, el pescado y el musgo, producen varios factores que pueden prevenir la colonización microbiana en la superficie de su cuerpo, ya que carecen de inmunidad específica y están rodeados por una amplia gama de especies de organismos microbianos. Los organismos más "sensibles" son los invertebrados que pertenecen a la cnidaria que incluye las anémonas de mar, corales, medusas, hidroides, medusas y abanicos de mar. Este organismo de cuerpo blando, que carece de protección física, como escamas o conchas, utiliza proteínas y metabolitos secundarios para protegerse del entorno microbiano que los rodea.

[0100] Además, se informó anteriormente que los organismos marinos (por ejemplo, las esponjas) producen metabolitos secundarios que exhiben actividades antibacterianas y antifúngicas [Amade et al., Supra]. Además, se ha demostrado que las anémonas de mar (por ejemplo, Actinia equina) producen péptidos tóxicos formadores de poros (es decir, equinatoxinas), que lisan y destruyen las células eucarióticas de manera similar a otros péptidos antimicrobianos pequeños [Anderluh et al., Supra].

[0101] Aunque se sabe en la técnica que las secuencias de longitud completa de varias proteínas están relacionadas con su función citolítica, los péptidos específicos responsables del efecto citolísico no se han identificado previamente.

[0102] Mientras se reducía la presente invención a la práctica, los presentes inventores descubrieron que las proteínas humanas y los organismos sésiles acuáticos comprenden propiedades anti - biopelículas. Como se muestra en la sección de ejemplos que sigue, los presentes inventores han demostrado que las proteínas y los péptidos encontrados en humanos y cnidarios sésiles (por ejemplo, las anémonas de mar) pueden hacer que los microorganismos se desprendan de las superficies y entre sí (Figuras 1-6). Estas proteínas y péptidos no eran bactericidas y no afectaron el crecimiento bacteriano.

[0103] Tomadas en conjunto, las presentes enseñanzas representan una amplia gama de nuevos agentes antiadhesivos derivados de organismos sésiles humanos y acuáticos, en particular de cnidarios sésiles. El amplio espectro de los efectos anti-biopelícula de estos agentes hace que estos agentes sean los principales candidatos como agentes anti-biopelícula. Además, los agentes antiadhesivos descritos en el presente documento son clonables, permitiendo modificaciones y la producción en masa de los mismos. Además, su estabilidad (es decir, resistencia a las condiciones ambientales) hace que estos agentes sean adecuados para una amplia gama de aplicaciones.

[0104] Los presentes inventores han demostrado que varias fracciones activas obtenidas de anémonas de mar que utilizan separaciones por cromatografía líquida muestran un alto nivel de prevención de la adherencia microbiana a las superficies abióticas. La anémona de mar incluye a 46 familias que se pueden encontrar en fuentes de agua de todo el mundo. La mayoría de las anémonas de mar son sésiles, con un pie especializado que se utiliza para anclarlas en sustratos blandos o para adherirse a rocas y corales. La actividad antiadhesiva se demostró con varias especies de anémonas de mar pertenecientes a diferentes géneros: Actinia equina, Aiptasia y Ammonia. Se ha demostrado que la región N terminal de la citotoxina anémona está involucrada en el efecto citotóxico [Ref: Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I5 Guncar G, Turk D, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): la formación de poros por equinatoxina, una toxina eucariótica que forma poros, requiere una Región N-terminal flexible y un sándwich beta estable. J Biol Chem. 279 (45): 46509-46517]. Una proteína que tiene cierta semejanza con la región C terminal de la superfamilia de citotoxinas de anémona (pfam06369) (un grupo de superfamilia es un conjunto de modelos de dominio conservado, de una o más bases de datos de origen, que generan una anotación superpuesta en las mismas secuencias de proteínas. Se asume que estos modelos representan dominios relacionados evolutivamente y pueden ser redundantes entre sí), cuya región no está involucrada en la citotoxicidad, también ha sido identificada en peces por los presentes inventores. Esta proteína tiene una región altamente conservada, con función desconocida, que también es un dominio rico en Trp, y puede ser importante para la unión de la proteína a la membrana lipídica. Los presentes inventores también han encontrado esta región en el musgo Physcomitrella patens. Por lo tanto, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que esta región proporciona un péptido que es altamente eficaz para dispersar biopelículas o desprender las biopelículas de las superficies, mientras que carece de actividad citotóxica.

[0105] Sobre la base del análisis bioinformático, se cree que la proteína ha cambiado en organismos superiores (incluso en humanos), en la región altamente conservada, a FDYDWY, que se puede encontrar en proteínas, representadas en el GenBank como GPCR 137b, con rango de tamaño desde 128aa-400aa. En humanos, este péptido es parte del receptor 137B acoplado a la proteína G (GENE ID: 7107 GPR137B) ubicado en 269-274. Basado en la entrada 060478 de UniProtKB / Swiss-Prot, la región, que comienza en 259 y termina en 292, es una región extracelular, que apoya la teoría de que este péptido es la parte activa de la proteína. Análisis bioinformático del antiguo organismo marino Ciona intestinalis identificó una proteína de 368 aminoácidos, similar al receptor 137ba acoplado a la proteína G [Número de acceso GeneBank XP_002125109]. La región similar al péptido antiadhesivo es SPLRCSELSSFNFDWYNVSDQADLVN. Basándose en esta información, y en el hecho de que Ciona intestinalis también está expuesta a una gran diversidad de microorganismos, el péptido FNFDWY también es muy eficaz para dispersar biopelículas o separar las biopelículas de las superficies, al mismo tiempo que carece de actividad citotóxica.

[0106] La proteína o péptido puede ser natural y aislado de cualquier animal. Preferiblemente, el animal es un vertebrado, tal como, por ejemplo, un pez, un anfibio (incluyendo una rana, un sapo, un tritón o una salamandra), un ave, un reptil (como un cocodrilo, un lagarto, una serpiente, una tortuga, o una tortuga acuática) o un mamífero (incluido un ser humano).

[0107] Los péptidos de la presente invención pueden comprender opcionalmente al menos dos secuencias, conectadas por un linker de algún tipo, de modo que el N-terminal de una primera secuencia peptídica esté conectado al C-terminal del linker, y el C-terminal de una segunda secuencia peptídica está conectada al N-terminal del linker.

[0108] Los péptidos de la presente invención se ciclan (es decir, en forma cíclica) y se indican en esta solicitud como tales con el término "cyc".

[0109] En una realización, cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S. En realizaciones específicas, uno o más de los péptidos se modifican con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en la que los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0110] Los péptidos ejemplares contienen un dominio que comprende al menos un péptido y que es eficaz contra la adhesión de un organismo unicelular a una superficie o a otros organismos unicelulares. Más preferiblemente, el dominio se incluye como parte de una proteína. Opcionalmente y lo más preferiblemente, el dominio exhibe un comportamiento antiadhesivo, por ejemplo, para el desprendimiento y / o el tratamiento de una biopelícula, pero no exhibe un comportamiento citotóxico.

[0111] Los péptidos pueden alterarse opcionalmente para formar análogos no peptídicos, que incluyen, pero no se limitan a, reemplazar uno o más enlaces con enlaces menos lábiles, ciclación y similares. Adicional o alternativamente, un péptido puede convertirse opcionalmente en una molécula pequeña a través del modelado por computadora, como se describe, por ejemplo, en PCT Application No. WO/2007/147098.

[0112] Los peptidomiméticos pueden usarse opcionalmente para inhibir la degradación de los péptidos mediante procesos enzimáticos u otros procesos degradativos. Los peptidomiméticos pueden producirse opcional y preferiblemente mediante técnicas de síntesis orgánica. Los ejemplos no limitantes de peptidomiméticos adecuados incluyen aminoácidos D de los aminoácidos L correspondientes, tetrazol (Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110:

5875 5880 (1988)); isosteras de enlaces amida (Jones et al, Tetrahedron Lett. 29: 3853 3856 (1988)); LL 3 amino 2 propenidona 6 ácido carboxílico (LL Acp) (Kemp et al., J. Org. Chem. 50: 5834 5838 (1985)). Análogos similares se muestran en Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5081 5082 (1988) tanto como Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 5057 5060 (1988), Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29: 4935 4938 (1988) y Kemp et al., J. Org. Chem. 54: 109 115 (1987). Otros peptidomiméticos adecuados pero ejemplares se muestran en Nagai and Sato, Tetrahedron Lett. 26: 647 650 (1985); Di Maio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1985); Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30: 2317 (1989); Olson et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 323 333 (1990); Garvey et al., J. Org. Chem. 56: 436 (1990). Otros peptidomiméticos ejemplares adecuados incluyen hidroxi 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolina 3 carboxilato (Miyake et al., J. Takeda Res. Labs 43:53 76 (1989)); 1,2,3,4 tetrahidro-isoquinolina 3 carboxilato (Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 133: 2275 2283 (1991)); ácido isoquinolona carboxílico de histidina (HIC) (Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991)); (2S, 3S) metil fenilalanina, (2S, 3R) metil fenilalanina, (2R, 3S) metil fenilalanina y (2R, 3R) metil fenilalanina (Kazmierski y Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)).

[0113] Aminoácidos no naturales ejemplares, ilustrativos pero no limitativos incluyen beta-aminoácidos (beta3 y beta2), homo-aminoácidos, aminoácidos cíclicos, aminoácidos aromáticos, derivados de Pro y Pyr, derivados de alanina 3-sustituidos, derivados de glicina, Derivados de Phe y Tyr sustituidos en el anillo, aminoácidos de núcleo lineal o diaminoácidos. Están disponibles en una variedad de proveedores, como Sigma-Aldrich (EE. UU.), por ejemplo. En la presente invención, opcionalmente cualquier parte de un péptido puede modificarse químicamente, es decir, modificarse mediante la adición de grupos funcionales. La modificación puede realizarse opcionalmente durante la síntesis de la molécula si se sigue un proceso químico sintético, por ejemplo, añadiendo un aminoácido modificado químicamente. Sin embargo, también es posible la modificación química de un aminoácido cuando ya está presente en la molécula (modificación "in situ").

[0114] El aminoácido de cualquiera de las regiones de secuencia de la molécula puede modificarse opcionalmente de acuerdo con uno cualquiera de los siguientes tipos de modificación a modo de ejemplo (en el péptido conceptualmente visto como "modificado químicamente"). Tipos de modificación ejemplares no limitativos incluyen carboximetilación, acilación, fosforilación, glicosilación o acilación grasa. Los enlaces de éter se pueden usar opcionalmente para unir el hidroxilo de serina o treonina al hidroxilo de un azúcar. Los enlaces amida pueden usarse opcionalmente para unir los grupos glutamato o aspartato carboxilo a un grupo amino en un azúcar (Garg y Jeanloz, Avances en Química de Carbohidratos y Bioquímica, vol. 43, Prensa Académica (1985); Kunz, Ang. Chem. En t. Ed. Inglés 26: 294-308 (1987)). Los enlaces acetal y cetal también pueden formarse opcionalmente entre aminoácidos y carbohidratos. Derivados de acilo de ácidos grasos pueden hacerse opcionalmente, por ejemplo, por acilación de un grupo amino libre (por ejemplo, lisina) (Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990).)).

[0115] Las composiciones de la presente invención también pueden expresarse in vivo usando técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, usando organismos sésiles acuáticos transgénicos).

[0116] Las composiciones de la presente invención pueden estar desprovistas de actividad citotóxica o citostática, por ejemplo, no son bactericidas ni bacteristáticas.

[0117] Los presentes inventores han caracterizado y aislado un péptido natural que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY, YDWHLY y YDYSFY que tienen propiedades de agregados anticelulares (por ejemplo, anti-biopelícula). . Por ejemplo, el péptido puede comprender al menos una de las siguientes secuencias: LFSVPYDYNWYSNWW, LFSVPYDYNWYSNWW, FSVPYDYNLYSNWW, MFSVPYDYNLYSNWV, MFSVPFDYNFYSNWW, LFSVPFDYNFYSNWW, MFSVPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYTNWW, MWSVPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYKNWL, LFSVPFDYNLYSNWW, LFSIPFDYNLYSNWW, MFSVPWDYNLYKNWL, MFSVPWDYNLYKNWF, MFSVPFFDYNWYSNWW, MASIPYDWNLYQSWA, MASIPYDWNLYSAWA o MASIPYDWHLYNAWA, o combinaciones de los mismos.

[0118] Los presentes inventores han caracterizado y aislado un péptido natural que comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en: FDYDWY, FNFDWY y FDFDWY, que tienen propiedades efectivas de agregados anticelulares (por ejemplo, anti-biopelícula). Por ejemplo, el péptido puede comprender al menos una de las siguientes secuencias: SFDYDWY, SFDYDWYN, HSFDYDWYN, HSFDYDWYNV, VHSFDYDWYNV, VHSFDYDWYNVS, SVHSFDYDWYNVS, SVHSFDYDWYNVSD, KSVHSFDYDWYNVSD, KSVHSFDYDWYNVSDQ, NKSVHSFDYDWYNVSDQ, NKSVHSFDYDWYNVSDQA, QNKSVHSFDYDWYNVSDQA, QNKSVHSFDYDWYNVSDQAD, SQNKSVHSFDYDWYNVSDQAD, SQNKSVHSFDYDWYNVSDQADL, FSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADL, FSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLK , SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLK, SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN, CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN o CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNC, o combinaciones de los mismos.

[0119] Los presentes inventores han caracterizado y aislado un péptido natural que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SVPYDYNWYSNW, SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN y SVHSFDYDWYNV.

[0120] El péptido proporcionado y que se utilizará aquí es un péptido cíclico, en el que el péptido es

NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0121] Una proteína o agente peptídico ejemplar derivado de un organismo acuático se puede usar para desprender un organismo celular individual de una superficie o de otros organismos unicelulares como equinatoxina. Las equinatoxinas (es decir, las equinatoxinas 1, 2 y 3) tienen toxinas formadoras de poros que se encuentran en las anémonas de mar (por ejemplo, Actinia equina). Las equinatoxinas pueden estar comprendidas en células de anémona de mar o pueden aislarse de ellas. Se puede usar cualquier equinatoxina de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación para desprender microorganismos de una superficie o de otra. Un ejemplo es el precursor de equinatoxina-2 (identificador de acceso de GenBank> gi | 48428895 | sp | P61914.1 | ACTP2_ACTEQ (equinatoxina II) (EqT II) (EqTII)):

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDI
LKTVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPH
GKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYS
NWWNVRIYKGKRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSR
GFMNSSGHAILEIHVSKA

[0122] Otra proteína ejemplar derivada de una anémona de mar es Stichodactyla helianthus ((Identificador de acceso de GenBank> gi | 2815496 | sp | P07845.2 | ACTP2_STOHE (Sticholysin II) (StnII) (Cytolysin St II) (Cytolysin III)) (Cytotoxin)):

ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVSRKIAVGIDNESGGTWTALNAYF
RSGTTDVILPEFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAFAYYMSSGNTLG

VMFSVPFDYNWYSNWWDVKIYSGKRRADQGMYEDLYYGNPYRGDNG
WHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR

[0123] Una proteína ejemplar derivada de peces óseos es Danio rerio ((identificador de acceso de GenBank> gi | 125821212 | ref) XP_001342650.1 | PREDICTED (Danio rerio)):

MTESAEAVAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPT
VRPLKTEVCTFSKSAAHATGSVGVLTYDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWD
YNLYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKEMYYQKNQHGFVREEANGSGINF
EGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWDKLLSPMAQMDC

[0124] Otra proteína ejemplar derivada de peces óseos es Tetradodon nigroviridis ((identificador de acceso de GenBank > gi | 47218822 | emb | CAG02807.1 | producto proteico sin nombre (Teraodon nigroviridis)):

MESAEAVAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVR
PLMTEVCTFSKSSGIPTGSVGVLTYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSF
YNNWFAVGIYETGTKCNEGLYKQMYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYV
GGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDAFFPFSE

[0125] Una proteína ejemplar derivada del musgo es Physcomitrella patens ((identificador de acceso de GenBank > gi | 16806023 | ref | XP_001782104.1 | proteína predicta (Physcomitrella patens subsp. Patens)):

MVVHLIAMGLRYSETIMKTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKI
AIGFKNLTDYTLENLGVYFNSGSSDRSIAYKINAQEALLFSARKSDHTARG
TVGTFSYYIQDEDKTVHVMWSVPFDYNLYSNWWNIAVVDGRQPPDSNV
HDNLYNGSGGMPYPNKPDQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVELKKA

[0126] Una proteína ejemplar derivada de aves es Gallus gallus (GenBank, identificador de acceso> gi | 118129726 | ref] XP_001231839.1 | PREDICTED: hipotética isoforma de proteína (Gallus gallus)):

MPPKEKKENDKPCNDNCQPKPQGKGVESLMKNIDVCRSVGLEIINRTRTV
TLTDFRSYCFSGKIVTTLPFEIGPDSKGICIFAKTPYSLRGSVGTVVCKADT

FFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIFTEPNHLGNLGDVFSKMMKSKPYCGSSL
FQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVEDMDPPPYSKG
M

[0127] Una proteína ejemplar derivada de un ornitorrinco es Ornithorhynchus anatinus (identificador de acceso de GenBank o> gi | 149638239 | ref | XP_001512702.1 | PREDICTED: proteína de membrana integral GPR137B-like (Ornithorhynchus anatinus)):

