

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 900**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2009 PCT/IB2009/006926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010 WO10035107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2009 E 09740951 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2344521**

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

30 Prioridad:

24.09.2008 US 136673 P

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

14.04.2020

73 Titular/es:

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

**Sheba Medical Center
52 621 Tel Hashomer, IL**

72 Inventor/es:

**ZLOTKIN, AMIR y
KESTENBOIM, HEN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 753 900 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, entre otros, a péptidos naturales aislados y su uso en la prevención de la adhesión celular.

Antecedentes de la invención

10 Los microorganismos pueden vivir y proliferar como células individuales que nadan libremente en el medio ambiente (como el plancton), o pueden crecer como comunidades multicelulares altamente organizadas encerradas en una matriz polimérica autoproducida en estrecha asociación con superficies e interfaces. El último estilo de vida microbiano se conoce como biopelículas. La formación de biopelículas representa un modo de crecimiento antiguo, protegido que permite la supervivencia microbiana en ambientes hostiles y permite a los microorganismos dispersarse y colonizar nuevos nichos [Hall-Stoodley y colaboradores, Nat Rev Microbiol. (2004) 2 (2):95-108].

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

20 Las biopelículas son una causa importante de las infecciones sistémicas (por ejemplo, infecciones nosocomiales) en humanos. En el cuerpo, las biopelículas se pueden asociar con los tejidos (por ejemplo, orejas internas, dientes, encías, pulmones, válvulas cardíacas y el tracto urogenital). Se estima que un 65% de las infecciones bacterianas en humanos son biopelículas en naturaleza. Además, después de formar biopelículas, los microorganismos tienden a cambiar sus características, algunas veces drásticamente, de manera que las dosis de antibióticos que normalmente matan los organismos en los cultivos suspendidos son completamente inefectivas contra los mismos microorganismos cuando los organismos están en forma de biopelícula unida o conglomerada (documento de Patente U.S. Pat. No. 7189351).

30 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 proporcionan una vía al cuerpo es la infección microbiana e invariablemente la formación de biopelículas. Dado que estas infecciones son difíciles de tratar con antibióticos, es necesario a menudo retirar el dispositivo, lo que es traumático para el paciente y aumenta el costo médico. Por consiguiente, para tales aparatos médicos, la técnica ha buscado durante mucho tiempo medios y métodos para hacer esos aparatos y dispositivos médicos antimicrobianos.

35 La solicitud de Patente PCT Application No. WO 06/006172 describe el uso de agentes anti-amiloides, tales como compuestos aromáticos, para evitar la formación o disgregar una biopelícula preexistente. La solicitud describe que compuestos que prevén la formación de fibrillas de aminoide en Alzheimer pueden actuar contra a la formación de fibrillas en 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.

40 El documento WO 2009/037714 describe la proteína Equinatoxina II que comprende la secuencia YDYNWY. El documento de Patente US 2003/0103912 describe el uso de D-tagatosa para interrumpir la biopelícula e inhibir la formación de la biopelícula.

Compendio de la invención

45 La presente invención proporciona factores naturales de amplio espectro que interfieren con la formación de la biopelícula en sus etapas iniciales, en una amplia gama de microorganismos. A partir de estos factores naturales, se aislaron péptidos con altas secuencias de conservación, y mostraron alta actividad en la prevención de la adhesión microbiana en su conformación sintética. La secuencia conservada se encuentra en varios organismos marinos, incluyendo varias especies conocidas de anémonas marinas, varios peces (incluyendo el pez cebra-Danio rerio), y en el musgo Physcomitrella patens subsp.

50 Todos los factores mencionados anteriormente muestran actividad que se dirige exclusivamente a la prevención de la adhesión del sustrato bacteriano y la formación de biopelículas derivadas. Está desprovisto de la actividad bactericida letal comúnmente observada, revelada por los péptidos antibióticos y los metabolitos secundarios, que proporcionan una fuerte presión selectiva para una selección natural rápida por el "potencial biótico" microbiano intensivo. Por otro lado, una inhibición de amplio rango de la colonización bacteriana antagoniza un mecanismo

fundamental de supervivencia bacteriana. Por lo tanto, una modificación adaptativa de dicho mecanismo tiene una baja probabilidad debido a su vitalidad.

5 Sher y colaboradores (Toxicon 45: 865-879, 2005) identificaron supuestas proteínas y polipéptidos biológicamente activos expresados por *Hydrae* que podrían ser componentes de su sistema alomonal, utilizando una aproximación bioinformática. Se demostró que *Hydrae* expresa los ortólogos de las toxinas de cnidarian de la fosfolipasa A2 y citólisis que pertenece a la familia de actinoporina, y expresa proteínas similares a las fosfolipasas similares a elapid, proteínas secretoras ricas en cisteína (CRISP), polipéptidos similares a proquineticina y desoxirribonucleasas tóxicas.

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

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, la especificación de la patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

20 Como se utiliza aquí, los términos "que comprende" y "que incluye" o variantes gramaticales de los mismos deben considerarse como especificaciones de las características, números enteros, etapas o componentes indicados pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. Este término abarca los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

25 La frase "que consiste esencialmente en" o variantes gramaticales de la misma cuando se utiliza aquí debe tomarse como especificaciones de las características, números enteros, etapas o componentes indicados, pero no excluyen la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos pero solo si las características, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, dispositivo o método reivindicado.

El término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada que incluye, pero no se limita a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fáciles de utilizar, a partir de métodos, técnicas y procedimientos conocidos por los facultativos de las técnicas químicas, biológicas y biofísicas.

30 Como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

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

Breve descripción de los dibujos

35 La invención se describe aquí, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con la finalidad de proporcionar lo que se cree ser la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle de lo que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica como las diversas formas de la invención se pueden incorporar en la práctica.

En los dibujos:

La Figura 1 muestra la estructura cristalina de la cadena A de 1GWY del estado soluble en agua de la citolisina Sticholisina II formadora de poros, la región activa se marcó en amarillo;

45 La Figura 2 muestra la estructura cristalina de la cadena B de 1GWY del estado soluble en agua de la citolisina Sticholisina II formadora de poros, la región activa se marcó en amarillo;

La Figura 3 muestra la estructura cristalina de la cadena A de 1KD6 de la citolisina Equinatoxina II formadora de poros eucariótica, la región activa se marcó en amarillo;

50 La Figura 4 muestra la construcción tridimensional de un mutante de equinatoxina, la región activa se marcó en amarillo;

La Figura 5 es un diagrama de barras que muestra los efectos de diferentes concentraciones de proteínas sintéticas en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 durante 24 horas; Sin efecto bactericida o bacteriostático;

La Figura 6 es un diagrama de barras que muestra los efectos de diferentes concentraciones de proteínas sintéticas en la formación de biopelículas por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 durante 24 horas;

La Figura 7 es un diagrama de barras que muestra los efectos de diferentes concentraciones de proteínas sintéticas en el crecimiento de un aislado clínico de *Acinetobacter Baumannii* durante 24 horas;

5 La Figura 8 es un diagrama de barras que muestra los efectos de diferentes concentraciones de proteínas sintéticas en la formación de biopelículas por un aislado clínico de *Acinetobacter Baumannii* durante 24 horas;

La Figura 9 es un diagrama de barras que muestra los efectos de las fracciones tentaculares seleccionadas de *Actinia equina* en la formación de biopelículas por *Acinetobacter Baumannii*, con PBS como control positivo;

10 La Figura 10 es un diagrama de barras que muestra los efectos de la fracción 13 en la formación de biopelículas por diversas bacterias gram positivas y gram negativas;

La Figura 11 es un diagrama de barras que muestra los efectos de extractos crudos de *Anemonia*, *Aiptasia* y *Physcomitrella* (Musgo) en *Pseudomonas aeruginosa* en una concentración de proteína de 50 µg/mL;

La Figura 12 es un diagrama de barras que muestra los efectos de cinco péptidos sintéticos y material crudo del musgo de *Physcomitrella patens*;

15 La Figura 13 muestra fracciones obtenidas por separación del extracto crudo de *Aiptasia pulchella* en una columna Sephadex G-10;

La Figura 14 muestra los picos obtenidos por recromatografía de las fracciones de alto peso molecular de la Figura 13;

20 La Figura 15 muestra fracciones obtenidas mediante separación por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con una columna c-18, de la fracción de bajo peso molecular de la Figura 14;

Las Figuras 16A-B muestran la estructura general de un conductor cíclico con un brazo emulsionante de un péptido de acuerdo con los principios de la presente invención; y

La Figura 17 es un diagrama de flujo que muestra el desarrollo del conductor de péptido cíclico con el brazo emulsionante.

25 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de composiciones que comprende un péptido que tiene uno o más efectos relacionados con la prevención de la adhesión del sustrato bacteriano y la formación de biopelículas derivadas, y opcionalmente también la prevención de la adhesión célula-célula. También se pueden proporcionar opcional, adicional o

30 alternativamente otros efectos. El péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, FDYNWY, YDWNLY, YDWHLY y WDYNLY, que se pueden extraer de organismos tales como organismos acuáticos y musgos y métodos de uso de los mismos. Otras secuencias se describen a continuación. Por lo tanto, la presente invención se refiere un péptido seleccionado del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY

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

40 Las biopelículas son también un problema en muchas industrias incluyendo la industria alimentaria, farmacéutica, de pintura, aguas, industrias de transporte e ingeniería que causan, entre una amplia gama de efectos negativos, la corrosión acelerada en sistemas industriales, acidificación del petróleo y la bioincrustación. Por ejemplo, la bioincrustación se puede causar por la adhesión de organismos a cualquier superficie en un ambiente marino o de agua dulce, incluyendo torres de refrigeración, tuberías y filtros de agua en instalaciones de enfriamiento o desalinización, irrigación y centrales eléctricas, y membranas, tales como las utilizadas en aguas residuales y sistemas de desalinización. La bioincrustación ocurre también en sistemas de acuicultura en las piscifactorías.

45 Además, las flotas de transporte comercial del mundo consumen aproximadamente 300 millones de toneladas de combustible al año. Sin medidas antiincrustantes, ese consumo de combustible aumentaría hasta en un 40%, lo que equivale a 120 millones de toneladas de combustible adicionales al año. El costo económico de esto se estimó en unos 7,5 billones de dólares en 2000; una estimación más reciente es de 30 billones de dólares.

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

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

- 5 Los organismos más “sensibles” son invertebrados pertenecientes al phylum cnidaria que incluye las anémonas del mar, corales, medusas, hidroides, medusas, y abanicos de mar. Tales organismos de cuerpo blando, que carecen de protección física como escamas o caparazones, utilizan proteínas y metabolitos secundarios para protegerse del medio microbiano que los rodea.