MEGSPPGRPPGNDSLPPTLSPAVPPYVKLGLTSVYTAFYSLLFVFVYAQLWLVLH
HRHRRLSYQTVFLFLCLLWAALRTVLFSFYFRDFLAANKLGPFGFWLLYCCPVC
LQFFTLTLMNLYFSQVIFKAKSKFSPELLKYRLALYLASLVVSLVFLLVNLTCAV
LVKTGTWERKVVVSVRVAINDTLFVLCAVSLSVCLYKISKMSLANIYLESKGSSV
CQVTAIGVTVILLYASRACYNLFTLSFSRHGSSFDYDWYNVSDQADLKSQLGDA
GYVVFGVVLFVWELLPTSLVVYFFRVRNPTKDPTNPRGVPSHAFSPRSYFFDNPR
RYDSDDDLAWNVAPQGFQGSFAPDYYDWGQPSSSFTGHIGSLQQDSDLDNGKP
SHA

[0128] Un ejemplo de un péptido aplicable derivado de la equinatoxina es SVPYDYNWYSNW, ya sea en forma soluble o conjugado con polietilenglicol (PEG) y ácido palmítico y capaz de adherirse a una superficie. La forma

soluble y conjugada del péptido en forma cíclica y que tiene una cisteína en cada uno de los extremos N y C terminales es la siguiente:

Eqt2ZCyc (péptido acuático soluble): CSVPYDYNWYSNWC

Eqt2ZCyc-3PEG-Pal (péptido acuático adhesivo): Pal - (miniPEG) 3-CSVPYDYNWYSNWC

Los péptidos basados en un subconjunto de secuencias de equinatoxina y sus variantes también son aplicables. El cuadro a continuación muestra realizaciones de péptidos 12-mer específicos, con aminoácidos aplicables para cada una de las 12 posiciones. Los aminoácidos en negrita corresponden a aminoácidos que no se producen de forma natural en las posiciones correspondientes, pero que proporcionan péptidos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Equinatoxin		S	V	P	Y	D	Y	N	W	Y	S	N	W	
		N	I		F	N	F	S	L	N	K	E	R	
		I	A		W	**Q**	R	G	F	F	N	**D**	V	
		V	N			**E**	W	D	M	K	T	**Q**	L	
		R	**L**				V	H	S	L	E	S	**I**	
		K	**Q**				H	**E**	T	R	R	A	**K**	
		Q					L	**Q**	R	**I**	L	I	**F**	
		L					**K**	I	A	**V**	Q		E	
							I		G	**W**	**I**			
									V	**Q**	**V**			
									P		**D**			
									Y		**K**			
									I					
									K					

[0129] El péptido proporcionado y que se utilizará aquí es un péptido cíclico, en el que el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0130] Un agente peptídico ejemplar puede derivarse de un humano. Por ejemplo, un péptido derivado de GPCR137b (GPR137B (TM7SF1)) se puede usar para desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares. GPCR137b se puede encontrar en el riñón, corazón, cerebro y tejido de placenta humanos. [Spangenberg et al., Genomics. 1998 Mar 1; 48 (2): 178-85; Bjarnadottir et al., Genomics, 88 (3): 263-273 (2006)]. Los péptidos SFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKN y SVHSFDYDWYNV, como péptidos cíclicos con cisteína unidos a los C y N terminales de los péptidos en forma soluble o conjugados con polietilenglicol y ácido palmítico y son capaces de adherirse a una superficie, son dos ejemplos de derivados apropiados de GPCR137b humano:

grZ28Cyc (péptido humano largo soluble): CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNC

grZ28Cyc-3PEG-Pal (péptido largo adhesivo humano): Palmitoyl- (miniPEG) 3-CSFSQNKSVHSFDYDWYNVSDQADLKNC

grZ14s-nvCyc (péptido corto soluble humano): CSVHSFDYDWYNVC

grZ14s-nvCyc-3PEG-Pal (péptido corto adhesivo humano): Pal - (miniPEG) 3-CSVHSFDYDWYNVC

Los péptidos basados en un subconjunto de secuencias GPCR137b y sus variantes también son aplicables. El cuadro a continuación muestra realizaciones de péptidos 12-mer específicos, con aminoácidos aplicables para cada una de las 12 posiciones. Los aminoácidos en negrita corresponden a aminoácidos que no se producen de forma natural en las posiciones correspondientes, pero que proporcionan péptidos que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
GPCR137B		S	V	H	S	F	D	Y	D	W	Y	N	V	
		N	I	N	**P**	**W**	N	F	G	**F**	**F**	**Q**	I	
		T	L	Q	A	**Y**	**E**	**W**	**E**	**Y**	**W**		**L**	
		K	Y	E	T		**Q**							
		R	G	D										
		H	**F**	S										
		E	**W**											
		I												
		Q												
		D												

[0131] El péptido proporcionado y que se utilizará aquí es un péptido cíclico, en el que el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

[0132] Un péptido ejemplar derivado de Physcomitrella patens (musgo) es SVPFDYNLYSNW. Esta misma secuencia también se puede encontrar en Selaginella moellendorffii (número de acceso de Genbank: XP_002963283), un tipo de planta, y en las siguientes anémonas de mar: Phyllodiscus semoni (número de acceso de Genbank: BAI70365); Heteractis crispa (Número de Acceso Genbank: AAW47930); y Actineria villosa (Número de Acceso Genbank: BAD74019). La forma ciclada del péptido es la siguiente: **Physco-Cyc:** CSVPFDYNLYSNWC

EJEMPLOS

Ejemplo 1: desprendimiento de biopelícula de la noche a la mañana con incubación Eqt2Z-cyc durante la noche

[0133] Se creó una biopelícula mediante incubación. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante la noche en pocillos a 37 ° C, lo que permite que el microorganismo se adhiera a la superficie del pocillo. Péptido Eqt2Z-cyc [Síntesis de péptidos personalizados; Peptron, Corea] a diferentes concentraciones se agregó posteriormente a los pocillos y se dejó incubar durante la noche. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 1 demuestra que los péptidos Eqt2Z-cyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. control.

Ejemplo 2: desprendimiento de biopelículas de 2 horas con incubación durante la noche de Eqt2Z-cyc

[0134] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 2 horas en un pocillo a 37 ° C. El péptido Eqt2Z-cyc a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante la noche. El péptido Abac10-cyc sirvió como control negativo. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 2A demuestra que los péptidos Eqt2Z-cyc causaron un desprendimiento de

microorganismos mucho mayor que en la P.a. Control o control negativo.

Ejemplo 3: desprendimiento de biopelículas de 2 horas con incubación Eqt2Z-cyc de 24 horas

[0135] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 2 horas en un pocillo a 37 ° C. El péptido Eqt2Z-cyc a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. El péptido Abac10-cyc sirvió como control negativo. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 2B demuestra que los péptidos Eqt2Z-cyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. Control o control negativo. La tinción se realizó con cristal violeta a OD 595 nm.

Ejemplo 4: desprendimiento de biopelículas de 2 horas con incubación grZ14s-nvCyc de 24 horas

[0136] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 2 horas en un pocillo a 37 ° C. El péptido grZ14s-nvCyc [Síntesis de péptidos personalizados; Peptron, Corea] a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. El péptido Abac10-cyc sirvió como control negativo. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 3 demuestra que los péptidos grZ14s-nvCyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. Control o control negativo. La tinción se realizó con cristal violeta a OD 595 nm.

Ejemplo 5: desprendimiento de biopelículas de 24 horas con incubación Eqt2Z-cyc de 24 horas

[0137] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 24 horas en un pocillo a 37 ° C. El péptido Eqt2Z-cyc a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. El péptido Abac10-cyc sirvió como control negativo. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 4 demuestra que los péptidos Eqt2Z-cyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. Control o control negativo. La tinción se realizó con cristal violeta a OD 595 nm.

Ejemplo 6: desprendimiento de biopelículas de 24 horas con grZ14s-nvCyc de 24 horas

[0138] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 24 horas en un pocillo a 37 ° C. El péptido grZ14s-nvCyc a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. El péptido Abac10-cyc sirvió como control negativo. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 5 demuestra que los péptidos grZ14s-nvCyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. Control o control negativo. La tinción se realizó con cristal violeta a OD 595 nm.

Ejemplo 7: desprendimiento de biopelículas de 24 horas con PhyscoZ-Cyc durante la noche

[0139] Una biopelícula fue creada por el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) durante 24 horas en un pocillo a 37 ° C. Péptido PhyscoZ-Cyc [Síntesis de péptidos personalizados; Peptron, Corea] a diferentes concentraciones se añadió posteriormente al pocillo y se dejó incubar durante 24 horas. El P.a. control fue *Pseudomonas aeruginosa* solo. La Figura 6 demuestra que los péptidos PhyscoZ-Cyc causaron un desprendimiento de microorganismos mucho mayor que en la P.a. control. La tinción se realizó con cristal violeta a OD 595 nm.

Ejemplo 8: grZ14s-nvCyc aumenta la actividad antibiótica de Imipenem y Ampicilina

[0140] La capacidad de grZ14s-nvCyc para mejorar la actividad de Imipenem o ampicilina se realizó incubando primero los pocillos en una placa de 96 pocillos con *Pseudomonas aeruginosa* Durante 24 horas a 37 ° C y 50 rpm agitando. La placa se lavó 2 veces con solución tampón de fosfato. Los pocillos se llenaron con el antibiótico solo o el antibiótico con grZ14s-nvCyc (100 ng / ml). Los pocillos se incubaron luego durante 48 horas (24 horas para ampicilina) a 37 ° C y 50 rpm de agitación. Luego se agregaron 0.3% de Triton X-100 y 0.45% de EDTA a los pocillos, llevando los pocillos a una concentración final de 0.075% de Triton X-100 y 0.1125% de EDTA. Las placas se sonicaron luego en un baño de sonicador durante 12 minutos. Los pocillos se diluyeron en serie en PBS. Las soluciones se sembraron luego en una placa de sangre de agar y se incubaron a 37 ° C durante 24 horas.

[0141] Los resultados se presentan en las Figuras 7 y 8. Como lo demuestra la Figura 7, el número de bacterias vivas fue mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc e Imipenem que en los pocillos con Imipenem solo, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc mejora la actividad del antibiótico. La Figura 8 demuestra que el número de bacterias vivas es mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc y Ampicilina que en los pocillos con ampicilina sola, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc aumenta la actividad del antibiótico.

Ejemplo 9: grZ14s-nvCyc aumenta la actividad antibiótica de la vancomicina

[0142] La capacidad de grZ14s-nvCyc para mejorar la actividad de la vancomicina se realizó incubando primero los pocillos en una placa de 96 pocillos con *Staphylococcus aureus* Durante 24 horas a 37 ° C y 50 rpm agitando. La placa se lavó 2 veces con solución tampón de fosfato. Los pocillos se llenaron con el antibiótico solo o el antibiótico con grZ14s-nvCyc (100 ng / ml). Los pocillos se incubaron luego durante 24 horas a 37ºC y con agitación a 50 rpm. Luego se agregaron 0.3% de Triton X-100 y 0.45% de EDTA a los pocillos, llevando los pocillos a una concentración final de 0.075% de Triton X-100 y 0.1125% de EDTA. Las placas se sonicaron luego en un baño de sonicador durante 12 minutos. Los pocillos se diluyeron en serie en PBS. Las soluciones se sembraron luego en una placa de sangre de agar y se incubaron a 37 ° C durante 24 horas.

[0143] Los resultados se presentan en la Figura 9. Como se demuestra, el número de bacterias vivas fue mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc y vancomicina que en los pocillos con vancomicina sola, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc aumenta la actividad del antibiótico.

Ejemplo 10: grZ14s-nvCyc aumenta la actividad antifúngica de la anfotericina

[0144] La capacidad de grZ14s-nvCyc para mejorar la actividad de la anfotericina se realizó primero incubando los pocillos en una placa de 96 pocillos con *Candida albicans* Durante 24 horas a 37 ° C y 50 rpm agitando. La placa se lavó 2 veces con solución tampón de fosfato. A continuación, los pocillos se llenaron con el antifúngico solo o el antifúngico con grZ14s-nvCyc (100 ng / ml). Los pocillos se incubaron luego durante 24 horas a 37ºC y con agitación a 50 rpm. Las placas se lavaron de nuevo 2 veces con PBS. Se usó el ensayo de viabilidad de células microbianas BacTiter-Glo (Promega, EE. UU.) Siguiendo el protocolo del fabricante y la lectura de luminiscencia.

[0145] Los resultados se presentan en la Figura 10. Como se demuestra, el número de hongos vivos fue mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc y en anfotericina que en los pocillos con anfotericina sola, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc mejora la actividad de la anfotericina.

Ejemplo 11: grZ14s-nvCyc aumenta la actividad antifúngica de fluconazol

[0146] La capacidad de grZ14s-nvCyc para mejorar la actividad de fluconazol se realizó incubando primero los pocillos en una placa de 96 pocillos con *Candida albicans* Durante 24 horas a 37 ° C y 50 rpm agitando. La placa se lavó 2 veces con solución tampón de fosfato. A continuación, los pocillos se llenaron con el antifúngico solo o el antifúngico con grZ14s-nvCyc (100 ng / ml). Los pocillos se incubaron luego durante 24 horas a 37ºC y con agitación a 50 rpm. Las placas se lavaron de nuevo 2 veces con PBS. Se usó el ensayo de viabilidad de células microbianas BacTiter-Glo (Promega, EE. UU.) Siguiendo el protocolo del fabricante y la lectura de luminiscencia.

[0147] Los resultados se presentan en la Figura 11. Como se demuestra, el número de hongos vivos fue mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc y fluconazol que en los pocillos con fluconazol solo, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc mejora la actividad de fluconazol.

Ejemplo 12: grZ14s-nvCyc aumenta la actividad antibiótica de la kanamicina

[0148] La capacidad de grZ14s-nvCyc para mejorar la actividad de la kanamicina se realizó incubando primero los pocillos en una placa de 96 pocillos con *Pseudomonas aeruginosa* Durante 24 horas a 37 ° C y 50 rpm agitando. La placa se lavó 2 veces con solución tampón de fosfato. Los pocillos se llenaron con Kanamicina sola o Kanamicina con grZ14s-nvCyc (100 ng / ml). Los pocillos se incubaron luego durante 24 horas a 37ºC y con agitación a 50 rpm. Las placas se lavaron de nuevo 2 veces con PBS. Se usó el ensayo de viabilidad de células microbianas BacTiter-Glo (Promega, EE. UU.) Siguiendo el protocolo del fabricante y la lectura de luminiscencia.

[0149] Los resultados se presentan en la Figura 12. Como se demuestra, el número de bacterias vivas fue mucho menor en los pocillos con grZ14s-nvCyc y kanamicina que en los pocillos con kanamicina sola, lo que demuestra que grZ14s-nvCyc mejora la actividad de la kanamicina.

Ejemplo 13: Prevención de la adherencia y desprendimiento de microorganismos con diversos péptidos

[0150] Los péptidos representados en la Tabla 1 (cada uno con una cisteína unida al extremo N y C de los péptidos) se sintetizaron utilizando métodos en fase sólida y se purificaron al 90% (Peptron, Inc.; Taejeon, Corea del Sur). Los péptidos se disolvieron en 20 µl de dimetilsulfóxido y se diluyeron en agua destilada doble hasta una concentración de 10 mg / ml. Se realizaron diluciones adicionales en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

[0151] La capacidad de estos péptidos para prevenir la adhesión microbiana a una superficie o separar la adhesión microbiana de una superficie se midió contra las siguientes cepas microbianas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Candida albicans* (ATCC14053) y *Acinetobacter baumannii* (aislado clínico). Específicamente, los péptidos diluidos a concentraciones de 100 ng / ml se incubaron con los microbios anteriores durante 24 horas.

[0152] Las biopelículas de los microorganismos anteriores se cultivaron en una placa de poliestireno con fondo de 96 pocillos. Específicamente, se agregaron 180 µl de cultivos durante la noche a los pocillos con 20 µl de cada péptido diluido en PBS, ya sea simultáneamente para medir la prevención o después de un período de tiempo para medir el desprendimiento desde 4 horas hasta 24 horas después de la incubación. Después de 24 horas de incubación a 37 ° C, cada pocillo se lavó con agua y se tiñó con 250 µl de solución de cristal violeta. La solución de cristal violeta se eliminó lavando a fondo los pocillos con agua. Para cuantificar el número de células bacterianas unidas a los pocillos, el cristal violeta se solubilizó en 250 µl de dodecilsulfato de sodio al 1% y la absorbancia se midió a 595 nm. Como lo demuestra la Tabla 1, los péptidos disminuyeron la cantidad de unión microbiana a los pocillos (Tabla 1: "Prevención de biopelículas") y promovieron el desprendimiento de microbios (Tabla 1: "Desprendimiento"), evitando así la formación de biopelículas por parte de los microorganismos y causando que se desprendan donde ya se han adherido a una superficie.