10 Se ha informado previamente que los organismos marinos (por ejemplo, esponjas) producen metabolitos secundarios que muestran actividades antibacterianas y antifúngicas [Amade y colaboradores, Supra]. Además, se ha demostrado que las anémonas del mar (por ejemplo *Actinia equina*) producen péptidos formadores de poros, tóxicos (es decir, equinatoxinas), que lisan y matan células eucarióticas de manera similar a otros pequeños péptidos antimicrobianos [Anderluh y colaboradores, Supra].

15 Aunque se sabe en la técnica que las secuencias de longitud completa de diversas proteínas se relacionan con su función citolítica, los péptidos específicos responsables del efecto citolítico no se han identificado previamente.

20 Los presentes inventores han demostrado que varias fracciones activas obtenidas de las anémonas de mar utilizando separaciones de cromatografía líquida muestran un alto nivel de prevención de la adhesión microbiana a las superficies abióticas. Las anémonas de mar incluyen 46 familias que se pueden encontrar en fuentes de agua en todo el mundo. La mayoría de las anémonas de mar son sésiles, con un pie especializado utilizado para anclarlas en sustratos blandos, o se adhieren a rocas y corales. La actividad anti-adhesiva se demostró con varias especies de anémonas de mar pertenecientes a diferentes géneros: *Actinia equina*, *Aiptasia* y *Anemonia*. Se ha demostrado que la región N terminal de la citotoxina de la anémona está implicada en el efecto citotóxico [Ref: Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutiérrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, González-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): Pore formation by equinatoxin, an eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta sandwich. J Biol Chem. 279(45):46509-46517]. Los presentes inventores también han identificado en el pescado una proteína que tiene cierta semejanza con la región C terminal de la citoxina de la anémona, región que no está implicada en la citotoxicidad. Esta proteína tiene una región altamente conservada, con una función desconocida, que es también 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 de *Physcomitrella patens*.

30 Los presentes inventores, por tanto, plantearon la hipótesis de que esta región proporciona un péptido que es altamente eficaz en la prevención en la formación de la biopelícula, mientras que está desprovisto de la actividad citotóxica. Los presentes inventores han caracterizado y aislado un péptido natural que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNYF, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY, que tienen propiedades anti-película altamente eficaces.

35 De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido comprende parte de una secuencia que comprende hasta aproximadamente 30, hasta aproximadamente 40, o hasta aproximadamente 50 aminoácidos.

40 De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido se selecciona del grupo que consiste en LFSVPYDYNWYSNWW, FSVPYDYNLYSNWW, MFSVPFDYNYFYSNWW, MFSVPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYTNWW, MWSVPFDYNLYSNWW, MFSVPWDYNLYKNWF, MFSVPFDYNLYKNWL, MFSVPFDYNWYSNWW, LFSVPFDYNLYSNWW, LFSVPYDYNWYSNWW, MASIPYDWNLYQSWA, MASIPYDWNLYSAWA, y MASIPYDWHLYNAWA. Como se muestra aquí a continuación y en la sección de Ejemplos que sigue, los presentes inventores han identificado una fracción activa extraída de la anémona de *Aiptesia pulchella*, utilizando el análisis de espectroscopía de masas en tándem (MS/MS).

45 Los presentes inventores utilizaron el programa clustalW para identificar alineaciones de secuencia múltiple biológicamente significativas de diversas proteínas de citotoxina de anémonas e identificar un cebador universal de citotoxina de anémona para su uso en una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se logró la amplificación de una región de 250 pares de bases de proteínas de citotoxina a partir de dos diferentes anémonas, *aiptesia* y *anemonia viridansm*, de secuencia Eqt-F: GTR TCG ACA ACG AGT CRG G y Eqt-R252: TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG, respectivamente. La traducción de estas regiones a péptidos, y la comparación de BlastX con el banco de genes, mostraron que estas regiones son parte del dominio conservado de la citoxina de la anémona. Como se describe con más detalle a continuación en la sección de Ejemplos, y se muestra en las Figuras 5 a 8, los presentes inventores compararon las actividades de un número de péptidos sintéticos de anémonas y musgo, y descubrieron que estos péptidos prevenían la formación de biopelículas [Figuras 6 y 8 a 12], pero no mataban ni inhibían el crecimiento de la bacteria [Figuras 5 y 7].

55 El efecto anti-adhesivo se demostró en varias especies bacterianas (Figura 10), lo que condujo a los presentes inventores a concluir que los materiales activos no son específicos de especies sin activos frente a una amplia gama de especies microbianas.

La región de péptido conservada se ha identificado, por ejemplo, en las siguientes proteínas naturales:

LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
FSVPYDYNLYSNWW	Actinoporina Or-A
MFSVPFDYNFYSNWW	HMg III de la Heteractis magnifica
MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
MWSVPFDYNLYSNWW	Physcomitrella patens
MFSVPWDYNLYKNWF	Danio rerio
MFSVPFDYNLYKNWL	Tetraodon nigroviridis

Opcional y preferiblemente, el péptido de la presente invención comprende la secuencia CMFSVPFDYNWYSNWWC. Opcional y preferiblemente, el péptido de la presente invención está comprendido en una proteína que tiene de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 aminoácidos.

5 Sin desear estar limitado por una sola hipótesis, basándose en la estructura tridimensional de dos citotoxinas de anemonas (equinatoxina y Sticholysin), como se muestra en las Figuras 1-4, la región activa mira hacia afuera.

Las Figuras 1 y 2 muestran la estructura cristalina de las cadenas A y B de 1 GWY, respectivamente, de la citolisina Sticholysin II. La Figura 3 muestra la estructura de la cadena A de 1KD6 de la citolisina equintoxina II eucariótica formadora de poros.

10 La Figura 4 muestra la construcción tridimensional de un mutante de equinatoxina, que tiene tres cisteínas introducidas en las posiciones 8, 18 y 69 (Cadena A de 1TZQ). Se ha demostrado anteriormente que este mutante no es hemolíticamente activo (Kristan K, Podlesek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, González-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): Pore formation by equinatoxin, an eukaryotic pore-forming toxin, requires a flexible N-terminal region and a stable beta sandwich. J Biol Chem. 279(45):46509-46517). La proteína perdió así su citotoxicidad, pero todavía era activa frente a la adhesión bacteriana.

15 Los principios y el funcionamiento de la presente invención se pueden entender mejor con relación a los dibujos y descripciones adjuntas.

20 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados en los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de varias maneras. También, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada aquí son para el propósito de la descripción y no deben considerarse como limitantes.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un péptido, el péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos, y en donde la composición está desprovista de actividad citotóxica o citostática.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un método ex vivo o in vitro para prevenir la adhesión de un organismo unicelular a una superficie seleccionada del grupo que consiste en una tela, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, una mampostería, un vidrio, un metal y un plástico, comprendiendo el método poner en contacto el organismo unicelular con una composición desprovista de actividad citotóxica o citostática y que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que
30 consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY, en donde la composición previene o reduce la adhesión del organismo unicelular a la superficie;

en donde dicho péptido no es

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEEDKRSADVAGAVIDGASLSFDILK
TVLEALGNVVKRKIAVGVVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALL
YNGQKDRGPVATGAVGVLA YLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI
YKGRRADQRMYEELYNLSFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAI
·LEIHVSKA ;

o

35 en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona preferiblemente un dominio que comprende al menos uno de los péptidos anteriores y que es efectivo frente a la adhesión celular a una superficie. Más preferiblemente, el dominio se incluye como parte de una proteína. Opcional y más preferiblemente, el dominio muestra un comportamiento anti-adhesivo, por ejemplo para la prevención de la formación y/o tratamiento de una biopelícula, pero no muestra un comportamiento citotóxico.

5

Una selección no limitante de dominios ejemplares se proporciona en la siguiente tabla.

Secuencia de dominio	Especies
LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
FSPYDYNLYSNWW	Actinoporina Or-A
MFSVPFDYNFYSNWW	HMg III de Heteractis magnifica
MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
MWSVPFDYNLYSNWW	Physcomitrella patens
MFSVPWDYNLYKNWF	Danio rerio
MFSVPFDYNLYKNWL	Tetraodon nigroviridis

Otras secuencias ejemplares se describen aquí, relacionadas con la siguiente secuencia:

**MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDILKTV
LEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDR
GPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYK GKRRADQRMYE
ELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA**

10

Esta secuencia tiene el identificador de acceso al GenBank: >gi|48428895|sp|P61914.1|ACTP2_ACTEQ precursor 2 de la Equinatoxina (Equinatoxin II) (EqT II) (EqT II) Actinia equine y tiene 214 aminoácidos de longitud. Esta secuencia es también opcionalmente una secuencia ejemplar de acuerdo con la presente invención. Las posiciones 38-213 de esta secuencia alcanzan el dominio anotado pfam06369, Anemone_cytotox, proteína citotóxica de la anémona marina; por lo tanto, esta parte de la secuencia anterior es también opcionalmente una secuencia ejemplar de acuerdo con la presente invención.

15

En algunas realizaciones, la presente invención también incluye cualquier secuencia relacionada con la secuencia anterior de la misma. Dichas secuencias relacionadas pueden encontrarse opcionalmente ejecutando cualquier tipo de software de comparación de secuencias, incluyendo pero no limitado a BLASTP. A continuación se proporcionan resultados representativos de los taxones seleccionados y sus alineaciones con EqTII (la secuencia anterior):

1. Anémonas marinas –

20

1a. Stichodactyla helianthus

>gi|2815496|sp|P07845.2|ACTP2_STOHE Sticholysin-2 (Sticholysin II) (StnII) (Cytolysin St II) (Cytolysin III) (Cytotoxin)

**ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLEELGKVS RKIAV GIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVILP
EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAFA YYMSSGNTLGVMFSVPFDYNWYSNWW
VKIYSGKRRADQGM YEDLYYGNPY
RGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR**

Alineación

25

>sp|P07845.2|ACTP2_STOHE Sticholysin-2 (Sticholysin II) (StnII) (Cytolysin St II) (Cytolysin III) (Cytotoxin)
Longitud=175

Puntuación = 253 bits (646), Esperado = 8e-66, Método: estadísticas basadas en la composición.