TABLA 1. Prevención y desprendimiento de biopelículas por varios péptidos

Péptido: SelagZ-cyc CSVPFDYNLYSNWC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	88%(100ng / ml)	67%
Staphylococcus aureus ATCC25923	88%(100ng / ml)	35%
Candida albicans ATCC14053	80%(10ng / ml)	N / A
Acinetobacter baumannii	80%(100ng / ml)	50%
Péptido: PhyscoZ-cyc CSVPFDYNLYSNWC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	95%(100ng / ml)	75%
Staphylococcus aureus A TCC25923	65%(100ng / ml)	70%
Candida albicans ATCC14053	62%(10ng / ml)	N / A
Acinetobacter baumannii	N / A	50%
Péptido: EchoZ-cyc CSAPYNFNFYSNWC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	90%(100ng / ml)	65%
Staphylococcus aureus A TCC25923	85%(100ng / ml)	35%

Péptido: EchoZ-cyc CSAPYNFNFYSNWC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Candida albicans ATCC14053	80%(10ng / ml)	N / A
Acinetobacter baumannii	80%(100ng / ml)	60%

Péptido: XenoZ-S-cyc CSRYSSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa *ATCC27853*	57%(10ng / ml)	30%
Staphylococcus aureus ATCC25923	65%(100ng / ml)	N / A
Candida albicans ATCC14053	75%(100ng / ml)	50%
Acinetobacter baumannii	95%(100ng / ml)	49%

Péptido: CionaZ-S-cyc CSELSSFNFDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	75%(100ng / ml)	78%
Staphylococcus aureus A TCC25923	90%(100ng / ml)	N / A
Candida albicans ATCC14053	68%(100ng / ml)	42%
Acinetobacter baumannii	52%(100ng / ml)	80%

Péptido: CanisZ-cyc CNVHSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	95%(100ng / ml)	72%
Staphylococcus aureus ATCC25923	75%(100ng / ml)	N / A
Candida albicans ATCC14053	80%(100ng / ml)	45%
Acinetobacter baumannii	60%(10ng / ml)	73%

Péptido: NilotiZ-cyc CRVESFNYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa *ATCC27853*	90%(100ng / ml)	40%
Staphylococcus aureus A TCC25923	63%(100ng / ml)	65%
Candida albicans ATCC14053	30%(100ng / ml)	65%
Acinetobacter baumannii	87%(100ng / ml)	N / A

Péptido: SalmoZ-cyc CRVESFDFDWYNIC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**

Péptido: SalmoZ-cyc CRVESFDFDWYNIC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	90%(10ng / ml)	80%
Staphylococcus aureus A TCC25923	80%(100ng / ml)	75%
Candida albicans ATCC14053	55%(100ng / ml)	73%
Acinetobacter baumannii	95%(100ng / ml)	N / A

Péptido: TetraoZ-cyc CRINSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	45%(100ng / ml)	N / A
Staphylococcus aureus A TCC25923	52%(100ng / ml)	43%
Candida albicans ATCC14053	25%(100ng / ml)	55%
Acinetobacter baumannii	70%(10ng / ml)	N / A

Péptido: AnoliZ-cyc CTVNSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	95%(100ng / ml)	90%
Staphylococcus aureus A TCC25923	75%(100ng / ml)	72%
Candida albicans ATCC14053	55%(100ng / ml)	72%
Acinetobacter baumannii	92%(10ng / ml)	N / A

Péptido: MeleagZ-cyc CKVNSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	82%(100ng / ml)	65%
Staphylococcus aureus A TCC25923	73%(100ng / ml)	80%
Candida albicans ATCC14053	30%(100ng / ml)	62%
Acinetobacter baumannii	95%(100ng / ml)	N / A

Péptido: CapraZ-cyc CTVHSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Pseudomonas aeruginosa ATCC27853	68%(100ng / ml)	65%

Péptido: CapraZ-cyc CTVHSFDYDWYNVC	**Prevención de biopelículas (%)**	**Desprendimiento (%) (100ng / ml)**
Staphylococcus aureus ATCC25923	42%(100ng / ml)	55%
Candida albicans ATCC14053	25%(100ng / ml)	60%
Acinetobacter baumannii	90%(100ng / ml)	N / A

[0153] Los péptidos enumerados en la Tabla 2, sintetizados de la misma manera descrita anteriormente para la Tabla 1, tienen una cisteína que se agregó a los extremos N y C terminales de los péptidos, como se representa por la "C" en cada extremo de los péptidos. Estos péptidos también se ciclan, según lo indicado por el término "(C-C)" al final de cada péptido. EqSyn-Neg- y GRSyn-Neg se agregaron como controles negativos.

Tabla 2. Varios péptidos

No	ID de péptido	Secuencia	No	ID de péptido	Secuencia
1	EqSyn 1	CNIPFNFSLNKERC (C-C)	20	GRSyn 1	CSVHSWDYDWYNVC (C-C)
2	EqSyn2	CSVPYQYNWYSNWC (C-C)	21	GRSyn2	CSVHSYDFDWYNVC (C-C)
3	Eqsyn 3	CSVPWEYNFYSNWC (C-C)	22	GRSyn 3	CTLQAFNYEWYQLC (C-C)
4	Eqsyn 4	CRIPYDRGMIVNVC (C-C)	23	GRSyn 4	CKYETFEYGWYNIC (C-C)
5	Eqsyn 5	CKVPYDWDSVFNLC (C-C)	24	GRSyn 5	CHGDSFQYEWYNLC (C-C)
6	EqSyn 6	CQLPYDVHTYNDWC (C-C)	25	GRSyn 6	CSVHSFDWDWYNVC (C-C)
7	EqSyn 7	CLAPYDHNRYTQWC (C-C)	26	GRSyn 7	CSVHSFDYDYYNVC (C-C)
8	EqSyn 8	CSNPYDLEAYENWC (C-C)	27	GRSyn 8	CSVHSFDYDFYNVC (C-C)
9	EqSyn 9	CSVPYDYQGYRNIC (C-C)	28	GRSyn 9	CSVHSFDYDWFNVC (C-C)
10	EqSyn 10	CSVPYDYNVYLNKC (C-C)	29	GRSyn 10	CSVHSFDYDWWNVC (C-C)
11	EqSyn 11	CIQPYDKNYFQNFC (C-C)	30	GRSyn 11	CIFNPFDYDWYNVC (C-C)
12	EqSyn 12	CVVPYDINIKDNWC (C-C)	31	GRSyn 12	CQWHSFDYDWYNVC (C-C)
13	EqSyn 13	CSVPYDYNPYSNWC (C-C)	32	GRSyn 13	CDVHPFDYDWYNVC (C-C)
14	EqSyn 14	CSVPYDYNKLKNWC (C-C)	33	GRSyn-Neg	CSVHSGDYDGGNVC (C-C)
15	EqSyn 15	CSVPYDYNWRSSWC (C-C)	34	grZ14s-nvCyc	CSVHSFDYDWYNVC (C-C)
16	EqSyn 16	CSVPYDYNWWSAWC (C-C)			
17	EqSyn 17	CSVPYDYNWQSNWC (C-C)			
18	EqSyn-Neg	CSVGYDYNWYSNWC (C-C)			

No	ID de péptido	Secuencia	No	ID de péptido	Secuencia
19	Eqt2Z-cyc	CSVPYDYNWYSNWC (C-C)			

[0154] La capacidad de estos péptidos para (1) prevenir la adhesión microbiana a una superficie y para (2) desprender microbios ya adheridos a una superficie se midió contra las siguientes cepas microbianas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus*(ATCC25923), *Candida albicans* (ATCC14053) y / o *Escherichia coli.* El porcentaje resultante de prevención o desprendimiento, relativo a los pocillos de control en los que se permitió el cultivo de los microbios en ausencia de péptidos, se indica en las Figuras 13 a 16. Las figuras demuestran que estos péptidos son capaces de prevenir la adhesión microbiana a una superficie y desprender los microbios ya adheridos a una superficie.

Ejemplo 14: Previniendo la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* con péptidos modificados de Eat2Z-cyc

[0155] El péptido Eqt2Z-cyc se modificó insertando análogos de aminoácidos sintéticos en diferentes posiciones en la secuencia natural. La Tabla 3 representa las modificaciones realizadas en Eqt2Z-cyc. Los péptidos modificados fueron incubados con *Pseudomonas aeruginosa.* Se creó una biopelícula cultivando el microorganismo durante 24 horas en un pocillo a 37 ° C, posteriormente se añadió al pocillo el péptido Eqt2Z-cyc-mod modificado y se dejó incubar durante 24 horas. La Figura 17 representa los resultados de la incubación, en la que los péptidos impidieron la adhesión del microorganismo en comparación con la incubación del microorganismo sin ningún péptido.

Tabla 3. Modificaciones de Eqt2Z-cyc

Eqt2ZCyc-mod1	(D-form Cys) -SVPYDYNWYSNWC (C-C)
Eqt2ZCyc-mod2	CSVPYDYNWYSNW- (D-form Cys) (C-C)
Eqt2ZCyc-mod3	(D Form Cys) -SVPYDYNWYSNW- (D Form Cys) (C-C)
Eqt2ZCyc-mod4	homoCys-SVPYDYNWYSNWC (C-C)
Eqt2ZCyc-mod5	CSVPYDYNWYSNW-homoCys (C-C)
Eqt2ZCyc-mod7	CS- (D-form V) -PYDYNWYSNWC (C-C)
Eqt2ZCyc-mod8	CSV- (D-form P) -YDYNWYSNWC (C-C)

Ejemplo 15: los péptidos contribuyen al desprendimiento de microorganismos al afectar la producción de matriz de polisacárido

[0156] En una realización, los péptidos pueden hacer que los microorganismos se desprendan de una superficie al afectar la producción de la matriz de polisacáridos de los microorganismos. El efecto de Eqt2Z-Cyc y grZ14s-nvCYC en la producción de matriz de polisacárido de *Pseudomonas aureginosa*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* se evaluaron midiendo el Rojo Congo y / o el Azul Tripán después de incubar los péptidos con los microorganismos. Rojo Congo y Azul Tripán son tintes que se unen a la matriz de polisacáridos a través de fibrillas de exopolisacáridos. Una reducción en la absorbancia de estos colorantes corresponde con una reducción en la producción de matriz de polisacárido.

[0157] Específicamente, los ensayos de unión de Rojo Congo y Azul Tripán se realizaron cultivando *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en medios de crecimiento específicos (LB, TSB + 0.25% de glucosa, RPMI 1640, respectivamente) simultáneamente con los péptidos hasta que alcanzaron una densidad de OD_{600nm} = 0.25. Las células se sedimentaron, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en tampón TMP (contiene Tris / HCl 10,0 mM (pH 8,0), 1 mMKH).$_2$correos$_4$ y 8.0 MM $MgSO_4$) a una densidad de OD_{600nm} = 0.25. Se mezclaron partes alícuotas de las suspensiones celulares con soluciones madre de Rojo Congo (150µg ml^{-1}

) y Azul Tripán (100 µg m^{-1}). Se añadió tampón TPM a las mezclas de células / colorantes para dar concentraciones finales de $2.5x10^8$ células ml^{-1} y cualquiera de los 15 µg de Congo Red ml^{-1} o 10 µg de Azul Tripán ml^{-1}. Muestras sin células que contienen tampón TPM y 15 µg ml Rojo $Congo^{-1}$ o 10 µg de Azul Tripán ml^{-1} se utilizaron como controles. Todas las muestras se agitaron brevemente y se incubaron en un cuarto oscuro a 25 ° C durante 30 min. Después de la incubación, las células se sedimentaron y los sobrenadantes se transfirieron a cubetas. La absorbancia de cada muestra de sobrenadante se midió a 490 nm para detectar Congo Red o a 585 nm para detectar Azul Tripán, y estos valores se compararon con la absorbancia de la muestra de control apropiada. Cada muestra de prueba y muestra de control se analizó tres veces.

[0158] Los resultados se muestran en las Figuras 18-23. Como demuestran las figuras, ambos péptidos contribuyeron a una producción reducida de matriz de polisacáridos en cada uno de los microorganismos, evidente por la reducida absorbancia del Rojo Congo y Azul Tripán proveniente de las células incubadas con los péptidos en comparación con las células que no fueron incubadas con los péptidos.

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares, que comprende poner en contacto dicho organismo con una composición que comprende un péptido, en donde dicho péptido es un péptido cíclico, en donde el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV; y

en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

2. Un péptido cíclico, en el que el péptido es NVHSFDYDWYNV; RVESFDFDWYNI; RINSFDYDWYNV; TVNSFDYDWYNV; KVNSFDYDWYNV; TVHSFDYDWYNV; SVHSWDYDWYNV; SVHSYDFDWYNV; SVHSFDWDWYNV; SVHSFDYDYYNV; SVHSFDYDFYNV; SVHSFDYDWFNV; SVHSFDYDWWNV; IFNPFDYDWYNV; QWHSFDYDWYNV o DVHPFDYDWYNV, y

en donde cada péptido se modifica con una cisteína en el C terminal y una cisteína en el N terminal, en donde los C y N terminales tienen puentes S-S.

3. Una composición que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha composición es capaz de desprender un organismo unicelular de una superficie o de otros organismos unicelulares.

4. El método de la reivindicación 1, o el péptido de la reivindicación 2, o la composición de la reivindicación 3, en el que dicho péptido está unido a un linker, en el que dicho linker es preferiblemente polietilenglicol o ácido palmítico.

5. El método de la reivindicación 1 o 4, o el péptido de la reivindicación 2 o 4, o la composición de la reivindicación 3 o 4, en donde el péptido es sintético.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 5, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicho organismo está en una biopelícula.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 6, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho organismo es un organismo unicelular eucariótico o un organismo unicelular procariótico.

8. El método de la reivindicación 7, o la composición de la reivindicación 7, en el que dicho organismo unicelular eucariótico es un hongo.

9. El método de la reivindicación 8, o la composición de la reivindicación 8, en donde dicho hongo es Candida albicans.

10. El método de la reivindicación 7, o la composición de la reivindicación 7, en el que dicho organismo unicelular procariota es una bacteria gram positiva o una bacteria gram negativa.

11. El método de la reivindicación 10, o la composición de la reivindicación 10, en el que dicha bacteria gram positiva es Staphylococcus aureus.

12. El método de la reivindicación 10, o la composición de la reivindicación 10, en donde dicha bacteria gram negativa es Escherichia coli o Pseudomonas aeruginosa.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4 a 6, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicho organismo es un organismo acuático.

14. El método de una de las reivindicaciones 1 y 4 a 13, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, en el que dichos organismos están unidos en un grupo o agregado.

15. La composición de la reivindicación 14, en la que dicha composición es capaz de romper o dispersar dicho grupo o agregado.

16. El método de la reivindicación 14, en el que dicha composición rompe o dispersa dicho grupo o agregado.

17. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, en la que dicho desprendimiento afecta a la capacidad de dicho organismo para producir matriz de polisacárido.

18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14 y 16, en el que dicha composición evita que dicho organismo produzca matriz de polisacárido.

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 a 14, 16 y 18, o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15 y 17, en el que dicha superficie se selecciona del grupo que comprende un tejido, una fibra,

una espuma, una película, hormigón, mampostería, vidrio, metal y plástico.

20. Una composición farmacéutica que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 15, 17 y 19 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

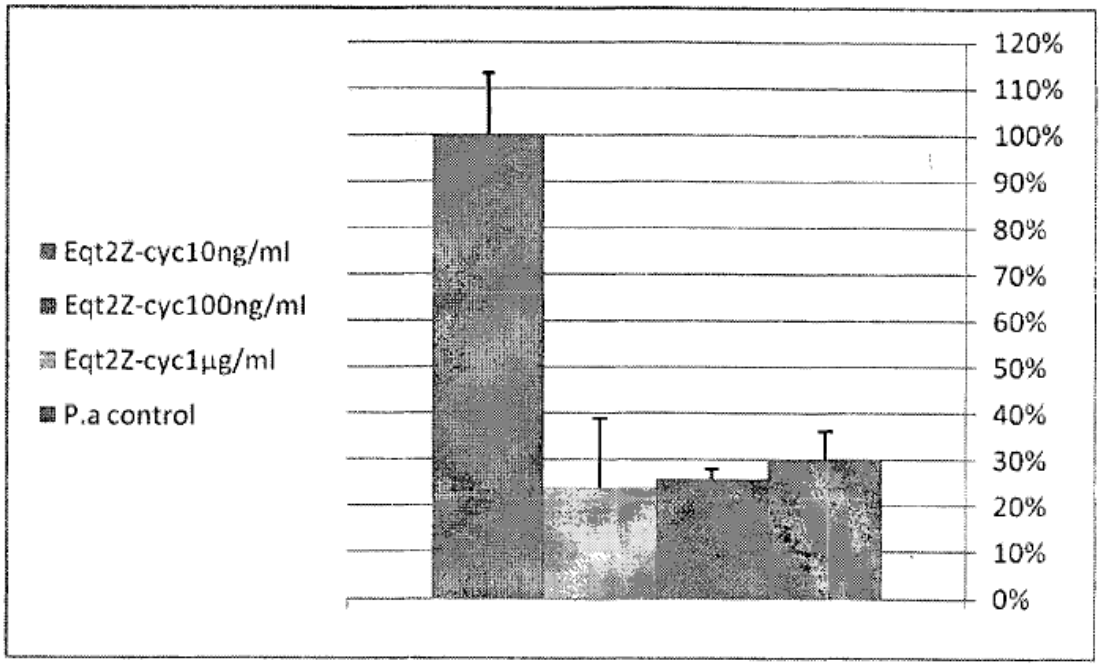

Eqt2Z-cyc10ng/ml
Eqt2Z-cyc100ng/ml
Eqt2Z-cyc1µg/ml
P.a control
120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIGURA 2A

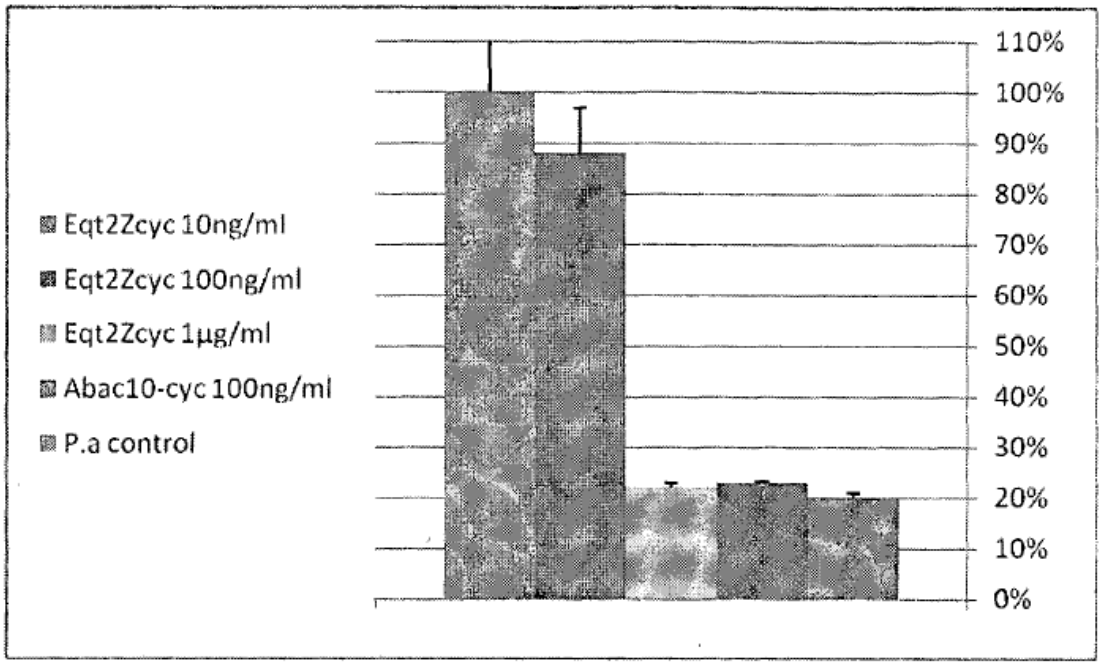

Eqt2Zcyc 10ng/ml
Eqt2Zcyc 100ng/ml
Eqt2Zcyc 1µg/ml
Abac10-cyc 100ng/ml
P.a control
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIGURA 2B

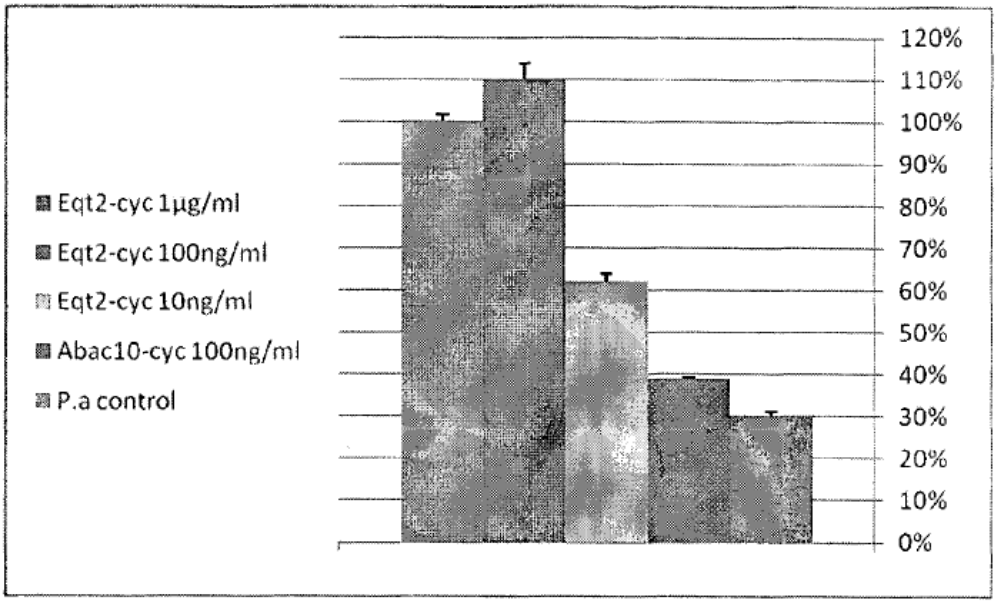

Eqt2-cyc 1µg/ml
Eqt2-cyc 100ng/ml
Eqt2-cyc 10ng/ml
Abac10-cyc 100ng/ml
P.a control
120%
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIGURA 3

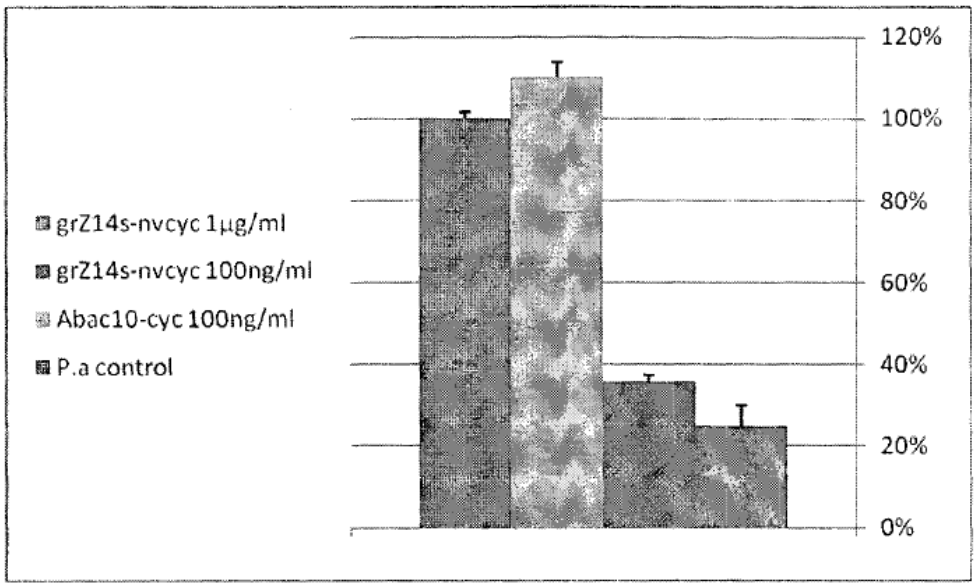

grZ14s-nvcyc 1µg/ml
grZ14s-nvcyc 100ng/ml
Abac10-cyc 100ng/ml
P.a control
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%

FIGURA 4

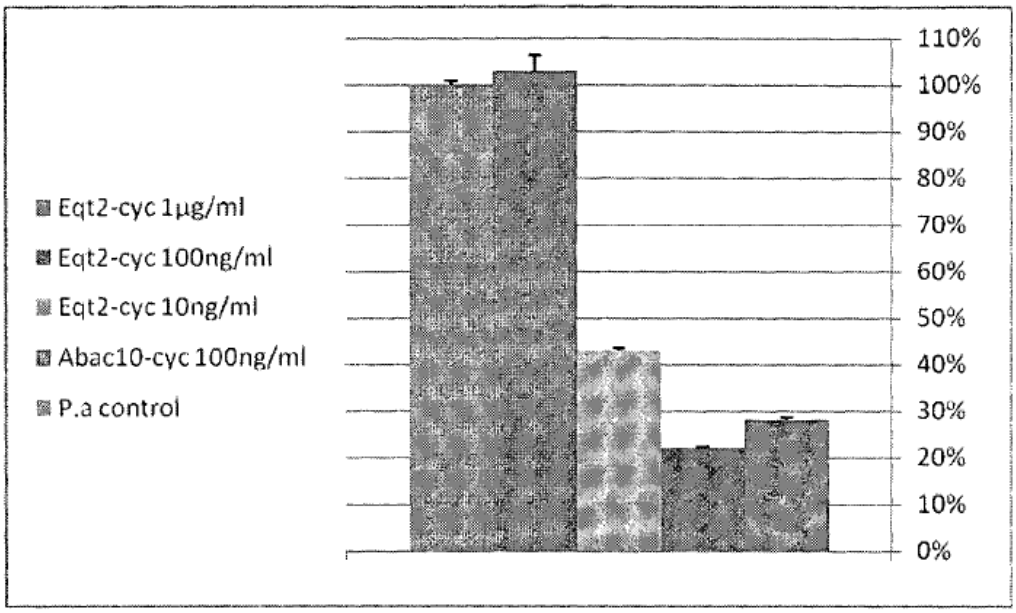

Eqt2-cyc 1µg/ml
Eqt2-cyc 100ng/ml
Eqt2-cyc 10ng/ml
Abac10-cyc 100ng/ml
P.a control
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIGURA 5

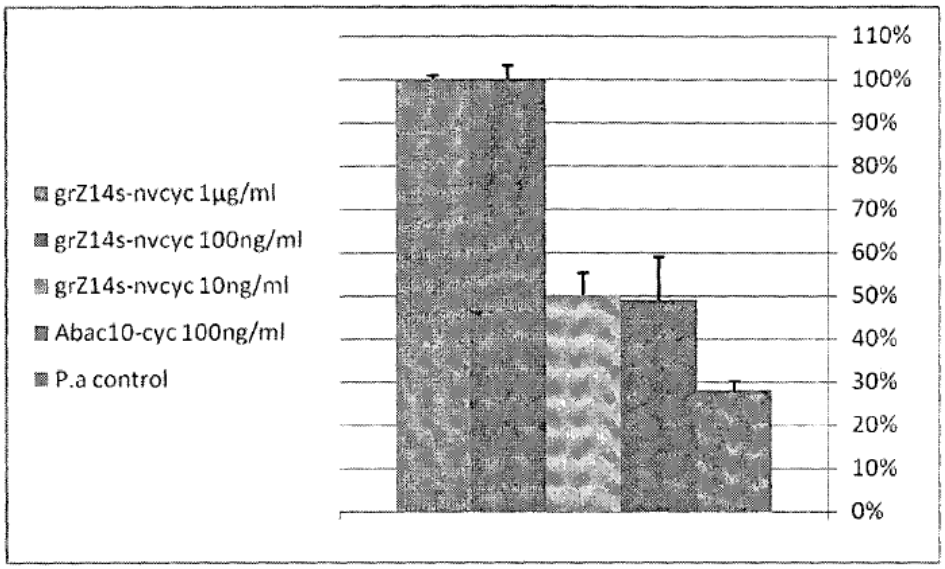

grZ14s-nvcyc 1µg/ml
grZ14s-nvcyc 100ng/ml
grZ14s-nvcyc 10ng/ml
Abac10-cyc 100ng/ml
P.a control
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%

FIGURA 6

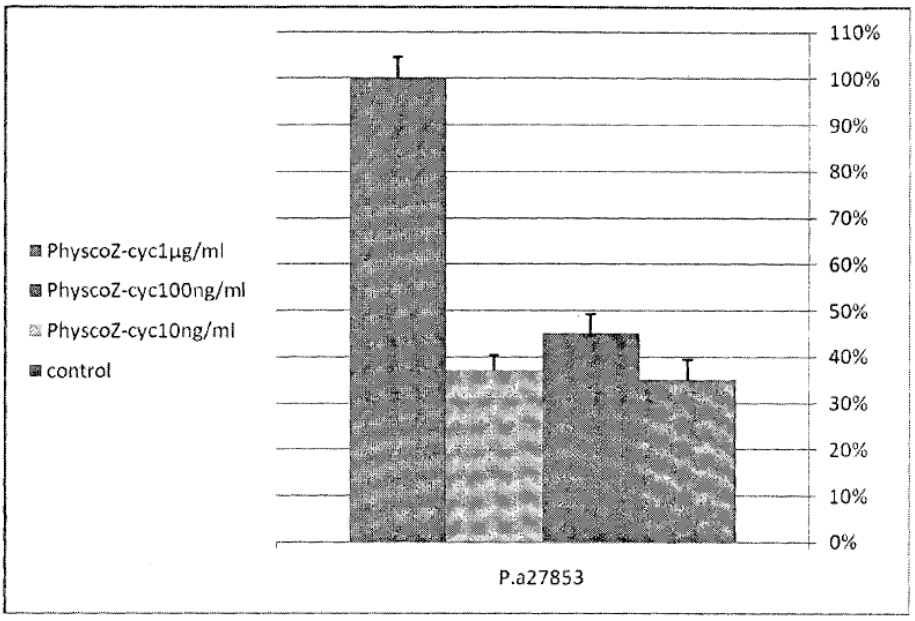

PhyscoZ-cyc1µg/ml
PhyscoZ-cyc100ng/ml
PhyscoZ-cyc10ng/ml
control
110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
P.a27853

FIGURA 7

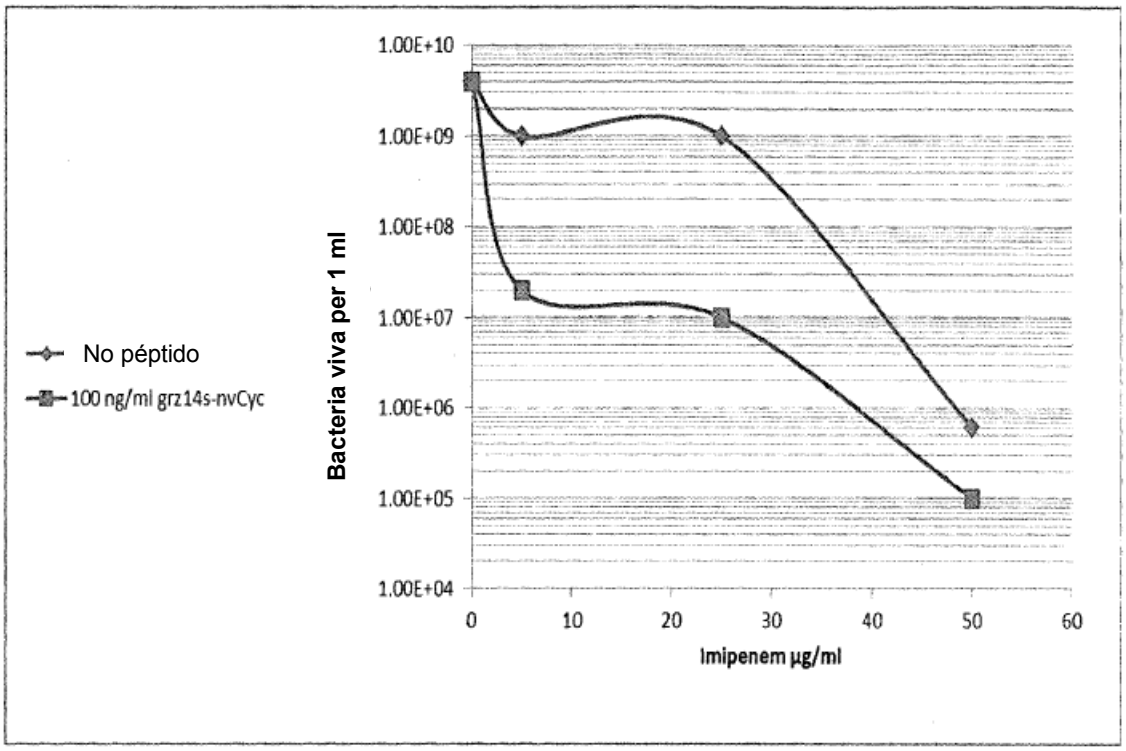

No péptido
100 ng/ml grz14s-nvCyc
Bacteria viva per 1 ml
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
0
10
20
30
40
50
60
Imipenem µg/ml

FIGURA 8

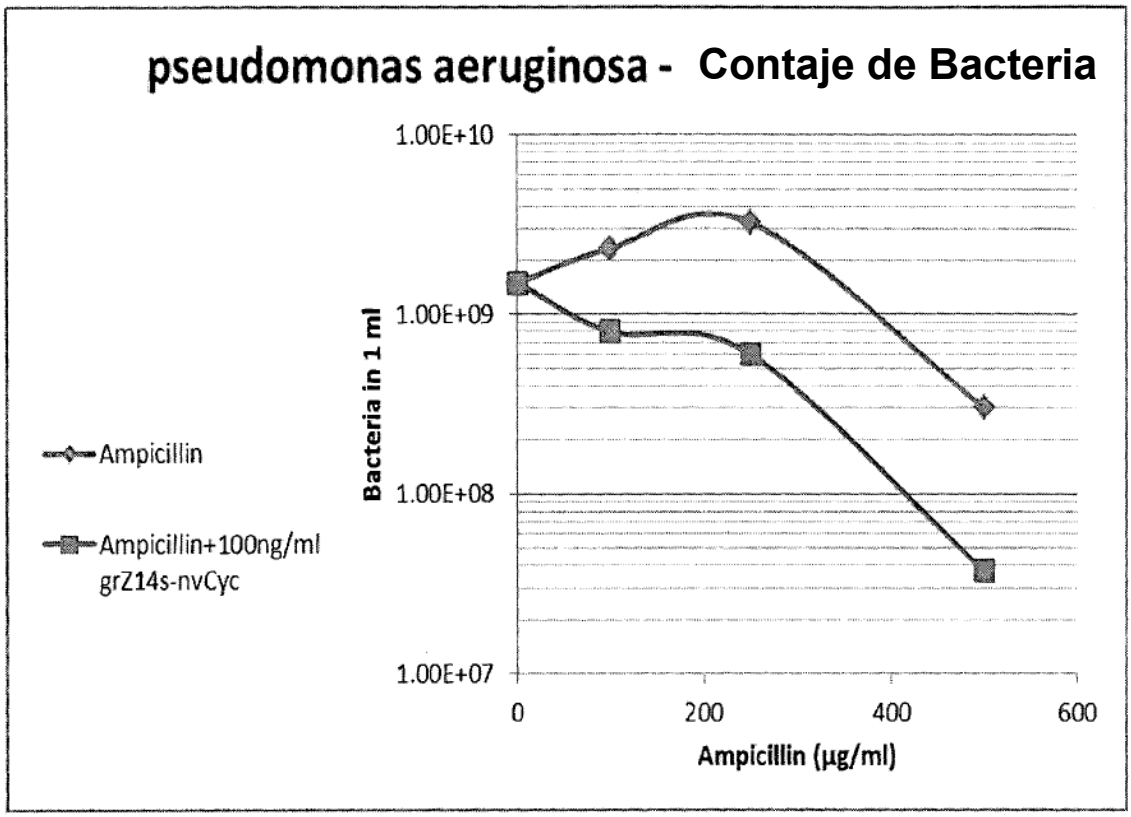

pseudomonas aeruginosa - Contaje de Bacteria
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
Bacteria in 1 ml
0
200
400
600
Ampicillin (µg/ml)
Ampicillin
Ampicillin+100ng/ml grZ14s-nvCyc