ES 2 753 900 T3

Semejanzas = 118/176 (67%), Positivos = 144/176 (81%), Diferencias = 1/176 (0%)

Query	38	DVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLP	97
		+AG +I GASL+F +L VLE LG V RKIAVG+DNESG TWTALN YFRSGT+D++LP	
Sbjct	1	ALAGTIIAGASLTFQVLDKVLLEELGKVS RKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDIVLP	60
Query	98	HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIY	157
		VP+ KALLY+G+KD GPVATGAV AY MS GNTL V+FSVP+DYNWYSNWW+V+IY	
Sbjct	61	EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAAFAYYMSSGNTLGVMFVSPFDYNWYSNWWVDVKIY	120
Query	158	KGKRRADQRMYYEELYNLSPPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK	213
		GKRRADQ MYE+LYY +P+RGDNGWH +NLGYGL+ +G M S+G A ++I +S+	
Sbjct	121	SGKRRADQGMYYEDLYYG-NPYRGDNGWHEKNLGYGLRMLKGMITSAGEAKMQIKISR	175

2. Pez huesudo

2a. Danio rerio

5 >gi|125821212|ref|XP_001342650.1| PREDICTED: proteína hipotética [Danio rerio]

**MTESAEVAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAHATG
SVGVLTLDLFFERRRNDYTETLAIMFVSPWDYNLYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKEMYQKNQHGFVREE
ANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWDKLLS PMAQMDC**

Alineación:

>ref|XP_001342650.1|UniGene infoGene info PREDICTED: proteína hipotética [Danio rerio] Longitud = 184 GENE ID: 100002992 apn| proteína similar a la actinoporina [Danio rerio]

10 Puntuación = 199 bits (505), Esperado = 1e-49, Método: estadísticas basadas en la composición.

Semejanzas = 49/167 (29%), Positivos = 73/167 (43%), Diferencias = 12/167 (7%)

Query	58	LEALGNVKKIAVGVDNESG-KTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP	116
		+ A + +R V + N + + Y +G + V K + K	
Sbjct	8	VAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAH	67
Query	117	VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRADQRMYYE	170
		ATG+VGVL Y + + TLA++FSVP+DYN Y NW+ V IY + DQ +Y+E	
Sbjct	68	-ATGSVGVLTLDLFFERRRNDYTETLAIMFVSPWDYNLYKNWFAVGIYPKGKECDQALYKE	126
Query	171	LYYNLSPP----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK 213	213
		+YY + NG G L R M G AI+++ V	
Sbjct	127	MYYQKNQHGFVREEANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWD	173

2b. Tetraodon nigroviridis

15 >gi|47218822|emb|CAG02807.1| producto proteico sin nombre [Tetraodon nigroviridis]

**MESAEVAADVSRSRSVTIEIISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSGIPTGS
VGVLTLYELLERRSTMLPETLAIMFVSPYDYSFYNNWFAVGIYETGTPKCNGLYKQMYNEKKQAEHGFVRE
KANGSGINYVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDAFFPFSE**

Alineación:

>emb|CAG02807.1| producto proteico sin nombre [Tetraodon nigroviridis] Longitud = 181

Puntuación = 192 bits (489), Esperado = 1e-47, Método: estadísticas basadas en la composición.

20 Semejanzas = 46/170 (27%), Positivos = 76/170 (44%), Diferencias = 14/170 (8%).

ES 2 753 900 T3

Query	58	LEALGNVKKRIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP	116
		+ A + R + + + N + Y SG + V + K G	
Sbjct	7	VAADVSRRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSG-	65
Query	117	VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQRMYEE	170
		+ TG+VGVL Y + + TLA++FSVPYDY++Y+NW+ V IY+ + ++ +Y++	
Sbjct	66	IPTGSVGVLTYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWFAVGIYETGTKCNEGLYKQ	125
Query	171	LYYNLSPF-----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA	214
		+Y NG +G L R MN G AI+++ V A	
Sbjct	126	MYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYVGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDA	175

3. Musgos

3a. Physcomitrella patens

>gij168060237|ref|XP_001782104.1| proteína predicha [Physcomitrella patens subsp. Patens]

MVVHLIAMGLRYSETIMKTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLLENLGVYF
 NSGSSDRSIAYKINAQEALLFSARKSDHTARGETVGTFSYYIQEDDKTVHVMWSVFPDYNLYSNWWNIADV
 DGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVELKKA

5

>ref|XP_001782104.1| Proteína predicha de la información génica [Physcomitrella patens subsp. Patens]
 gb|EDQ53098.1| Proteína predicha de la información génica [Physcomitrella patens subsp. Patens] Longitud = 199

GENE ID: 5945292 PHYPADRAFT_61094| proteína hipotética [Physcomitrella patens subsp. Patens]

Puntuación = 230 bits (586), Esperado = 7e-59, Método: estadísticas basadas en la composición.

10 Semejanzas = 63/183 (34%), Positivos = 101/183 (55%), Diferencias = 4/183 (2%).

Query	35	RSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDI	94
		++A +A A+I A LS L+ ++E + V RKIA+G N + T L YF SG+SD	
Sbjct	18	KTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLLENLGVYFNSGSSDR	77
Query	95	VLPKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSD-GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWN	153
		+ +K+ +ALL++ +K A G VG +Y + D T+ V++SVP+DYN YSNWWN	
Sbjct	78	SIAYKINAQEALLFSARKSDH-TARGETVGTFSYYIQEDDKTVHVMWSVFPDYNLYSNWWN	136
Query	154	VRIYKGRRADQRMYEELYYNL--SPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHV	211
		+ + G++ D +++ LY P+ + N G G M ++G A +E+ +	
Sbjct	137	IAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVEL	196
Query	212	SKA	214
		KA	
Sbjct	197	KKA	199

4. Aves

4a. Gallus gallus

>gij118129726|ref|XP_001231839.1| PREDICHO: Isoforma 1 de la proteína hipotética [Gallus gallus]

MPPKEKKENDKPCNDNCQPKPQKGVESLMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLPF
 EIGPDSKGI CIFAKTPLYSLRGSVGTVVCKADTFFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIFTEPNHLGNLGDVF
 SKMMKSKPYCGSSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKA I LKVQVEDMDPPPYSKGM

15

>ref|XP_001231839.1| UniGene info Gene info PREDICTED: isoforma 1 de la proteína hipotética [Gallus gallus]

Longitud=204

ES 2 753 900 T3

GENE ID: 769729 LOC769729 | proteína hipotética LOC769729 [Gallus gallus]

Puntuación = 150 bits (378), Esperado = 9e-35, Método: estadísticas basadas en la composición.

Semejanzas = 33/172 (19%), Positivos = 63/172 (36%), Diferencias = 22/172 (12%)

Query	58	LEALGNVVKRKIAVGVDNES -GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP	116
		L +V R + + + N + T T +Y SG LP ++ + K	
Sbjct	29	LMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVTLTDFRSYCFSGKIVTTLPEIGPDSKGICIFAKTP-Y	87
Query	117	VATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYKGRRADQ-----RMYEEL	171
		G+VG + +D LA+ FS PYDY Y + + I+ + ++ ++	
Sbjct	88	SLRGSVGTVVCK-ADTFFLAITFSNPYDYILYKIEFALEIF---TEPNHLGNLGDVFSKM	143
Query	172	YYNLS PFRG-----DNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK	213
		P+ G ++ + M+++ AIL++ V	
Sbjct	144	MK-SKPYCGSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVED	194

5 5. Ornitorrinco

5a. Ornithorhynchus anatinus

>gij149491241|ref|XP_001516906.1|PREDICTED: proteína hipotética [Ornithorhynchus anatinus]

**MAQTIEHLVHEVEAGRCVGIETNTTNTMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAFCIFVKRKFSLRGS
VGLLVYEIEDQTLAIMFSNPFDYNNFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEKQKGWLKMAKEKLCEC
QCPVSLNNGIRVTATMSNNAKAIKLS SPDAKPPEGDVADVQPTTVRRPNPPFPSPRPRIGSDLTGDQ
LATLDFESGK**

>ref|XP_001516906.1| Gene info PREDICTED: proteína hipotética [Ornithorhynchus anatinus]

10 Longitud=220

GENE ID: 100086848 LOC100086848 | proteína hipotética LOC100086848 [Ornithorhynchus anatinus]

Puntuación = 168 bits (426), Esperado = 2e-40, Método: estadísticas basadas en la composición.

Semejanzas = 36/167 (21%), Positivos = 69/167 (41%), Diferencias = 12/167 (7%)

Query	58	LEALGNVVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPV	117
		L R + + + N + T+ + T+ SG + + A K R	
Sbjct	8	LVHEVEAGRCVGIETNTTNTMTFRSPRTFCFSGHTLTPPTPIIHPNNAFCIFVK-RKFS	66
Query	118	ATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI--YKGRRADQRMYYEELYNNL	175
		G+VG+L Y + D TLA++FS P+DYN++ + V + YK + + + +E LY+	
Sbjct	67	LRGSVGLLVYEIED-QTLAIMFSNPFDYNNFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEK	125
Query	176	-----SPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA	214
		+ G++ M+++ AI+++ A	
Sbjct	126	QKGWLKMAKEKLCECQCPVSLNNGIRVTATMSNNAKAIKLS SPDA	172

15 Como se utiliza aquí, el término “aislado” se refiere a una composición que se ha eliminado de su ubicación *in-vivo* (por ejemplo, un organismo acuático o musgo). Preferiblemente, las composiciones aisladas de la presente invención están sustancialmente libres de otras sustancias (por ejemplo, otras proteínas que no comprenden los efectos anti-adhesivos) que están presentes en sus ubicaciones *in-vivo* (es decir, purificada o semipurificada).

20 Como se utiliza aquí, la frase “organismo acuático” se refiere a un organismo que vive en un entorno acuático (marino o de agua dulce) tal como por ejemplo un pez o un organismo acuático sésil.

Como se utiliza aquí, la frase “organismo acuático sésil” se refiere a un organismo acuático que no se mueve libremente durante al menos alguna parte de su ciclo de vida. Los organismos acuáticos sésiles están usualmente

unidos permanentemente a un sustrato sólido de algún tipo, tal como una roca o un casco de un barco debido al anclaje físico al sustrato, o por cualquier otra razón (por ejemplo, peces de piedra).

5 Organismos sésiles ejemplares incluyen, pero no se limitan a, cnidarios sésiles tales como corales, anémonas de mar (por ejemplo, *Actinia equina* y *Aiptasia pulchella*), plumas marinas, larvas sésiles acuáticas (por ejemplo, larvas de medusas), anémonas tubo-vivienda e hidroides (por ejemplo, *Chlorohydra viridissima* e *Hydra vulgaris*).

Peces ejemplares que se pueden utilizar de acuerdo con las realizaciones de la presente invención son preferiblemente aquellos que viven en aguas poco profundas o aquellos que se esconden en la capa inferior del océano, a veces en agujeros o cuevas. Dichos peces incluyen anguila y bagre.

10 Como se utiliza aquí, la frase “musgo” se refiere a una planta no vascular de la división de briofitas, que incluye cualquiera de las clases de takakiposida, esfagnópidas, andreaeopsida, andreaeobryopsida, polytrichopsida, o briopsida.