FIGURA 9

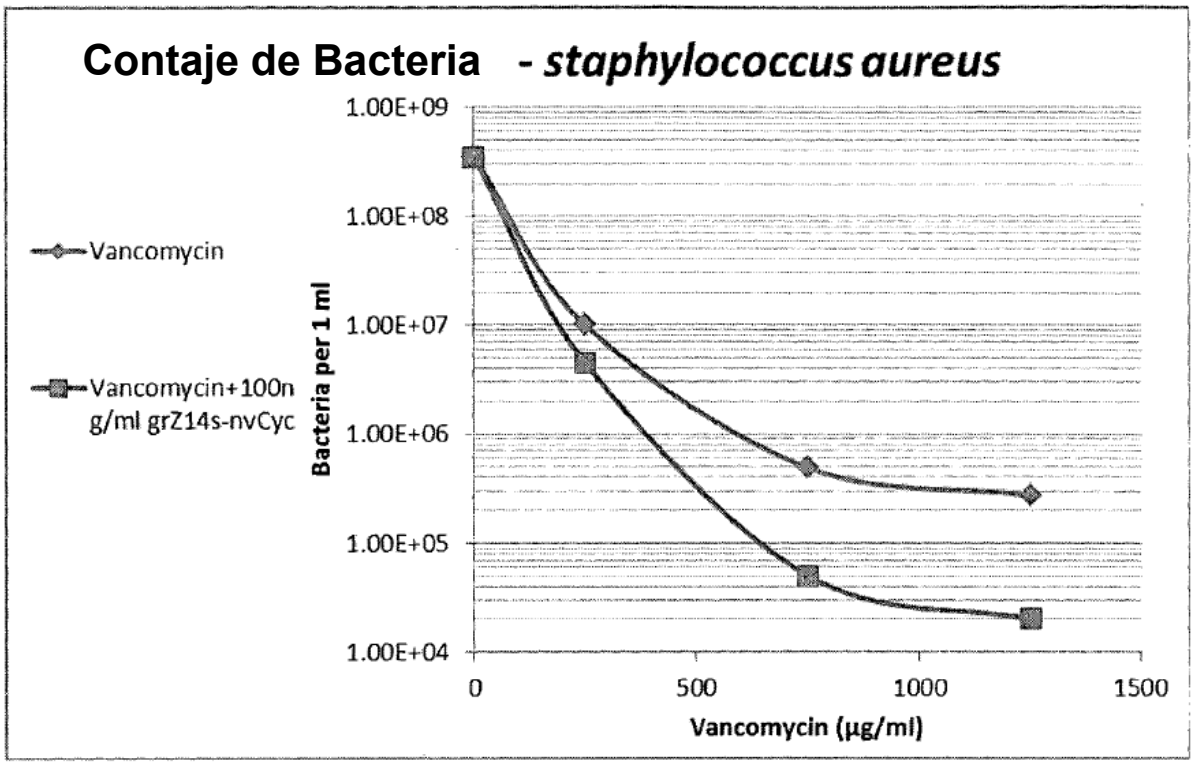

Contaje de Bacteria - staphylococcus aureus
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
Bacteria per 1 ml
Vancomycin
Vancomycin+100ng/ml grZ14s-nvCyc
0
500
1000
1500
Vancomycin (µg/ml)

FIGURA 10

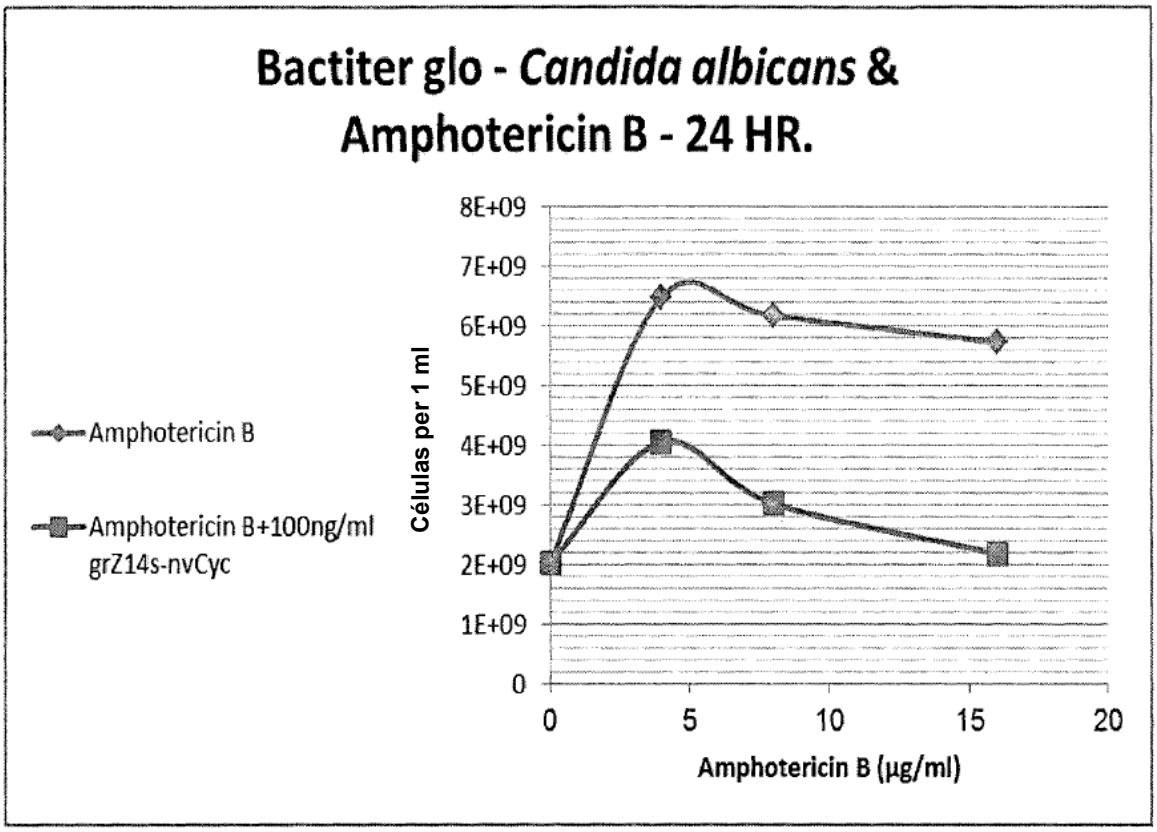

Bactiter glo - Candida albicans & Amphotericin B - 24 HR.
Amphotericin B
Amphotericin B+100ng/ml grZ14s-nvCyc
Células per 1 ml
8E+09
7E+09
6E+09
5E+09
4E+09
3E+09
2E+09
1E+09
0
0
5
10
15
20
Amphotericin B (µg/ml)

FIGURA 11

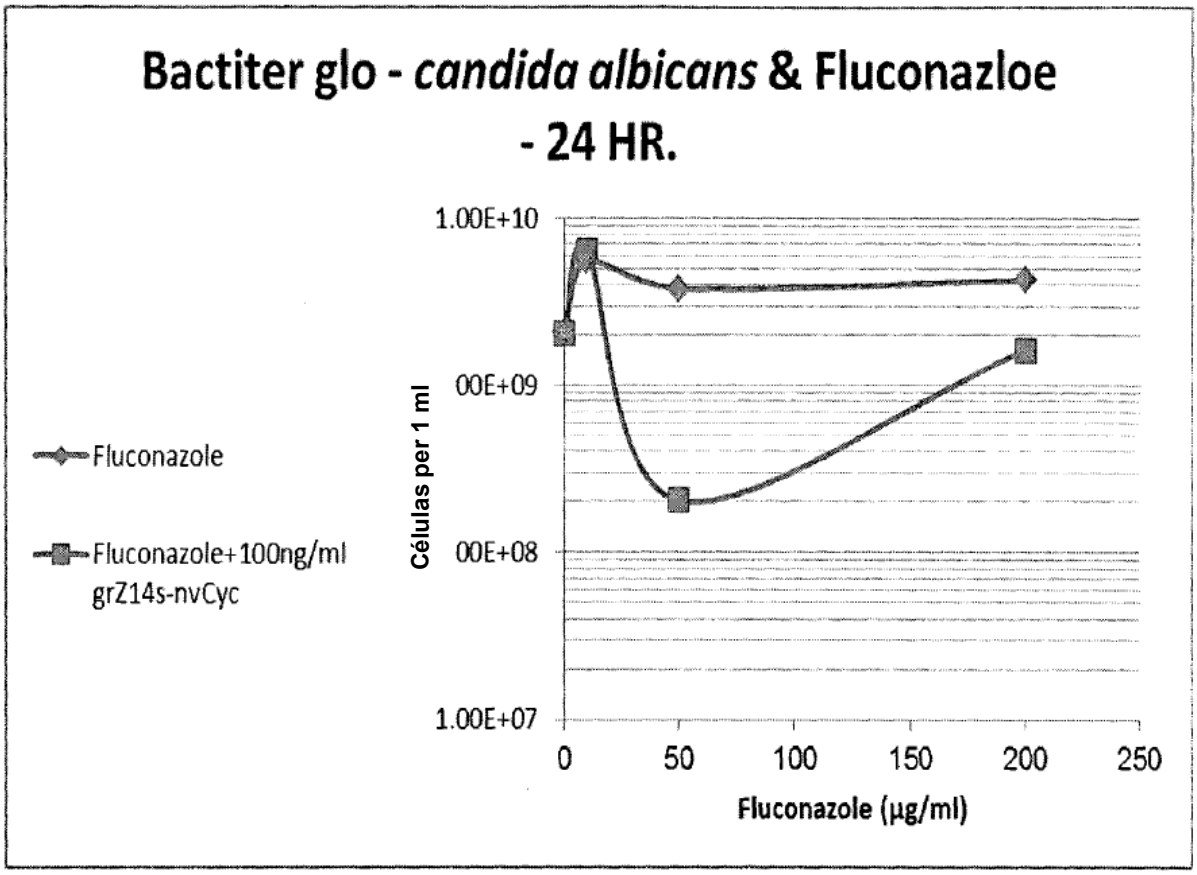

Bactiter glo - candida albicans & Fluconazloe - 24 HR.
1.00E+10
00E+09
00E+08
1.00E+07
Células per 1 ml
Fluconazole
Fluconazole+100ng/ml grZ14s-nvCyc
0
50
100
150
200
250
Fluconazole (µg/ml)

FIGURA 12

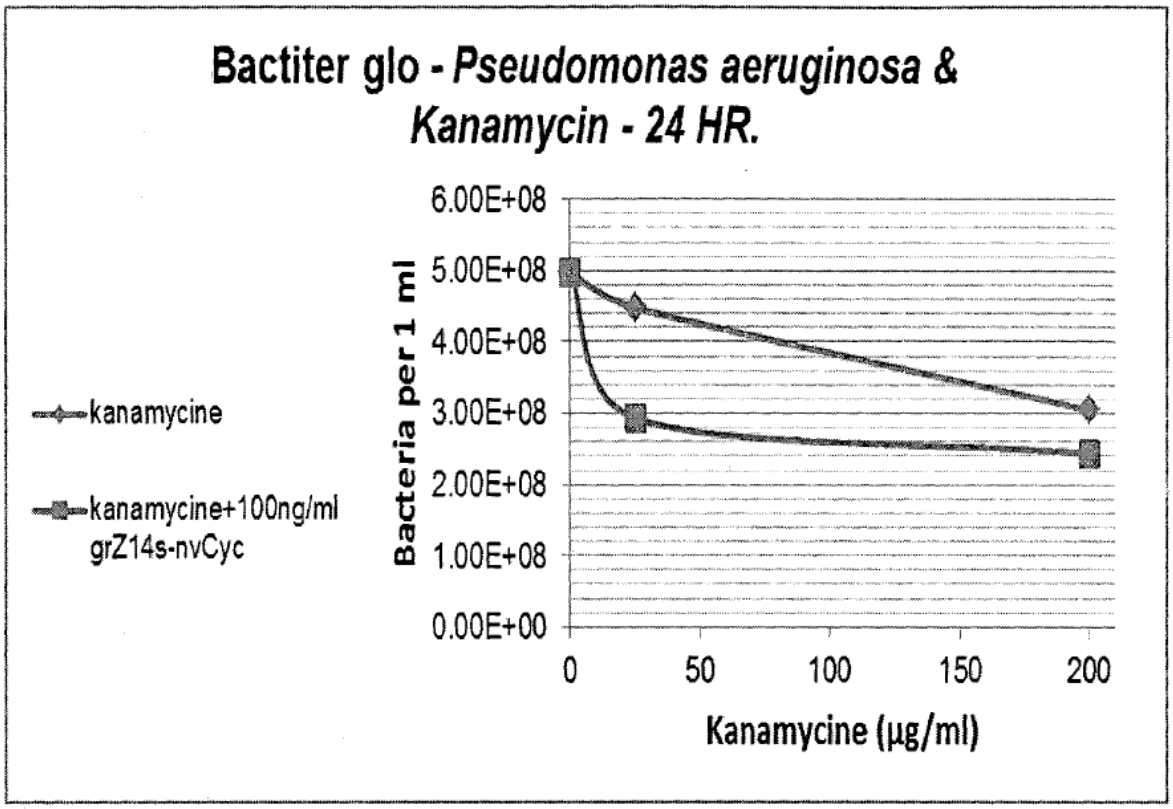
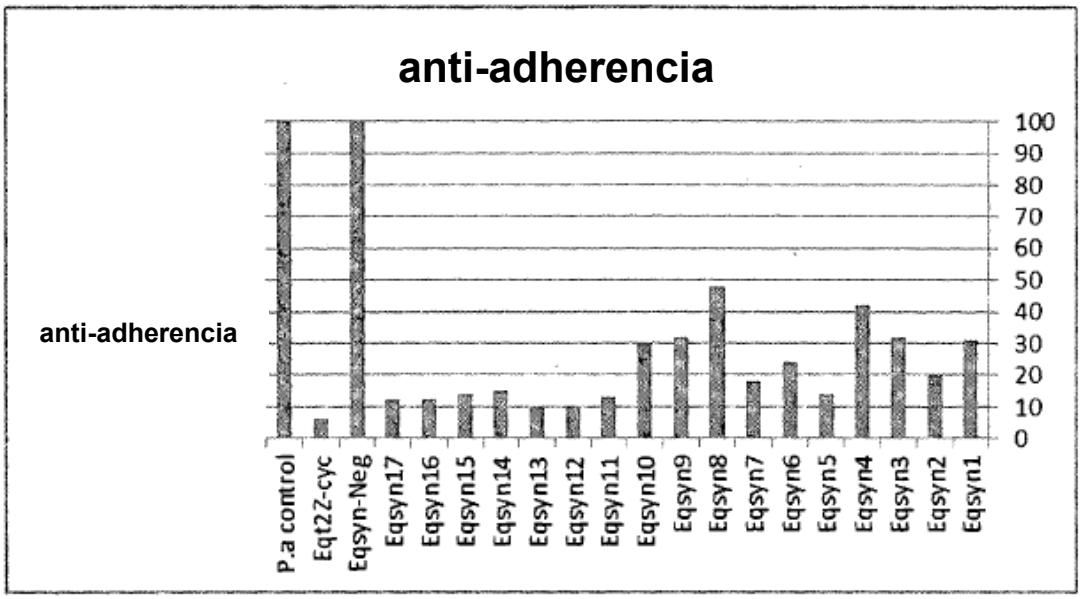

Bactiter glo - Pseudomonas aeruginosa & Kanamycin - 24 HR.
Bacteria per 1 ml
6.00E+08
5.00E+08
4.00E+08
3.00E+08
2.00E+08
1.00E+08
0.00E+00
0
50
100
150
200
Kanamycine (µg/ml)
kanamycine
kanamycine+100ng/ml grZ14s-nvCyc