El musgo puede comprender, por ejemplo, *Physcomitrella patens*, *Funaria hygrometrica*; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Bryophyta; Moss Superclass V; Bryopsida; Funariidae; Funariales; Funariaceae; o *Physcomitrella*.

15 Las composiciones de la presente invención se pueden expresar también *in-vivo* utilizando técnicas de ingeniería genética (por ejemplo, utilizando organismos sésiles acuáticos transgénicos).

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de la presente invención carecen de actividad citotóxica o citostática, por ejemplo, no son bactericidas o bacteriostáticas.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, las composiciones de la presente invención son resistentes a la liofilización, por ejemplo, sus actividades se conservan después de la liofilización.

25 Como se utiliza aquí, la frase “organismo de célula única” se refiere a un organismo unicelular también denominado microorganismo o microbio. El organismo unicelular de la presente invención puede ser un organismo de célula única eucariótica (por ejemplo, protozoos u hongos por ejemplo, levadura) o un organismo de célula única 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.

Como se utiliza aquí, el término “biopelícula” se refiere a una matriz extracelular en la que los microorganismos se dispersan y/o forman colonias. La biopelícula está hecha típicamente de polisacáridos y otras macromoléculas.

Ejemplos de células bacterianas, cuya adhesión puede prevenirse de acuerdo con el método de la presente invención, incluyen bacterias gram positivas y bacterias gram negativas.

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

50 El término “bacteria gram negativa” como se utiliza aquí se refiere a bacterias que se caracterizan por la presencia de una membrana doble que rodea cada célula bacteriana. Bacterias gram negativas representativas incluyen *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter baumannii*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Aeromonas hydrophila*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, *Bartonella bacilliformis*, *Bordetella* spp., *Borrelia burgdorferi*, *Branhamella catarrhalis*, *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Fusobacterium* spp., *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Legionella* spp., *Leptospira* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Morganella morganii*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria*

meningitidis, Pasteurella multocida, Plesiomonas shigelloides, Prevotella spp., Proteus spp., Providencia rettgeri, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas spp., Rickettsia prowazekii, Rickettsia rickettsii, Rochalimaea spp., Salmonella spp., Salmonella typhi, Serratia marcescens, Shigella spp., Shigella sonnei, Treponema carateum, Treponema pallidum, Treponema pallidum endemicum, Treponema pertenue, Veillonella spp., Vibrio cholerae, Vibrio vulnificus, Yersinia enterocolitica, Yersinia pestis.

El término “hongo” como se utiliza aquí se refiere a los organismos heterotróficos que se caracterizan por la presencia de una pared celular quitinosa, y en la mayoría de las especies, al crecimiento filamentosos como hifas multicelulares. 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.

Como se utiliza aquí, la frase “que previene la adhesión” se refiere a que reducen o eliminan la unión celular a una superficie (por ejemplo, por reducción de la velocidad de crecimiento sobre una superficie). Preferiblemente, las composiciones de la presente invención previenen la adhesión celular en tanto como un 10 %, más preferiblemente 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 preferible en un 100% según se midió mediante un ensayo de adhesión celular. Ejemplos de ensayos de adhesión celular se describen aquí a continuación y en la sección de Ejemplos que sigue. Se apreciará que las composiciones de la presente invención pueden ser capaces también de prevenir la agregación celular (es decir, la no agregación celular a una superficie).

La presente invención contempla la prevención de la adhesión celular a una amplia variedad de superficies incluyendo telas, fibras, espumas, películas, hormigones, mamposterías, vidrio, metales, plásticos, polímeros y similares.

De acuerdo con una realización, la superficie está comprendida en un dispositivo que es susceptible a la formación de la biopelícula. Dispositivos ejemplares cuyas superficies se contemplan en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cascos de embarcaciones, superficies de automóviles, superficies de aviones, membranas, filtros, y equipos industriales.

La superficie se puede comprender también en dispositivos médicos, instrumentos, e implantes. Ejemplos de dichos dispositivos médicos, instrumentos e implantes incluyen cualquier objeto que es capaz de implantarse temporal o permanentemente en un organismo mamífero, tal como un ser humano. Dispositivos médicos, instrumentos e implantes representativos que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos, injertos vasculares, stents y articulaciones protésicas. Los métodos para prevenir la unión celular a los dispositivos médicos y ejemplos adicionales de los mismos se describen aquí a continuación.

De acuerdo con otra realización la superficie está comprendida en un tejido biológico, tal como por ejemplo, tejidos de mamíferos, por ejemplo, la piel.

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

Como se utiliza aquí, el término “poner en contacto” se refiere al posicionamiento de las composiciones de la presente invención de manera que están en contacto directo o indirecto con las células adhesivas de tal manera que el agente activo comprendido dentro es capaz de prevenir la adhesión de las células al mismo. Por lo tanto, la presente invención contempla tanto la aplicación de las composiciones de la presente invención a la superficie deseada y/o directamente a las células adhesivas.

La puesta en contacto se puede efectuar *in vivo* (es decir, dentro de un cuerpo de mamífero), *ex vivo* (es decir, en células eliminadas del cuerpo) y/o *in vitro* (es decir, fuera de un cuerpo de mamífero).

La puesta en contacto de las composiciones con una superficie se puede efectuar utilizando cualquier método conocido en la técnica incluyendo pulverización, dispersión, humectación, sumergimiento, inmersión, pintura, soldadura ultrasónica, soldadura, unión o adherencia. Las composiciones de la presente invención se pueden unir como monocapas o múltiples capas.

De acuerdo con una realización, las composiciones de la presente invención pueden estar comprendidas en un organismo vivo completo. Por ejemplo, la presente invención contempla la adición de organismos vivos acuáticos a un entorno subacuático de modo que puedan ponerse en contacto con una superficie y/o células adheridas a la misma (por ejemplo, tuberías submarinas, cascos de barcos) previniendo la adhesión de los microorganismos a la misma. Se apreciará que el agente activo se puede secretar a partir de un organismo acuático. En este caso, el organismo acuático no tiene que estar en contacto directo con la superficie o las células del microorganismo, pero en una proximidad suficiente para que el agente activo sea capaz de difundirse a su sitio de acción. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención se pueden secretar en el agua y utilizarse en tratamientos de purificación de agua tales como por ejemplo desalinización del agua del mar o agua salobre.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención

se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y como un ingrediente activo un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY como la descrita en este documento.

5 De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención

los péptidos anteriores pueden opcionalmente alterarse para formar análogos no peptídicos, incluyendo pero no limitado a, la sustitución de uno o más enlaces con enlaces menos lábiles, ciclación (que se describe con mayor detalle a continuación) y similares. Además o alternativamente, un péptido puede convertirse opcionalmente en una molécula pequeña mediante modelado informático, como se describe, por ejemplo, en la solicitud de Patente PCT Application No. WO/2007/147098.

10 Un "resto orgánico peptidomimético" se puede sustituir opcionalmente por restos de aminoácidos en un péptido de acuerdo con la presente invención tanto como sustituciones conservativas como no conservativas. Estos restos se denominan también "aminoácidos no naturales" y pueden sustituir opcionalmente restos de aminoácidos, aminoácidos o actuar como grupos espaciadores dentro de los péptidos en un lugar de aminoácidos eliminados. Los restos orgánicos peptidomiméticos tienen opcional y preferiblemente propiedades estéricas, electrónicas o configuracionales similares a las de los aminoácidos sustituidos y dichos peptidomiméticos se utilizan para sustituir aminoácidos en posiciones esenciales, y se consideran sustituciones conservativas. Sin embargo, tales similitudes no se requieren necesariamente. La única restricción sobre el uso de los peptidomiméticos es que la composición retenga al menos sustancialmente su actividad fisiológica en comparación con el péptido nativo de acuerdo con la presente invención.

15 Los peptidomiméticos pueden utilizarse opcionalmente para inhibir la degradación de los péptidos mediante procesos enzimáticos y otros procesos degradativos. Los peptidomiméticos pueden introducirse opcional y preferiblemente mediante técnicas de síntesis orgánica. Los ejemplos no limitantes de peptidomiméticos adecuados incluyen D aminoácidos de los correspondientes L aminoácidos, tetrazol (Zabrocki y colaboradores, J. Am. Chem. Soc. 110:5875 5880 (1988)); isósteros de enlaces amida (Jones y colaboradores, Tetrahedron Lett. 29:3853 3856 (1988)); ácido LL 3 amino 2 propanoico 6 carboxílico (LL Acp) (Kemp y colaboradores, J. Org. Chem. 50:5834 5838 (1985)). Análogos similares se muestran en Kemp y colaboradores, Tetrahedron Lett. 29:5081 5082 (1988) así como en Kemp y colaboradores, Tetrahedron Lett. 29:5057 5060 (1988), Kemp y colaboradores, Tetrahedron Lett. 29:4935 4938 (1988) y Kemp y colaboradores, J. Org. Chem. 54:109 115 (1987). Otros adecuados pero a modo de ejemplo se muestran en Nagai y Sato, Tetrahedron Lett. 26:647 650 (1985); Di Maio y colaboradores, J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1985); peptidomiméticos incluyen hidroxil 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolina 3 carboxilato (Miyake y colaboradores, J. Takeda Res. Labs 43:53 76 (1989)); 1,2,3,4 tetrahidroisoquinolina 3 carboxilato (Kazmierski y colaboradores, J. Am. Chem. Soc. 113:2275 2283 (1991)); ácido histidina isoquinolona carboxílico (HIC) (Zechel y colaboradores, 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)).

Ejemplos, ilustrativos pero no limitantes de aminoácidos no naturales incluyen beta aminoácidos (beta 3 y beta 2), 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 o diaminoácidos de núcleo lineal. Están disponibles en una variedad de proveedores, tales como Sigma-Aldrich (USA) por ejemplo.

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

45 El aminoácido de una cualquiera de las regiones de secuencia de la molécula puede modificarse opcionalmente de acuerdo con uno cualquiera de los siguientes tipos ejemplares de modificación (en el péptido conceptualmente visto como "modificado químicamente"). Ejemplos de tipos de modificación no limitantes incluyen carboximetilación, acilación, fosforilación, glicosilación o acilación grasa. Los enlaces de éter se pueden utilizar opcionalmente para unir el hidroxilo de la serina o treonina al hidroxilo de un azúcar. Los enlaces amida se pueden utilizar opcionalmente para unir los grupos carboxilo del glutamato o aspartato a un grupo amino de un azúcar (Garg y Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985); Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26:294-308 (1987)). Los enlaces acetal y cetal se pueden formar también opcionalmente entre aminoácidos y carbohidratos. Derivados acilo de ácidos grasos se pueden formar opcionalmente, por ejemplo, por acilación de un grupo amino libre (por ejemplo, lisina) (Toth y colaboradores, Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)).