FIGURA 13A

Prevención de adherencia de Pseudomonas aeruginosa por varios péptidos



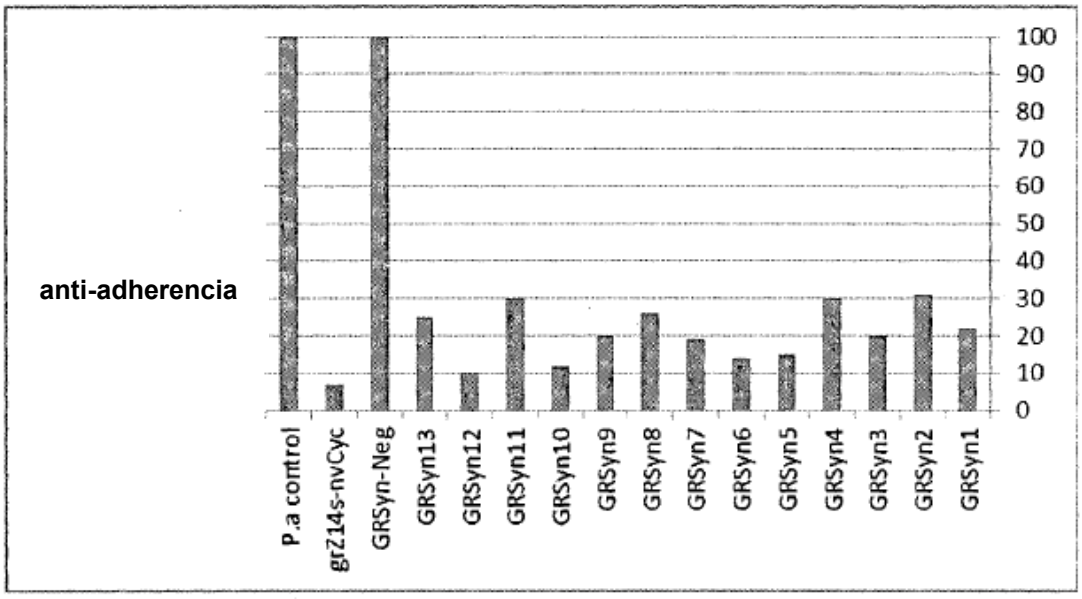
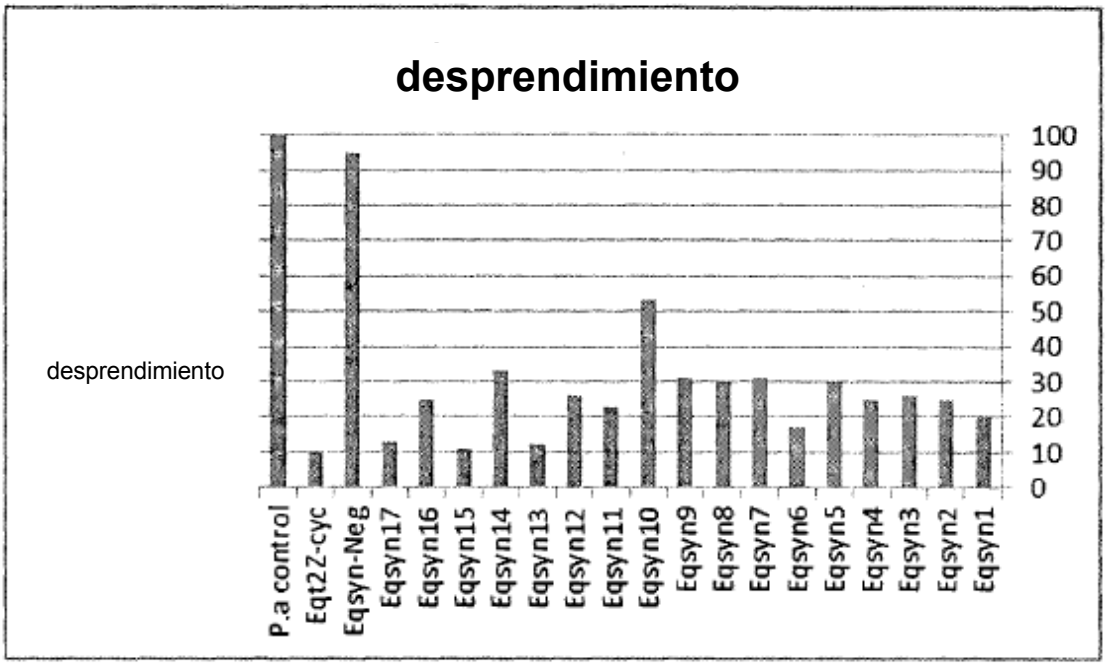


FIGURA 13B

Desprendimiento de Pseudomonas aeruginosa por varios péptidos



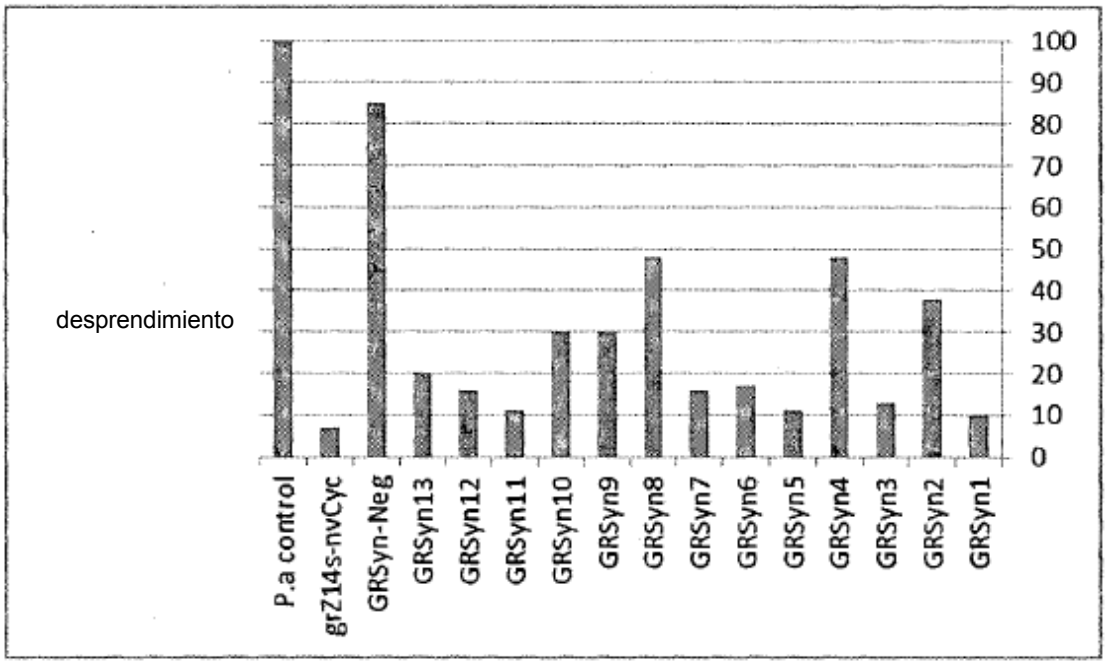
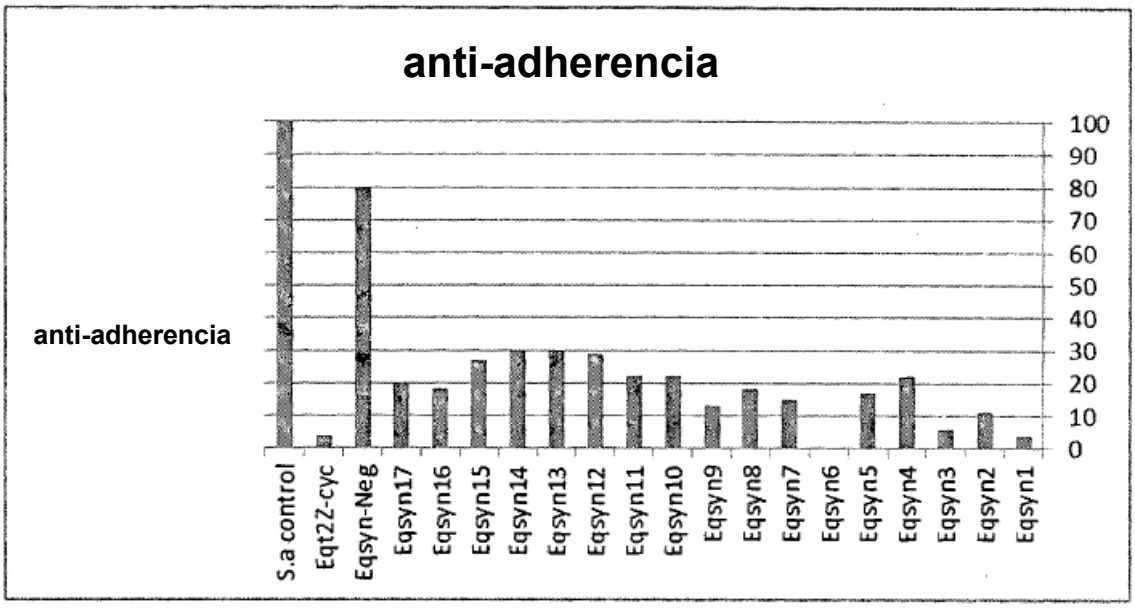


FIGURA 14 A

Prevención de adherencia de Staphylococcus aureus por varios péptidos



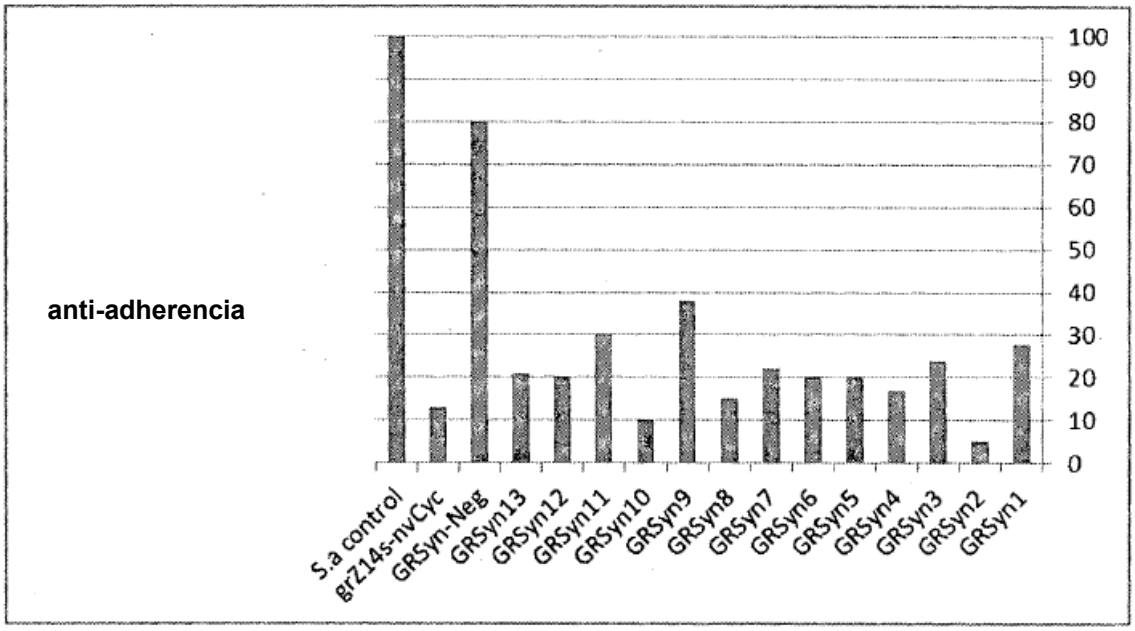
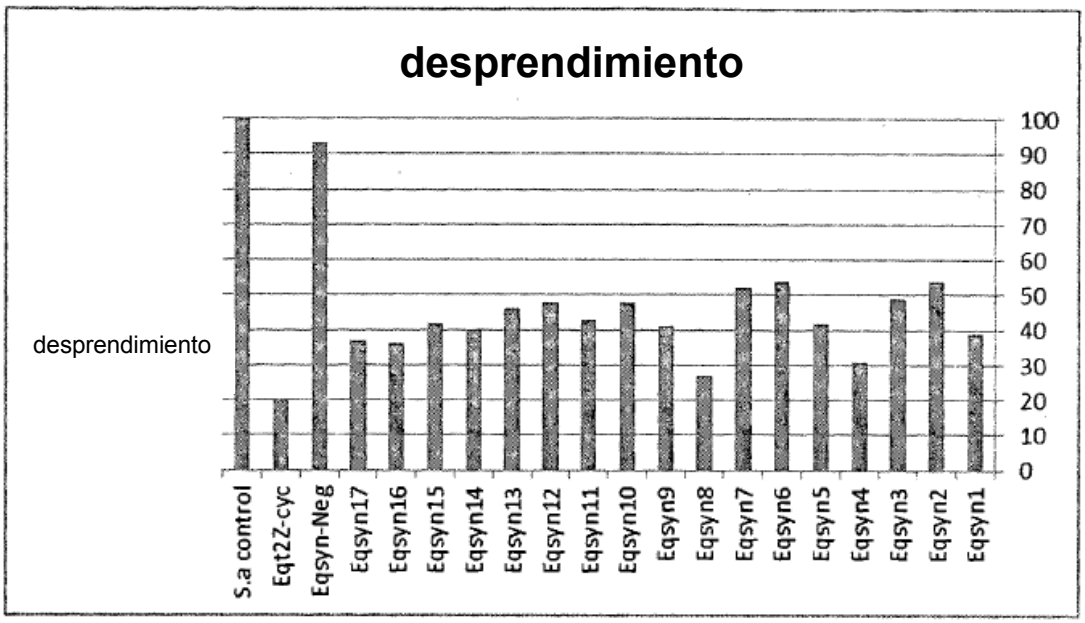