55 Como se utiliza aquí 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 restos de aminoácido se modifica o por procesos naturales, tal como modificaciones de procesamiento u otras postraduccionales, o por técnicas de modificación

química que son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de las numerosas modificaciones conocidas incluyen típicamente, pero no se limitan a: acetilación, acilación, amidación, ADP-ribosilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, metilación, miristilación, pegilación, prenilación, fosforilación, ubiquitinación, o cualquier proceso similar.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de este aspecto de la presente descripción,

se proporciona un método para prevenir o tratar una infección patógena en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica, tratando y previniendo de este modo la infección patógena.

10 De acuerdo con realizaciones alternativas de este aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para prevenir la unión de bacterias exógenas al tracto gastrointestinal.

El tracto gastrointestinal de mamíferos contiene una amplia variedad de microflora indígena, que proporciona resistencia a la colonización por patógenos entéricos. A cambio de proporcionar al huésped una mejor defensa frente a patógenos, la microflora indígena obtiene acceso a un entorno estable enriquecido con nutrientes y, por lo tanto, entra en una relación simbiótica con el tracto intestinal del huésped.

15 Las bacterias simbióticas se unen al epitelio gastrointestinal en los seres humanos mediante una unión de alta afinidad, mediada por el receptor. Por el contrario, las bacterias exógenas se unen al epitelio mediante un mecanismo de baja afinidad. Sin desear estar limitados por una sola hipótesis, se espera que las composiciones de la presente invención prevengan o disminuyan selectivamente esta unión de baja afinidad, evitando así la etapa inicial de formación de la biopelícula.

20 La composición de la presente invención es por lo tanto útil para el tratamiento o prevención de enfermedades del tracto gastrointestinal, tal como, por ejemplo la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, que incluyen, por ejemplo, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por diversión, colitis infecciosa y síndrome de Behcet.

25 Como se utiliza aquí una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más ingredientes activos descritos aquí con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

Como se utiliza aquí el término "ingrediente activo" se refiere a las composiciones de organismos (y agentes purificados de los mismos) responsables del efecto biológico deseado.

30 En lo sucesivo, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye bajo estas frases.

35 Aquí, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un ingrediente activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, y polietilenglicoles.

Técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en la última edición de "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, que se incorporan aquí en su totalidad por referencia y se describen adicionalmente aquí a continuación.

40 Como se menciona, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para prevenir o tratar una infección patógena.

Como se utiliza aquí el término "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferiblemente un sujeto humano.

Como se utiliza aquí el término "tratar" se refiere a curar, revertir, atenuar, aliviar, minimizar, suprimir o detener los efectos perjudiciales de una infección patógena.

45 Como se utiliza aquí la frase "infección patógena" se refiere a cualquier afección médica que es causada por un organismo patógeno. Ejemplos de infecciones patógenas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades protozoarias, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma, enfermedades por arqueas y enfermedades por priones.

50 De acuerdo con una realización, la infección patógena es causada por un organismo capaz de crecer en o sobre una biopelícula.

Ejemplos de infecciones patógenas causadas por biopelículas microbianas incluyen endocarditis valvular nativa (NVE), otitis media (OM), prostatitis bacteriana crónica, fibrosis quística (CF), y periodontitis. Infecciones patógenas

adicionales que no se atribuyen específicamente a las biopelículas incluyen, pero no se limitan a infecciones urinarias, infecciones del trato genital femenino y neumonía. Infecciones debidas a la implantación de dispositivos médicos incluyen infecciones vasculares del catéter, infecciones protésicas arteriales, infecciones de las válvulas cardíacas protésicas, infecciones articulares protésicas, infecciones del sistema nervioso central, infecciones de implantes ortopédicos, infecciones por marcapasos y desfibriladores, hemodiálisis e infecciones por diálisis peritoneal, infecciones oculares, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto genital femenino, infecciones asociadas con la intubación endotraqueal y traqueostomía e infecciones dentales.

Como se utiliza aquí la frase "organismo patógeno" se refiere a cualquier organismo unicelular que es capaz de causar una enfermedad, especialmente un microorganismo vivo tal como una bacteria o un hongo. Preferiblemente el organismo patógeno es capaz de crecer en o sobre una biopelícula. Muchos organismos patógenos comunes existen en los mamíferos (por ejemplo, seres humanos) como biopelículas y causan enfermedades. Estos incluyen, pero no se limitan a, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (que causan neumonía), *Fusobacterium necrophorum* (que causa absceso hepático), *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (que causan infecciones de heridas), *Escherichia coli* y *Salmonella spp* (que causan enteritis), *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (que causa OM), y *Streptococci sp.*, *Staphylococci sp.*, *Candida*, y *Aspergillus sp.* (que causan NVE).

Se apreciará que el tratamiento de las enfermedades infecciosas de acuerdo con la presente invención se puede combinar con otros métodos de tratamiento conocidos en la técnica (por ejemplo, terapias de combinación). Estos incluyen, pero no se limitan a, agentes antimicrobianos tales como penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglicósidos, macrólidos, lincomicinas, tetraciclinas, cloranfenicol, y griseofulvina.

Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal, o administración parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea, e inyecciones intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales, intranasales, o intraoculares.

Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región de tejido de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar por procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medios de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse así de manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en las preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

Para inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológica. Para administración transmucosal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

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

Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con los vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lodos, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar utilizando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, añadiendo después auxiliares adecuados según se desee, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Excipientes adecuados son, en particular, rellenos tales como azúcares, incluyendo 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 de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o sales de los mismos tales como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden utilizar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, 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 identificar o caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los ingredientes activos mezclados con un relleno como la lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafinas líquidas, o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de una manera convencional.

Para administración mediante inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dispensador que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita aquí se puede formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para la inyección se pueden presentar en forma de dosis única, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones, o emulsiones en un vehículo aceitoso o acuoso, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización, y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones de inyección apropiadas basadas en aceite o agua. 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. Suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados 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 su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, una solución estéril, libre de pirógenos, basada en agua, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse también en composiciones para vía rectal tal como supositorios o enemas de retención, utilizando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el fin pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de ingredientes activos (por ejemplo, una composición de un organismo acuático o una composición de musgo) efectiva para prevenir, aliviar, o mejorar los síntomas de una infección patógena (por ejemplo, fiebre) o prolongar la supervivencia del sujeto tratado.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada aquí.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la dosis o la cantidad terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos *in vitro* y de los cultivos celulares. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos de animales para lograr una concentración o título deseado. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos aquí se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o animales de experimentación. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y en estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración, y dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, E y colaboradores, (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch.1, p.1.).

La cantidad de dosificación y los intervalos de administración se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles suficientes de plasma o cerebrales del ingrediente activo para inducir o suprimir el efecto biológico (es decir, concentración mínimamente efectiva, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero se puede estimar a partir

de los datos *in vitro*. Las dosis necesarias para lograr las MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Los ensayos de detección se pueden utilizar para determinar las concentraciones en plasma.

5 Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la afección que se va a tratar, la dosificación puede ser de una o varias administraciones, con un transcurso del tratamiento duradero de varios días a varias semanas, o hasta que se efectúe la cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se va a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el juicio del médico que prescribe, etc.

10 Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un equipo de reactivos aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina metálica o de plástico, tal como un envase de blíster. El envase o dispositivo dispensador puede estar acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador puede acompañarse también por un aviso en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones para su uso
15 Food and Drug Administration para medicamentos recetados o de un inserto de un producto aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para medicamentos recetados o de un inserto de un producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden prepararse también, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se detalló más anteriormente.

20 Como se mencionó, los dispositivos médicos y los implantes son comúnmente infectados con bacterias oportunistas y otros microorganismos infecciosos (por ejemplo, hongos) necesitándose en algunos casos la eliminación de los dispositivos implantables. Tales infecciones pueden también dar como resultado enfermedades, largas estadías en el hospital, o incluso la muerte. La prevención de la formación de biopelículas y la infección de los dispositivos médicos es, por lo tanto, altamente deseado.

25 Por lo tanto, la presente invención también contempla dispositivos médicos en los que las composiciones descritas anteriormente están unidas a los mismos.

30 Como se utiliza aquí, el término "dispositivo médico" se refiere a cualquier implante, instrumento, aparato, utensilio, máquina, dispositivo o cualquier otro objeto similar o relacionado (incluyendo cualquier componente o accesorio), que se pretende utilizar en el diagnóstico, tratamiento, cura o prevención de enfermedades u otras afecciones. Tales dispositivos médicos se pretenden utilizar en hombres u otros animales y se prevé que afecte a la estructura o cualquier función del cuerpo. Dichos dispositivos médicos no logran sus propósitos primarios a través de la acción química y no dependen de la metabolización para el logro de sus propósitos primarios previstos.

35 Como se utiliza aquí, el término "implante" se refiere a cualquier objeto destinado a la colocación en un cuerpo humano que no es un tejido vivo. El implante puede ser temporal o permanente. Un implante puede ser un artículo que comprende componentes artificiales, tales como catéteres o marcapasos. Los implantes pueden incluir también objetos derivados naturalmente que se han procesado para que sus tejidos vivos se hayan desvitalizado. Como ejemplo, los injertos óseos se han procesado para que sus células vivas sean eliminadas (acelularizar), pero de modo que su forma se mantiene para servir como una plantilla para el crecimiento interno del hueso de un huésped. Como otro ejemplo, el coral natural se puede procesar para producir preparaciones de hidroxapatita que se pueden
40 aplicar al cuerpo para ciertas terapias ortopédicas y dentales.

45 La presente invención, por lo tanto, prevé revestir dispositivos médicos con las composiciones de la presente invención para prevenir la adherencia celular a la misma a fin de reducir/eliminar cualquier posible agregación celular y formación de biopelícula que se sabe que ocurre después de la implantación. Infecciones relacionadas con los dispositivos resultan generalmente de la introducción de microorganismos, principalmente bacterias, durante la inserción del dispositivo o el procedimiento de implantación, o a partir de la unión de organismos transportados por la sangre al dispositivo recién insertado y su posterior propagación sobre su superficie. El recubrimiento del dispositivo médico con las composiciones de la presente invención inhibirá, por tanto, la formación de biopelículas de una o más especies microbianas, evitará las infecciones relacionadas con los dispositivos médico, y, en consecuencia, reducirá la necesidad de un tratamiento con antibióticos o la retirada del dispositivo médico del sujeto.

50 Los dispositivos médicos que se pueden recubrir de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, vasos sanguíneos artificiales, catéteres y otros dispositivos para la eliminación o administración de fluidos a pacientes, corazones artificiales, riñones artificiales, clavos ortopédicos, articulaciones protésicas, placas e implantes; catéteres y otros tubos (incluyendo tubos urológicos y biliares, tubos endotraqueales, catéteres venosos centrales insertables de forma periférica, catéteres de diálisis, catéteres venosos centrales tunelizados de larga
55 duración, catéteres venosos periféricos, catéteres venosos centrales de corta duración, catéteres arteriales, catéteres pulmonares, catéteres de Swan-Ganz, catéteres urinarios, catéteres peritoneales), dispositivos urinarios (incluyendo dispositivos urinarios de larga duración, dispositivos urinarios de unión de tejidos, esfínteres urinarios artificiales, dilatadores urinarios), derivaciones (incluyendo derivaciones ventriculares o arteriovenosas); prótesis

(incluyendo implantes mamarios, prótesis de pene, prótesis de injerto vascular, dispositivos de reparación de aneurismas, válvulas cardíacas mecánicas, articulaciones artificiales, laringes artificiales, implantes otológicos), dispositivos anastomóticos, puertos de catéteres vasculares, stents vasculares; grapas, dispositivos embólicos, tubos de drenaje de heridas, lentes oculares, implantes dentales, derivaciones de hidrocefalia, marcapasos y desfibriladores implantables, conectores sin aguja, prótesis de voz y similares.

Otra posible aplicación de las composiciones de la presente invención es el recubrimiento de superficies que se encuentran en un entorno médico o dental. Dichas superficies incluyen los aspectos internos y externos de varios instrumentos y dispositivos, ya sean desechables o destinados para usos repetidos. Tales superficies incluyen todo el espectro de artículos adaptados para uso médico, que incluyen sin limitación, escalpelos, agujas, tijeras y otros dispositivos utilizados en procedimientos quirúrgicos invasivos, terapéuticos o de diagnóstico; filtros de sangre. Otros ejemplos serán fácilmente evidentes para los facultativos de estas técnicas.

Las superficies que se encuentran en el entorno médico incluyen también aspectos internos y externos de piezas de equipos médicos, equipos médicos utilizados y transportados por el personal en el entorno de atención médica. Dichas superficies pueden incluir superficies destinadas 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 poliméricos tales 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 la preparación de aparatos médicos, tubos y recipientes utilizados en tratamientos respiratorios, incluyendo la administración de oxígeno, de fármacos solubilizados en nebulizadores y de los agentes anestésicos. Otras superficies de este tipo pueden incluir asas y cables para equipos médicos o dentales no destinados a ser estériles. Además, dichas superficies pueden incluir aquellas superficies externas no estériles de tubos y otros aparatos que se encuentran en áreas donde se encuentran comúnmente la sangre y los fluidos corporales u otros biomateriales peligrosos.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar sobre la superficie de o dentro de estos dispositivos médicos para proporcionar protección a largo plazo contra la colonización de microorganismos y reducir las incidencias de infecciones relacionadas con los dispositivos. Estas composiciones también se pueden incorporar 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 las infecciones relacionadas con los dispositivos siempre que la sustancia se presente en una concentración inhibitoria en la interfaz dispositivo-microbio.

Las composiciones de la presente invención se pueden incorporar directamente en una matriz polimérica del dispositivo médico en la etapa de la síntesis del polímero o en la etapa de fabricación del dispositivo. Las composiciones también pueden unirse covalentemente al polímero del dispositivo médico. Estos y otros muchos métodos de recubrimiento de los dispositivos médicos son evidentes para los expertos en la técnica.

Superficies adicionales que se pueden tratar de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención incluyen aspectos internos y externos de aquellos artículos implicados en la purificación del agua, almacenamiento del agua y suministro de agua, y aquellos artículos implicados en el procesamiento de alimentos. Por lo tanto, la presente invención prevé recubrir una superficie sólida de un recipiente para alimentos o bebidas para extender la vida útil de sus contenidos.

Las superficies relacionadas con la salud pueden incluir también los aspectos internos y externos de los artículos domésticos que participan en la provisión de nutrición, saneamiento o prevención de enfermedades. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para eliminar los microorganismos que causan enfermedades de las superficies externas. Estos pueden incluir, por ejemplo, equipos de procesamiento de alimentos para uso doméstico, materiales para el cuidado infantil, tampones, jabón, detergentes, productos para la salud y el cuidado de la piel, productos de limpieza para el hogar y tazas de inodoros.

La superficie puede ser también artículos de laboratorio que incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos microscópicos, una campana de cultivo, una placa Petri o cualquier otro tipo adecuado de recipiente o contenedor de cultivo tisular conocido en la técnica.

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

Como se utiliza aquí el término "agentes antiincrustantes" se refiere a compuestos utilizados para proteger las superficies subacuáticas de la unión de organismos unicelulares. Estos organismos unicelulares incluyen microorganismos tales como bacterias y hongos.

Estas superficies subacuáticas incluyen cualquier superficie sumergida, incluyendo los cascos de barcos/embarcaciones (es decir, el cuerpo o armazón de un buque o barco), vehículos de inmersión, dispositivos de navegación, pantallas, redes, construcciones, plataformas flotantes o plataformas marinas emplazadas (por ejemplo, muelles), boyas, equipos de señalización y artículos que entran en contacto con agua de mar o agua salada. Otras superficies subacuáticas incluyen estructuras expuestas al agua de mar, incluyendo pilotes, marcadores marinos,

medios de transporte submarino como cables y tuberías, redes de pesca, mamparas, torres de refrigeración, y cualquier dispositivo o estructura que funcione sumergida.

5 Las composiciones de la presente invención se pueden incorporar en recubrimientos marinos para limitar el incrustamiento marino indeseable. Por lo tanto, los agentes antiincrustantes de la presente invención se pueden formular de manera que no contengan materiales tóxicos (tales como metales pesados), y retengan aún su eficacia. La pintura antiincrustante de la presente invención puede contener además aglutinante(s), pigmento(s), disolvente(s) y aditivo(s).

10 Ejemplos de disolventes que se pueden utilizar 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-metil pirrolidona 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 utilizar solos o una combinación de los mismos.

15 Ejemplos de aglutinantes que se pueden utilizar incluyen resinas alquílicas, emulsiones acrílicas o vinílicas, resinas de poliuretano, resinas epoxi, resinas basadas en silicona, resinas acrílicas, resinas basadas en silicatos inorgánicos, resinas vinílicas, particularmente un copolímero de cloruro de vinilo/acetato de vinilo, y colofonia.

Ejemplos de pigmentos que se pueden utilizar incluyen dióxido de titanio, óxido cuproso, óxido de hierro, talco, escamas de aluminio, escamas de mica, óxido férrico, tiocianato cuproso, óxido de zinc, acetato cúprico metaarseniato, cromato de zinc, dimetil ditiocarbamato de zinc, etilen bis(ditiocarbamato) de zinc y dietil ditiocarbamato de zinc.

20 Ejemplos de aditivos que se pueden incorporar en la composición de recubrimiento incluyen deshumidificadores, agentes humectantes/dispersantes, agentes antisedimentación, agentes antiadesollamiento, agentes de secado/curado, agentes antiadherentes y aditivos habitualmente empleados en composiciones de recubrimiento como agentes estabilizantes y antiespumantes. Además, cualquier antibiótico que sea relativamente insoluble en agua de mar se puede utilizar con una pintura marina antiincrustante.

25 Los métodos de preparación de pinturas antiincrustamiento marinas se explican en detalle en los documentos de Patente 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.

Las composiciones de la presente invención se pueden utilizar también para proporcionar propiedades antibacterianas en cosméticos, para evitar la descomposición del producto.

30 Las composiciones pueden utilizarse además para proporcionar un efecto antibacteriano a la boca, dientes y encías, por ejemplo, mediante la incorporación en una pasta de dientes, enjuague bucal o goma de mascar. Tomándolas en conjunto, las presentes enseñanzas describen una amplia gama de nuevos agentes antiadherentes aslados de organismos tales como organismos acuáticos y musgo. El amplio espectro de los efectos antiadhesivos de estos agentes (por ejemplo, inhibiendo la adhesión de bacterias gram positivas y gram negativas) junto con su capacidad para efectuar las etapas iniciales y vulnerables de la formación de biopelículas microbianas, hace que estos agentes sean candidatos principales como agentes antipelículas. Además, los agentes antiadhesivos descritos aquí son modificaciones que permiten la clonación y producción masiva de los mismos. Además, su estabilidad (es decir, su resistencia a las condiciones ambientales) hace que estos agentes sean adecuados para una amplia gama de aplicaciones.

40 Las realizaciones y el alcance de la invención están completamente definidos en las reivindicaciones.

Generalmente, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de DNA molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook y colaboradores, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel y colaboradores, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson y colaboradores, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren y colaboradores, (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); methodologies as set forth in 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 y colaboradores (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); inmunoensayos disponibles están extensamente descritos en documentos de Patente y bibliografía científica, véase, por ejemplo, los documentos de Patente 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; 3,996,345; 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., y 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 Enzimology” Vol. 1-317, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods and Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y colaboradores, “Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en éste son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con la descripción anterior, ilustran la invención de una manera no limitante.

Ejemplo 1: análisis MS/MS de una fracción activa extraída de la anémona *Aiptesia*

10 El extracto crudo de la *Aiptasia pulchella* (organismo completo) se separó en una columna Sephadex G-10 dando como resultado 2 fracciones, mostrando ambas, actividad de formación de anti-adherencia/biopelícula (Figura 13).

La recromatografía de la fracción de alto peso molecular de la Sephadex G-10 en Sephadex G-75 dio como resultado dos picos principales que representan las fracciones de alto y bajo peso molecular (Figura 14).

15 La separación mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) con una columna c-18, de la fracción molecular baja de la columna G-75, en gradientes lineales de acetonitrilo (3-80% de 5 a 75 minutos) en TFA al 0,1% a una velocidad de flujo de 2 ml/min, dio como resultado varias fracciones activas como compuestos antiadhesivos en *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Las fracciones se recogieron cada 2 minutos (Figura 15).

20 Todas las fracciones activas se digirieron con tripsina, se analizaron mediante LC-MS/MS en un Qtof Premier (Waters) y en un LTQ-Orbitrap (Thermo) y se identificaron mediante el software Pep-Miner y Sequest frente a la parte de Eucariotas de la base de datos nr. Se encontró que la función activa eluida a un 72,3% de acetonitrilo (marcada en la flecha roja) era similar a la Equinatoxina 5 de *Actinia equine*.

Ejemplo 2: identificación de una región conservada de la citotoxina de anémona

25 Se preparó una platilla de DNA purificado a partir de 25 mg de *Aiptasia pulchella* y *Anemonia viridans* utilizando el equipo de reactivos de purificación de DNA genómico Wizard (Promega, USDA), de acuerdo con el protocolo del fabricante para el aislamiento del DNA genómico del tejido animal. La PCR se llevó a cabo en 500 ng de la plantilla de DNA purificado de *Aiptasia pulchella* y *Anemonia viridans* utilizando el Master Mix Reddy Mix PCR (ABgene, UK), con el siguiente protocolo: 95°C-5 min (95°C 30 s, 52°C 30 s y 72°C 1 min) X35, 72°C durante 10 min.