FIGURA 14B

Desprendimiento de Staphylococcus aureus por varios péptidos



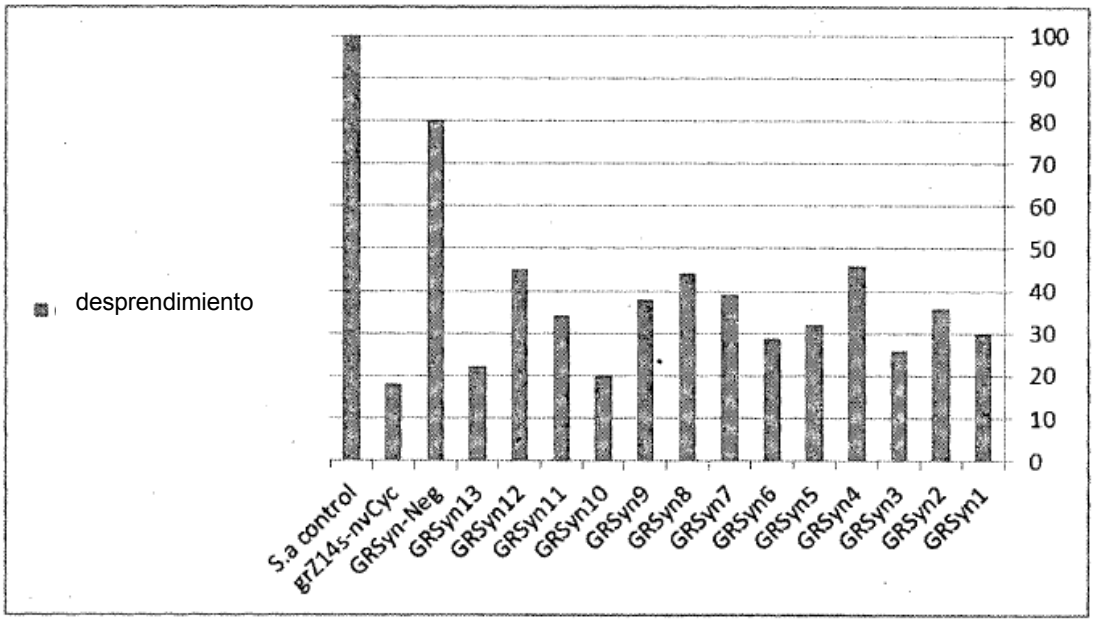


FIGURA 15A

Prevención de adherencia de Candida albicans por varios péptidos

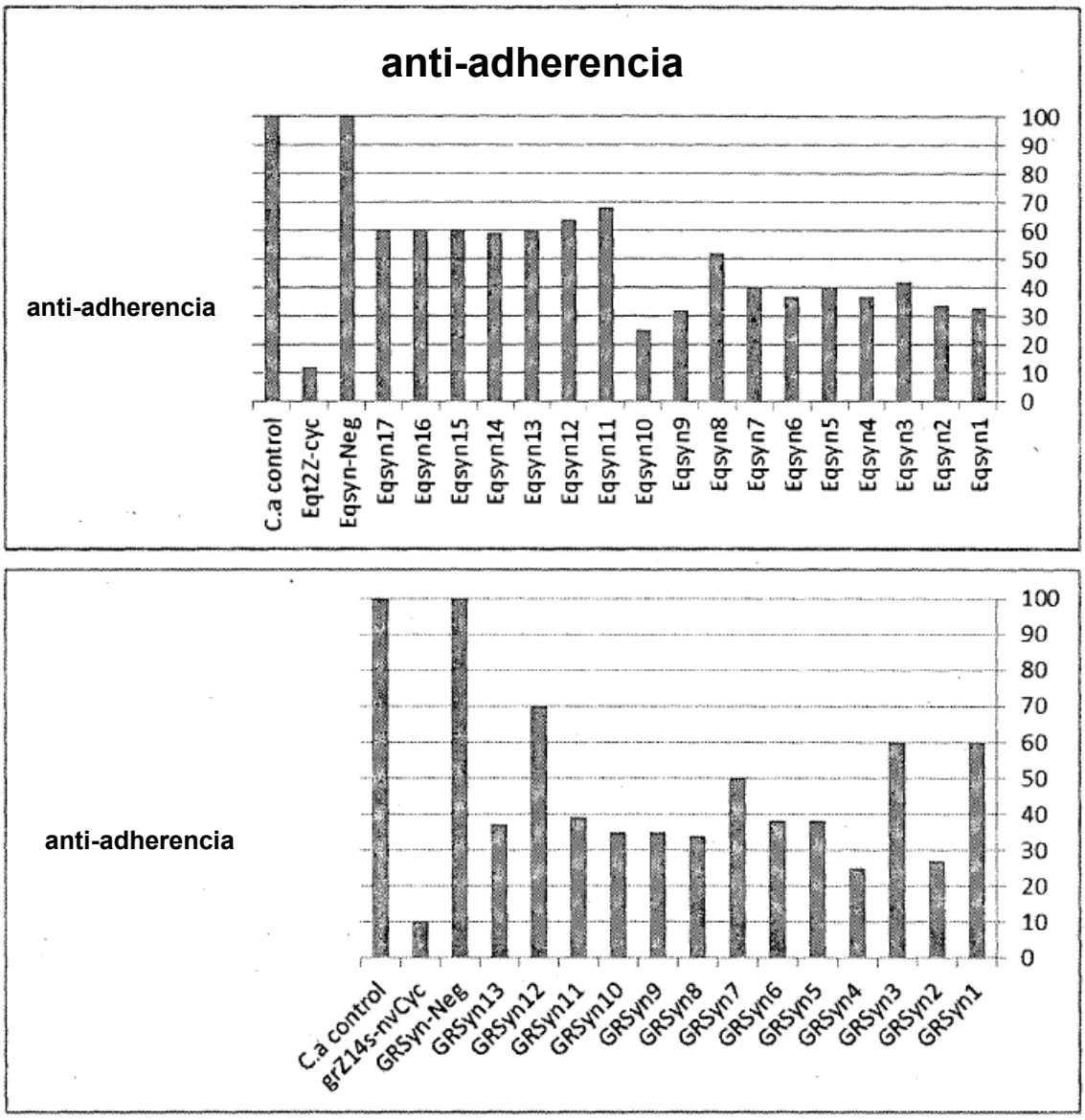
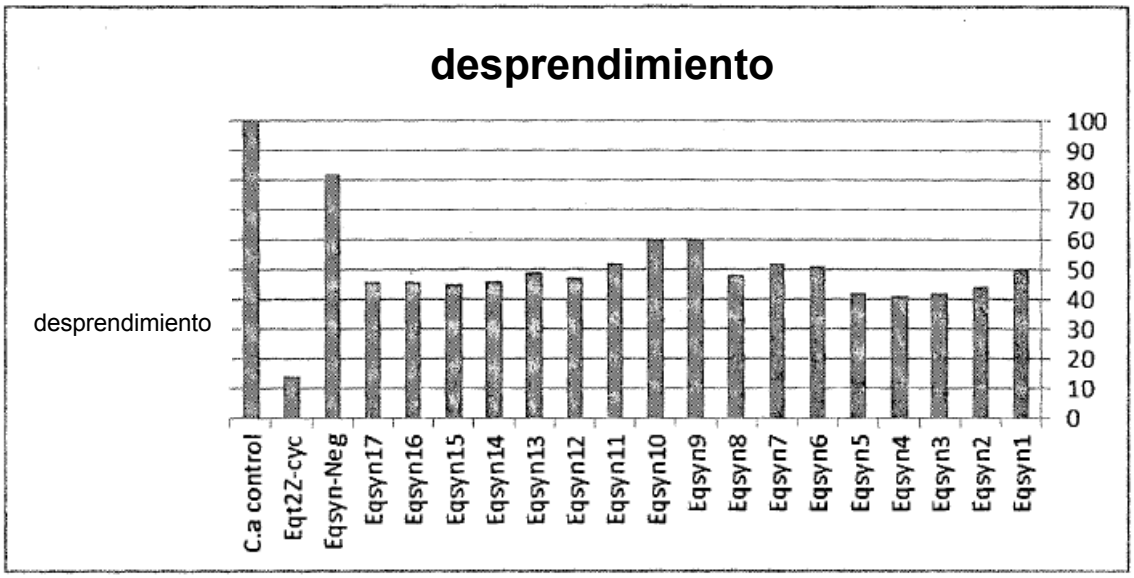


FIGURA 15B

Desprendimiento de Candida albicans por varios péptidos



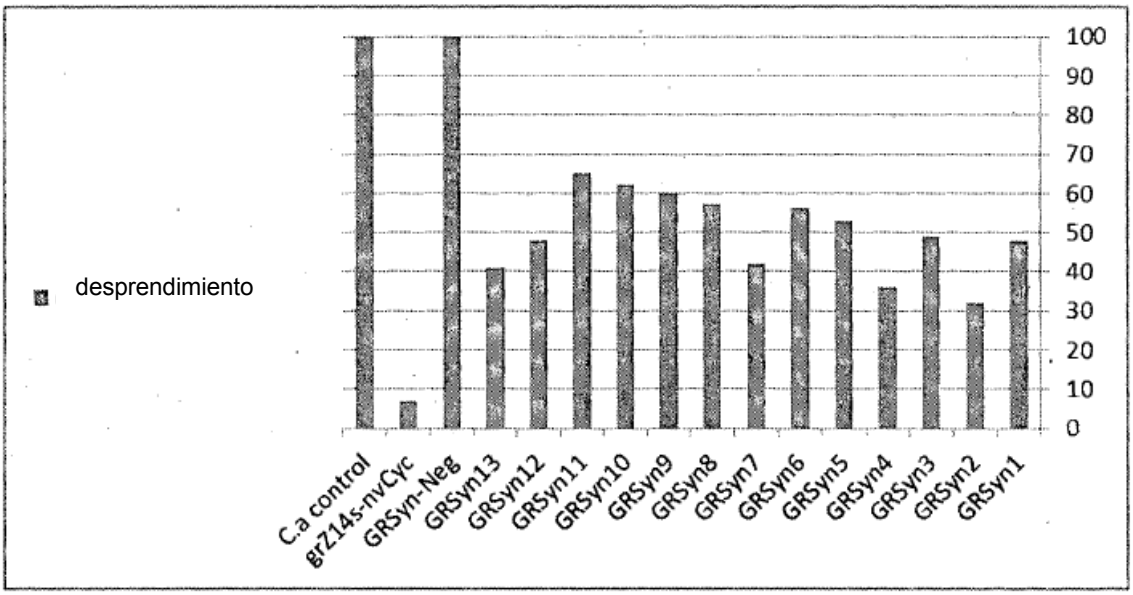
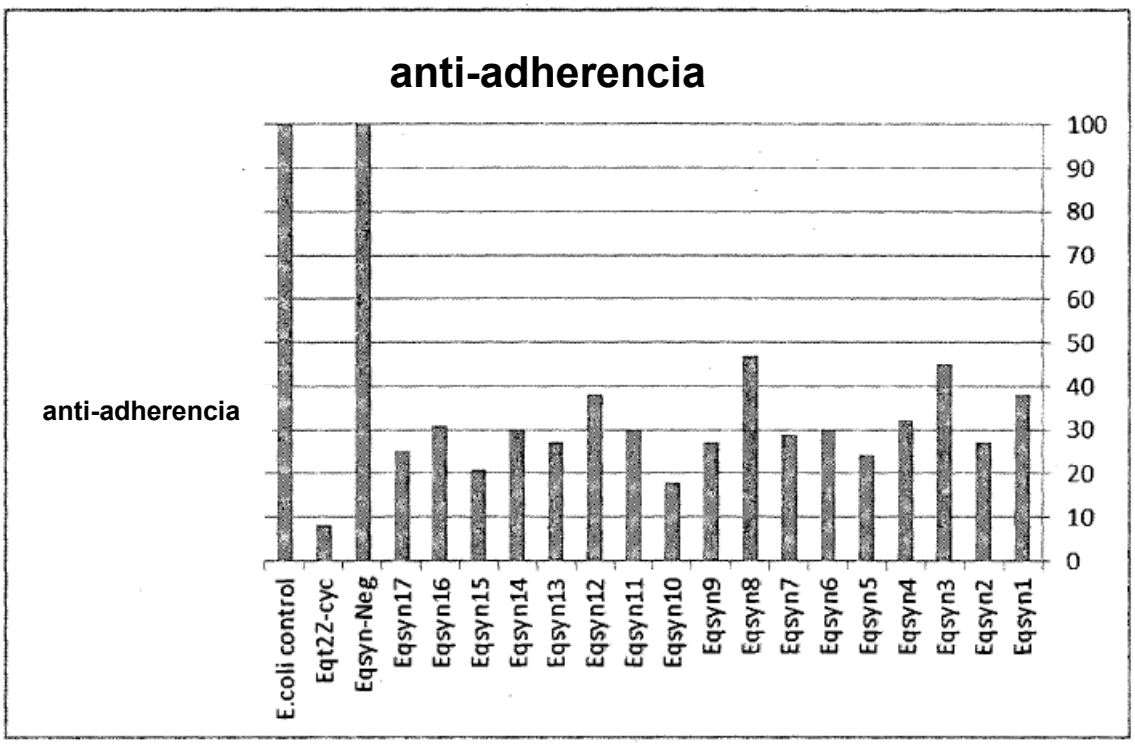


FIGURA 16A

Prevención de adherencia de Escherichia coli por varios péptidos



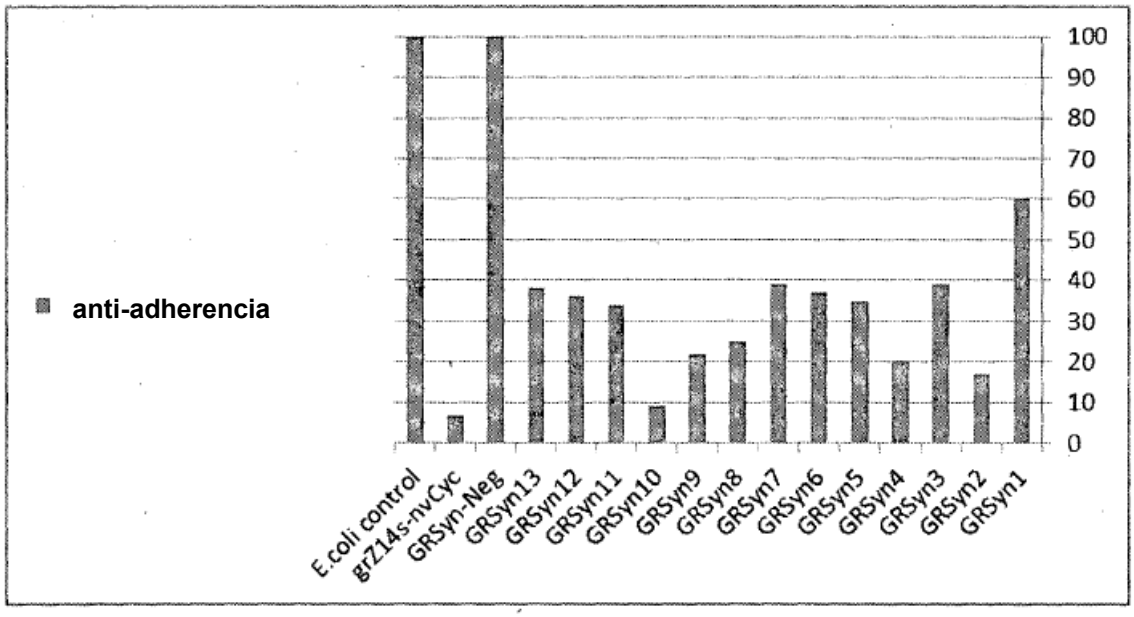


FIGURA 16B

Desprendimiento de Escherichia coli por varios péptidos

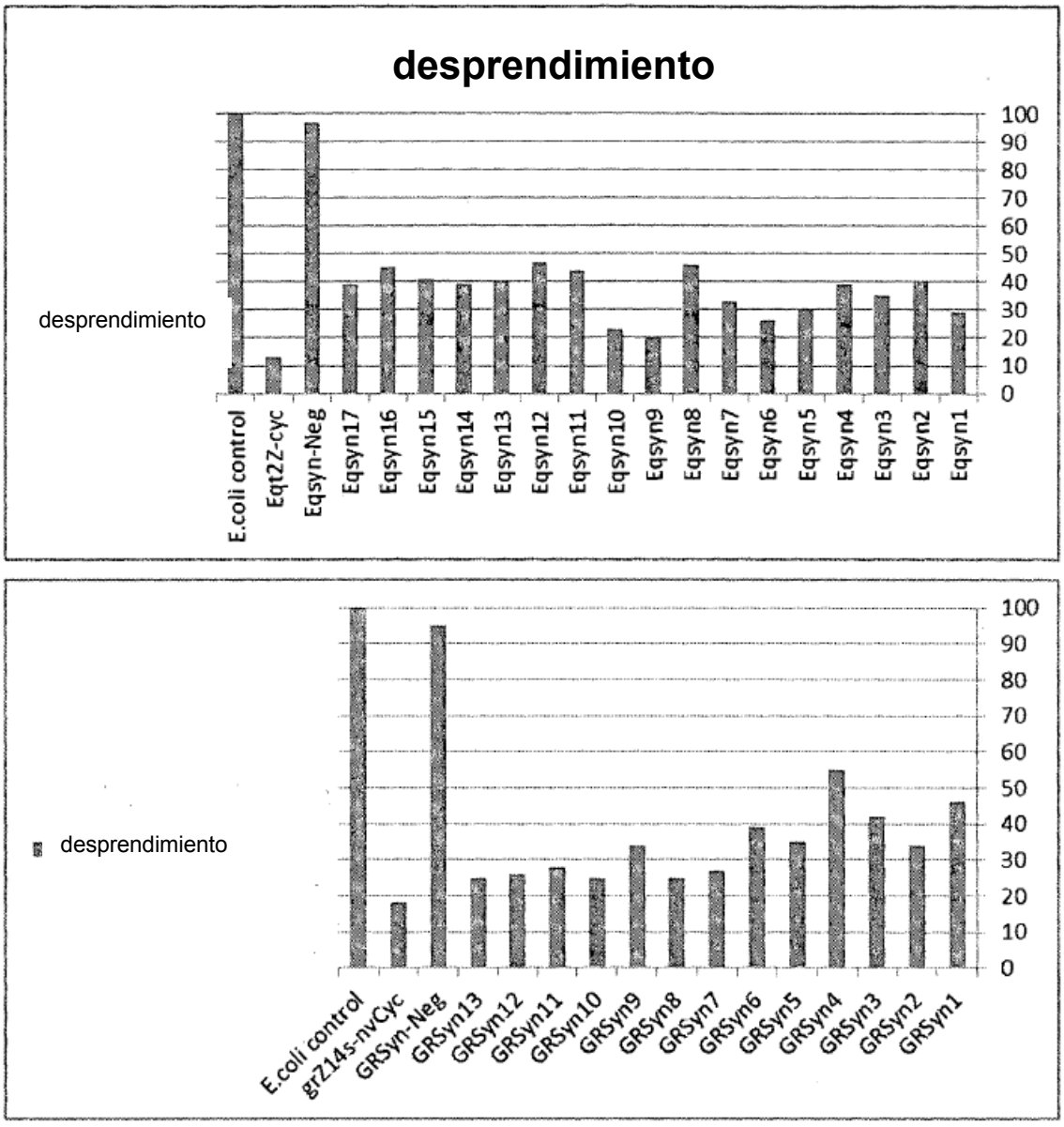
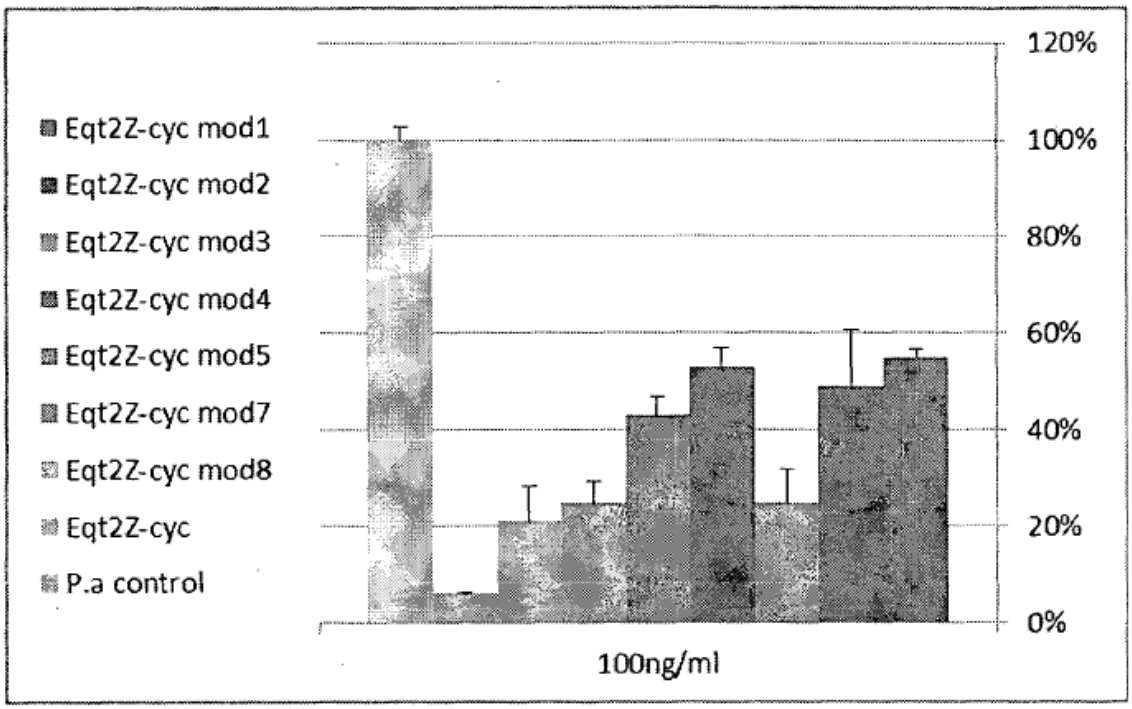