Los cebadores Eqt-F (GTR TCG ACA ACG AGT CRG G) y Eqt-R252 (TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG) se añadieron a la mezcla de reacción, a una concentración final de 0,5 µM cada uno.

30 Las reacciones de PCR positivas que dieron un amplicón de DNA con tamaño de-250 pares de bases se enviaron para la secuenciación del DNA.

Un amplicón de PCR de *aiptasia pulchella* dio la siguiente secuencia de 265 pares de bases:

```

GTGTCGCCAACGAGTCGGGATGCACTTGGGAAAAGCCAAATACATACTTCTTCTCTG
GTACTGAGGTATAAAGTGCCTCCCTCTAAAGCTTGAGAATAAAAAAGCACTTTTGTG
CGGCCACGTAAGACAACAGGGCCTGTTGCCACGGGAGCTGTTGGAGTGCTCACTT
ACAAAATGTTGTGCACCAATGAGACGAACACTCTGGCTGTTCTTTTCAGTGTACCCT
TCGACTACAACCTTGTACAGCAACTGGTGGAAATGTCAA

```

35 La comparación de BLASTx de la secuencia de aminoácidos predicha codificada por la secuencia de polinucleótidos anterior con las secuencias de proteínas conocidas en el banco de genes proporcionó los siguientes resultados: Semejanzas = 54/88 (61%); Positivos = 62/88 (70%). A otras citotoxinas de anémonas similares: toxina hemolítica [*Actinaria villosa*], PsTX-20A [*Phyllo-discus semoni*], precursor de citolisina I [*Sagartia rosea*] y precursor de equinatoxina IV [*Actinia equina*]; (números de acceso: BAD74019.1, BAC45007.1, AAP04347.1 y AF057028_1).

La secuencia peptídica relevante [FSVPFDYLNLYSNWW] aparece en la secuencia de *Aiptasia*.

40 El amplicón de PCR de *Anemonia viridans* dio la siguiente secuencia de 254 pares de bases:

TGTGTCGACAACGAGTCgGGCaagacgtGgaCCGCAntgaaCACATACTTCCGTTCTGGcAC
 CTCTGATnTCrTCCTTCCCCATACAGTTCCACATGGTAAGGCACTGCTCTACAACGGT
 CAGAAAGATCGTGGTCCAGTTGCGACTGGCGlgGTTGGAGTACTTGCTTATGcCATGA
 GCgATGGAAACACCCtGGCCGTTTTgTTCAGCrTTCCCTaTGACTATAACcGTACAGCA
 ACTGGTGGAATGTCAA

La comparación de BLASTn con las secuencias de nucleótidos conocidas en el banco de genes dio semejanzas del 97%, 96% y 95% con Equinatoxinas 5 [número de acceso: [AEU51900](#)], 4 [número de acceso: [AF057028](#)] y 2 [número de acceso: [AEU41661](#)], en la correspondencia.

- 5 La secuencia de aminoácidos predicha basada en la traducción del segundo ORF positivo dio la siguiente secuencia de aminoácidos:

CRQRVGMHLGKAKYILLWY*GIKCLPLKLENKKALLYGPRKTTGPVATGA VGVLT YK
 MLCTNETNTLAVLFSVPFDYNLYSNWWKCQ

Ejemplo 3: Comparación de la actividad de los péptidos sintéticos

- 10 Los péptidos listados a continuación se sintetizaron utilizando métodos en fase sólida y la purificación a escala del 90% se llevó a cabo mediante Pepton Inc. (Taejeon, Korea).

Los péptidos se disolvieron utilizando 20 µl de dimetil sulfoxido (DMSO) y se diluyeron al doble en agua destilada a una concentración de 5 mg/ml. Diluciones adicionales se llevaron a cabo en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

- 15 Las actividades de los siguientes péptidos sintéticos se estudiaron en un aislado clínico de *Acinetobacter Baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a concentraciones peptídicas que oscilan de 500 a 0,5 µg/ml. Los péptidos diluidos a las concentraciones apropiadas se incubaron con las bacterias durante 24-48 horas.

- 20 Para los bioensayos de adherencia bacteriana, las biopelículas se cultivaron en placas de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos. Brevemente, 180 µl de cultivos de una noche se añadieron a los pocillos suplementados con 20 µl del péptido apropiado diluido en PBS. Después de 24 horas de incubación a 37°C, cada pocillo se lavó con agua y se tiñó con 250 µl de una solución de cristal violeta. El colorante se eliminó después mediante lavado a fondo con agua. Para la cuantificación de las células unidas, el cristal violeta se solubilizó en 250 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y se midió la absorbancia a 595 nm.

CMFSVPFDYNWYSNWWC	AbacZ-17C
Ac-MFSVPFDYNWYSNWW-NH2	AbacZ-15
CFSVPFDYNWYSNWWC	AbacZ-16C
FDYNWY	AbacZ-6
CFDYNWYC	AbacZ-8C

- 25 Los resultados se muestran en las Figuras 1 a 12. Como se ve en las Figuras 1, 3, 5 y 7, los péptidos no mataron ni inhibieron el crecimiento de las bacterias. Las Figuras 2, 4, 6, 8 y 10 a 12, demuestran que los péptidos prevén la formación de biopelículas.

Ejemplo 4: identificación de péptidos preferidos

- 30 Con el fin de identificar los péptidos cíclicos más activos de acuerdo con la presente invención, se utiliza un sintetizador manual Parallel Peptide con purificador de péptidos para producir péptidos que difieren entre sí en la estrategia de longitud y ciclación. Cada péptido se prueba para su actividad anti-adhesiva en ensayos en microplacas y celdas de flujo, y se lleva a cabo la selección de los péptidos altamente activos. La modelación computarizada de varias versiones de péptidos se utiliza para optimizar la selección de los compuestos activos.

Para un cribado más sensible, el bioensayo se amplía utilizando el ensayo de viabilidad de células microbianas Bac Titer-Glo de Promega, USA. Este método utiliza una técnica de espectrometría más sensible basada en luminiscencia.

5 Se utilizan diversas estrategias de ciclación para obtener un péptido cíclico optimizado a partir de un análogo lineal con bioactividad satisfactoria. La Figura 16A muestra la estructura generalizada de un conductor cíclico con un brazo emulsionante. El análogo lineal es un péptido de 14 mer con un núcleo hidrofóbico (6aa) que se define como un farmacóforo. Los conductores cíclicos se preparan, conservando este farmacóforo y se añade después un brazo emulsionante (resto hidrofóbico) tal como polietileno, polipropileno, Teflón, etc. para proporcionar capacidades absorbentes a una superficie polimérica hidrofóbica (Figura 16B).

10 Las metodologías de mapeo epitópico, escaneo y Cycloscan se utilizan para revelar péptidos más cortos, más rentables, que poseen la actividad biológica deseada.

El conductor cíclico se prepara utilizando la síntesis de péptidos en fase sólida del 9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc SPPS).

15 De acuerdo con un procedimiento representativo, como se muestra en la Figura 17, el primer aminoácido protegido se condensa con resina de clorotirilo (Cl-Trt) utilizando N,N-diisopropiletilamina (DIEA) en diclorometano (DCM) o con amida de Rink utilizando O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro fosfato (HBTU) como agente de acoplamiento.

20 Los siguientes acoplamiento se realizan utilizando un protocolo de Fmoc estándar con 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uranio hexafluorofosfato Metanamino (HATU) o benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBoP), DIEA en N-metil-2-pirrolidona (NMP). Los grupos alcóxicarbonilos (alloc) se desprotegen mediante Pd-trifenilfosfina (Tetrakis) utilizando una mezcla de hidróxido de acetilo/N-metil maleimida/cloruro de dieteno (AcOH/NMM/DCE).

25 La etapa de ciclación se lleva a cabo como una reacción de acoplamiento estándar (en el caso de la formación de un enlace amida) o por burbujeo de oxígeno (en el caso de la formación de un puente disulfuro). También se pueden realizar otros tipos de ciclaciones como se conoce en la técnica.

Los péptidos se liberan de la resina por tratamiento con ácido trifluoroacético:diclorometano:tri-iso-propilsilano (TFA:DCM:TIS), 1:98:1 en presencia de 1,2-etanoditiol durante 30 minutos en el caso de la resina Cl-Trt, y en la presencia de TFA al 95%, TIS y H₂O en el caso de la amida de Rink.

30 El producto crudo en la solución (AcOH/H₂O 1:1) se purifica mediante HPLC preparativo o MPLC para conducir al péptido cíclico puro. La pureza se determina por HPLC analítico. Las estructuras se confirman por LC-MS y análisis de AA.

La siguiente etapa implica la unión del brazo hidrofóbico para introducir propiedades absorbentes al conductor peptídico cíclico. Este brazo se une utilizando el protocolo SPPS estándar.

35 La Figura 17 muestra un diagrama de flujo que describe el proceso para el desarrollo de un conductor peptídico cíclico con un brazo emulsionante.

Ejemplo 4: tratamiento de agua o un medio fluido

Los péptidos y/o composiciones y/o organismos anteriores pueden opcional y preferiblemente usarse para tratar agua y/o un medio fluido, o un sistema o aparato que los contenga, incluyendo pero no limitado a un filtro de ósmosis inversa y/o aparato o sistema de filtración.

40 El efecto de los extractos de Actinaria en la formación de biopelículas utilizando cupones de poliamida en una celda de flujo sin filtración se prueba de la siguiente manera. El efecto del crecimiento de la biopelícula se analiza en una celda de flujo dedicada para microscopía confocal sobre una superficie de poliamida similar como una capa activa de RO (ósmosis inversa). Una celda de flujo de doble canal (FC 270, Biosurface Technologies, Montana, USA) se opera tanto con cepas modelo como inóculo microbiano real tomado de un cupón de la membrana de ósmosis inversa (RO) ubicado en lugares seleccionados en el mar Mediterraneo suplementado con diferentes concentraciones (desde nanogramos a microgramos por ml) de los extractos. El régimen de flujo en las celdas de flujo es laminar y similar a las condiciones típicas de flujo operacional de RO. Para las cepas modelo, se determinan los medios sintéticos de agua de mar (véase (Fritzmán y colaboradores, 2007: Fritzmán, C., Lowenberg, J., Wintgens, T., and Melin, T. (2007) State-of-the-art of reverse osmosis desalination. Desalination 216: 1-76) e informes IDE <http://www.ide-tech.tech.com/>) y se utilizan para experimentos de crecimiento de biopelículas de unión celular. Para el consorcio microbiano que se aisló de la planta de desalinización en Palmachim, el agua de mar real se utiliza como medio para la unión microbiana y los experimentos de crecimiento de la biopelícula. Las cepas modelo que se utilizarán son Vibrio fisheri y Caulobacter crescentus. En la celda de flujo de doble canal, un canal se suplementa con un extracto y el otro sirve como un control son solo el disolvente que se añade al medio (por ejemplo, cuando el extracto se disuelve en etanol).