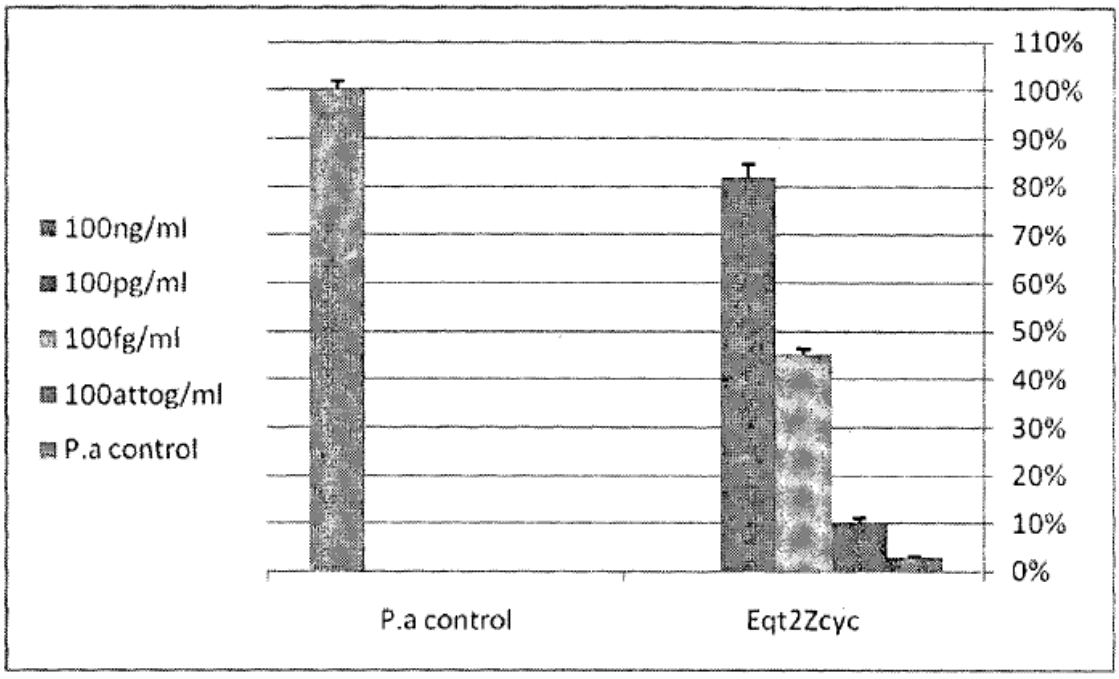
FIGURA 17



2h inicio OD_{600}=0,16, 2.5h biopelícula con el péptido a 370^{C}

FIGURA 18

Tinción con rojo Congo de Eqt2Z-Cyc incubado con Pseudomonas aeruginosa



Bacteria + péptido incubación: 24h a 37ºC

Tampón: TPM

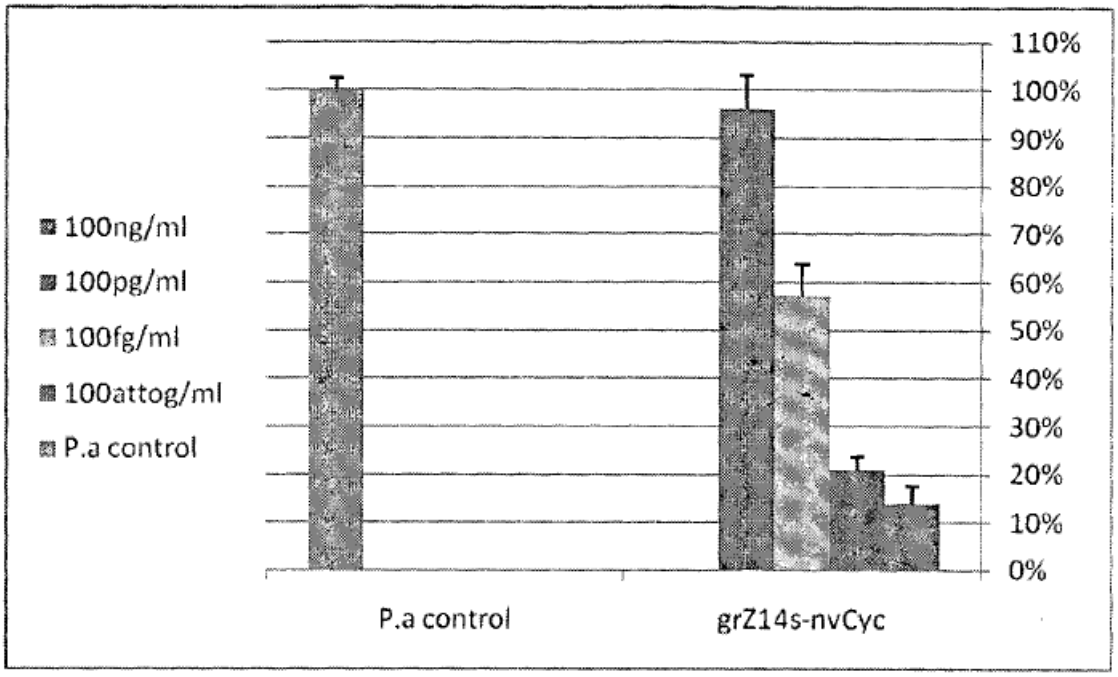
OD_{600} bacteriano a T_0: 0,27

Colorante: rojo Congo

Incubación con el colorante: 30 min a 25ºC

FIGURA 19

Tinción con rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubado con Pseudomonas aeruginosa



Bacteria + péptido incubación: 24h a 37ºC

Tampón: TPM

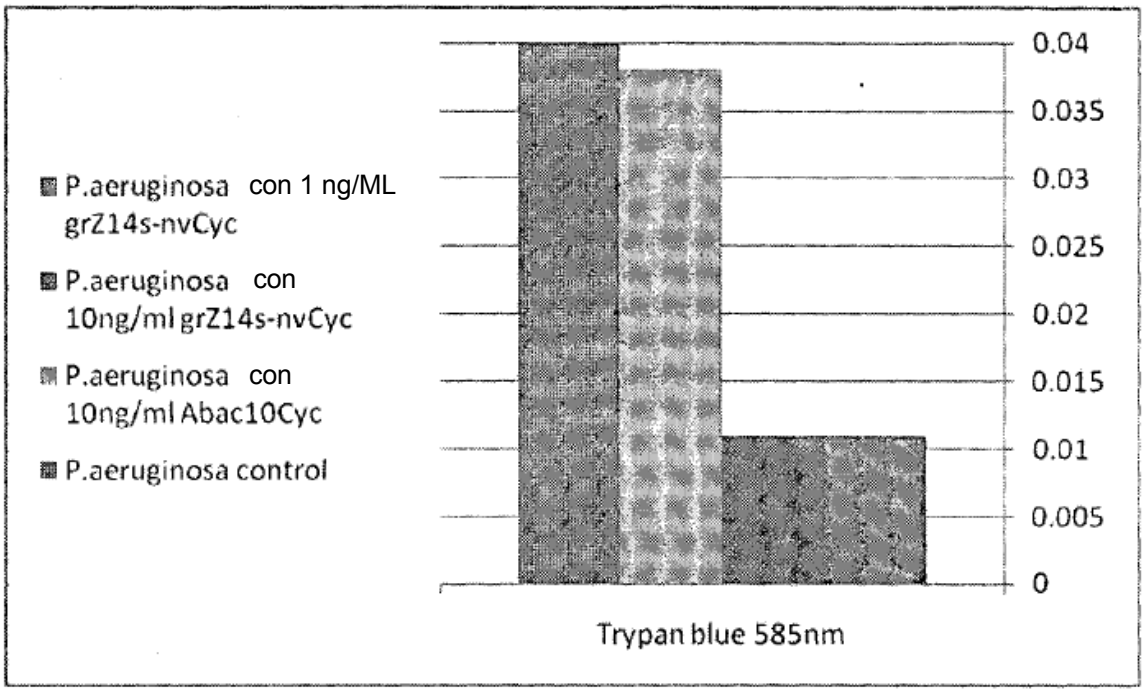
OD_{600} bacteriano a T_0: 0,27

Colorante: rojo Congo

Incubación con el colorante: 30 min a 25ºC

FIGURA 20

Tinción con azul Tripan de grZ14s-nvCyc incubado con Pseudomonas aeruginosa



Bacteria + péptido incubación: 24h a 37ºC

Tampón: TPM

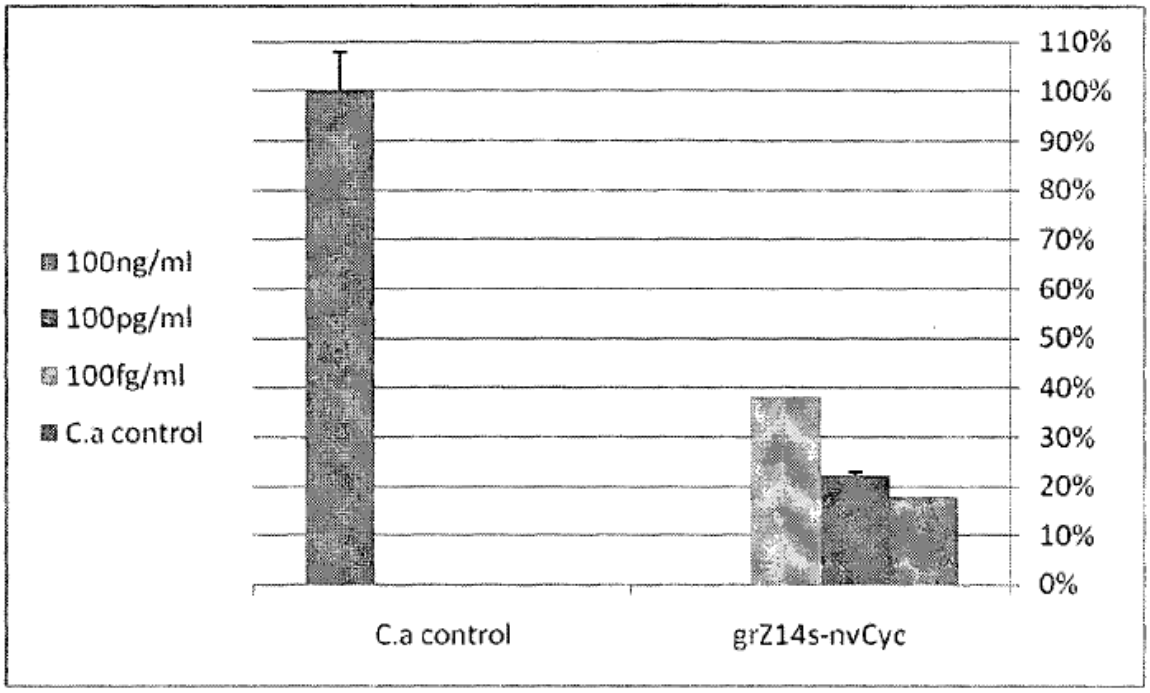
OD_{600} bacteriano a T_0: 0,27

Colorante: azul Tripan

Incubación con el colorante: 30 min a 25ºC

FIGURA 21

Tinción con rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubado con Candida albicans



Bacteria: *C. albicans* ATCC14053

Páptido: grZ14s-nvCyc

Incubación *C.a.* 4h a 37ºC

Tinción con rojo Congo

FIGURA 22

Tinción con rojo Congo de Eqt2Z-Cyc incubado con Candida albicans

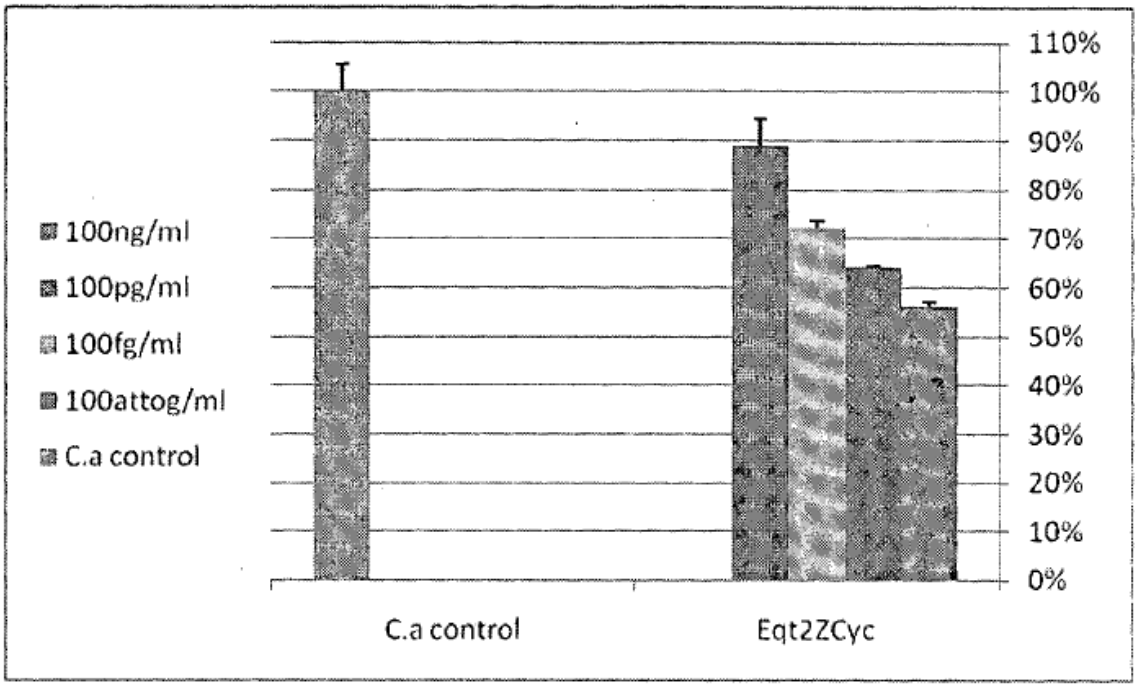
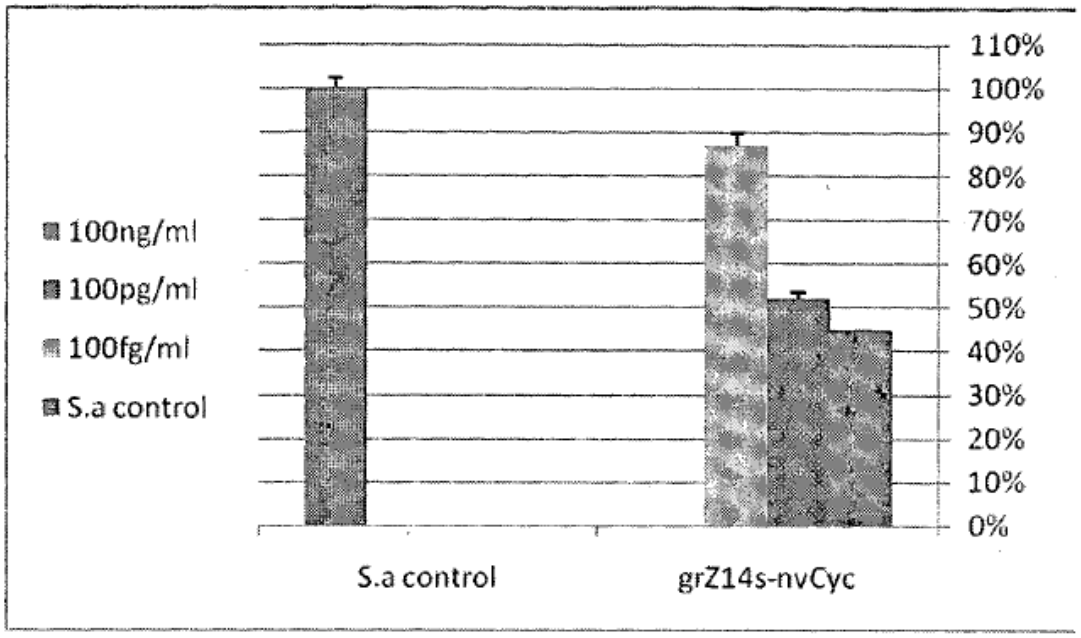


FIGURA 23

Tinción con rojo Congo de grZ14s-nvCyc incubado con Staphylococcus aureus



Bacteria: Staphylococcus aureus ATCC25923

Páptido: grZ14s-nvCyc

Incubación baceria: 4h a 37ºC

Tinción con rojo Congo