55

- Las biopelículas de la celda de flujo se analizan microscópicamente a diferentes puntos de tiempo (hasta 14 días del experimento) cuando las células viables, las células muertas y las sustancias poliméricas extra-celulares (EPS) se tiñen con sondas fluorescentes (diferentes lectinas marcadas fluorescentes se utilizan para sondear diferentes constituyentes de polisacáridos en las EPS) y se visualizan con microscopía confocal de escaneo laser (LSCM). El análisis microscópico se lleva a cabo utilizando softwares de análisis de procesamiento de imagen tal como Imaris bitplane y COMSTAT (Heydorn y colaboradores, 2002: Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M.R., Tolker-Nielsen, T. y colaboradores (2002) Statistical analysis of Pseudomonas aeruginosa biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expresión. Applied and Environmental Microbiology 68: 2008-2017).
- El calcio, que tiene un efecto significativo sobre la adhesividad y la compacidad de la biopelícula, también se monitoriza y visualiza con LSCM utilizando fluorocromos específicos de calcio tales como Fura-2 (Gryniewicz y colaboradores, 1985: Gryniewicz, G., Poenie, M., y Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. Journal of Biological Chemistry 260: 3440-3450; Neu y colaboradores, 2002: Neu, T.R., Kuhlicke, U., y Lawrence, J.R. (2002) Assessment of Fluorochromes for Two-Photon Laser Scanning Microscopy of Biofilms. Applied and Environmental Microbiology 68: 901-909).
- Las propiedades antiincrustantes se examinan también analizando la adherencia de diferentes tipos de EPC/bacterias con cristales modificados en las superficies QCM-D unidos covalentemente a diferentes péptidos.
- QCM-D emplea un sensor de masas ultra sensible (cristal de cuarzo recubierto de sílice) ubicado dentro de una celda de flujo con unas características geométricas e hidrodinámicas bien definidas, un diseño que permite la monitorización en tiempo real de la adsorción en masa sin requerir marcaje. El cristal de cuarzo piezoeléctrico oscila lateralmente con una amplitud de 1-2 nm cuando se aplica un voltaje a los electrodos fijados al cristal de cuarzo. Como la deposición (adsorción) ocurre en la superficie del cristal, conduce a un desplazamiento en la frecuencia vibratoria del cristal. Además de monitorizar el desplazamiento de frecuencia para determinar la masa adsorbida, el espesor y la conformación estructural de la capa adsorbida se pueden extraer mediante la monitorización simultánea de la energía de disipación, que es la suma de todas las pérdidas de energía dentro del sistema por ciclo de oscilación. Curiosamente, además de medir la adsorción y la adherencia de los diferentes tipos de EPS (es decir, cambios en los contenidos de polisacáridos/proteínas) bajo diferentes condiciones ambientales (es decir, cambios en las concentraciones de catión divalente), el QCM-D puede también revelar las propiedades visco-elásticas, cambios conformacionales y el espesor de la nano capa precipitada.
- Ejemplo 5: Efecto de los péptidos activos en la bioincrustación de ósmosis inversa bajo condiciones de desalinización.
- Se determina el efecto de los extractos de Actinaria en la bioincrustación de ósmosis inversa bajo condiciones de desalinización.
- Dos unidades de escala de laboratorio de RO (ósmosis inversa) se utilizaron para la desalinización del agua de mar, y se llevaron a cabo los experimentos de bioincrustación tanto con cepas modelo candidatas como con consorcio microbiano aislado de la planta de desalinización GES (como se mencionó anteriormente) en un medio de agua de mar sintético y agua de mar real. Las membranas de lámina plana comercializadas SW-30 de Dow-Filmtec se utilizaron para estos experimentos de bioincrustación. Se obtienen medidas específicas de las condiciones del proceso: flujo permeado, carbono orgánico total (TOC), concentraciones de oxígeno en el permeado y en la solución de cloruro de sodio saturada, tasa de absorción de oxígeno, y el rechazo de diferentes iones y cationes por la membrana. Se analizan los diferentes componentes de la biopelícula: el análisis químico de la capa de bioincrustación incluirá la caracterización de proteínas, carbohidratos, lípidos, y DNA. La observación microscópica y el análisis se realizan como se mencionó anteriormente.
- Aunque la invención se ha descrito con respecto a un número limitado de realizaciones, se apreciará que se pueden realizar muchas variaciones, modificaciones y otras aplicaciones de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido seleccionado del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY.

5 2. Un dispositivo médico que comprende una composición desprovista de actividad citotóxica o citostática y que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY, en donde la composición está cubierta en una superficie del dispositivo o se incorpora en una matriz polimérica del dispositivo médico y el dispositivo médico es un dispositivo intracorpóreo o un dispositivo extracorpóreo, en donde el dispositivo es, en particular, un dispositivo médico implantable o un instrumento médico;

10 en donde dicho péptido no es

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEEDKRSADVAGAVIDGASLSFDILK
 TVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALL
 YNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI
 YKGKRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAI
 LEIHVSKA ; o

en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos.

15 3. Un método ex vivo o in vivo para prevenir la adhesión de un organismo unicelular a una superficie seleccionada del grupo que consiste en una tela, una fibra, una espuma, una película, un hormigón, una mampostería, un vidrio, un metal y un plástico, comprendiendo el método poner en contacto el organismo unicelular con una composición desprovista de actividad citotóxica o citostática y que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY, en donde la composición prevé o reduce la adhesión del organismo unicelular a la superficie;

en donde dicho péptido no es

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEEDKRSADVAGAVIDGASLSFDILK
 TVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALL
 YNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI
 YKGKRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAI
 LEIHVSKA ; o

20

en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos.

25 4. Un método Un método de tratamiento del agua para prevenir o reducir la formación de biopelículas o ensuciamiento del filtro, que comprende tratar el agua con una composición desprovista de actividad citotóxica o citostática y que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY;

en donde dicho péptido no es

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEEDKRSADVAGAVIDGASLSFDILK
 TVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALL
 YNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI
 YKGKRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAI
 LEIHVSKA ; o

; o

en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos.

5. Un método para prevenir o reducir la formación de biopelículas en un fluido externo que no se origina de un cuerpo animal, que comprende tratar el fluido con una composición desprovista de actividad citotóxica o citostática y que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, YDYNLY, FDYNFY, FDYNLY, WDYNLY, FDYNWY, YDWNLY y YDWHLY;

en donde dicho péptido no es

MSRLIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEKRSADVAGAVIDGASLSFDILK
 TVLEALGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALL
 YNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRI
 YKGGRRADQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAI
 LEIHVSKA

;

en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos.

6. El dispositivo médico de la reivindicación 2 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5,
- 10 en donde la secuencia YDYNWY se comprende en una proteína de secuencia LFSVPYDYNWYSNWW; o
- en donde la secuencia YDYNLY se comprende en una proteína de secuencia MFSVPYDYNLYSNWW o LFSVPYDYNLYSNWW; o
- en donde la secuencia FDYNFY se comprende en una proteína de secuencia MFSVPFDYNFYSNWW o LFSVPFDYNFYSNWW; o
- 15 en donde la secuencia FDYNLY se comprende en una proteína de secuencia seleccionada del grupo que consiste en LFSVPFDYNLYSNWW, LFSIPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYSNWW, MFSVPFDYNLYTNWW, MWSVPFDYNLYSNWW y MFSVPFDYNLYKNWL; o
- en donde la secuencia WDYNLY se comprende en una proteína de secuencia MFSVPWDYNLYKNWF; o
- en donde la secuencia FDYNWY se comprende en una proteína de secuencia MFSVPFDYNWYSNWW; o
- 20 en donde la secuencia YDWNLY se comprende en una proteína de secuencia MASIPYDWNLYQSWA o MASIPYDWNLYSAWA; o
- en donde la secuencia YDWHLY se comprende en una proteína de secuencia MASIPYDWHLYNAWA.
7. El dispositivo médico de la reivindicación 2 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el péptido se aísla de un organismo acuático, en donde el organismo acuático es, en particular, seleccionado del grupo que consiste en un pez y un organismo sésil.
- 25 8. El dispositivo médico de la reivindicación 7 o el método de la reivindicación 7, en donde el organismo sésil es una anémona seleccionada del grupo que consiste en *Aiptasia pulchella* y *Anemonia viridans*.
9. El dispositivo médico de la reivindicación 2 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el péptido se aísla de un musgo, en donde el musgo es, en particular, seleccionado del grupo que consiste en
- 30 *Physcomitrella patens*, *Funaria hygrometrica*; *Eukariota*; *Viridiplantae*; *Streptophyta*; *Embtyophyta*; *Bryophita*; *Moss Superclass V*; *Bryopsida*; *Funariidae*; *Funariales*; *Funariaceae*; y *Physcomitrella*.
10. El dispositivo médico de la reivindicación 2 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la composición es resistente a la liofilización.
11. El dispositivo médico de la reivindicación 2 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la
- 35 composición inhibe la agregación de células.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en donde el organismo unicelular se comprende en una biopelícula.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en donde el organismo unicelular se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un hongo, un protozoo y una arquea, en donde el hongo comprende, en particular, una
- 40 levadura.

14. El método de la reivindicación 3, en donde la composición está en una forma seleccionada del grupo que consiste en un aerosol, un gel y una pintura.
- 5 15. El método de la reivindicación 3, en donde dicha superficie está comprendida en un dispositivo que es susceptible a la formación de la biopelícula, en donde dicho dispositivo es, por ejemplo, un casco de embarcación, una superficie de automóvil, una superficie de avión, una membrana, un filtro o un equipo industrial.
16. El método de la reivindicación 4, en donde el agua tratada se aplica a un filtro de ósmosis inversa.
17. El método de la reivindicación 5, en donde el fluido se aplica a un filtro de ósmosis inversa.
- 10 18. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde la biopelícula se forma por un organismo unicelular seleccionado del grupo que consiste en una bacteria, un hongo, un protozoo y una arquea, en donde el hongo comprende, en particular, una levadura.
19. Una composición que comprende un péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en YDYNWY, en donde dicho péptido comprende hasta 50 aminoácidos, y en donde la composición está desprovista de actividad citotóxica o citostática.

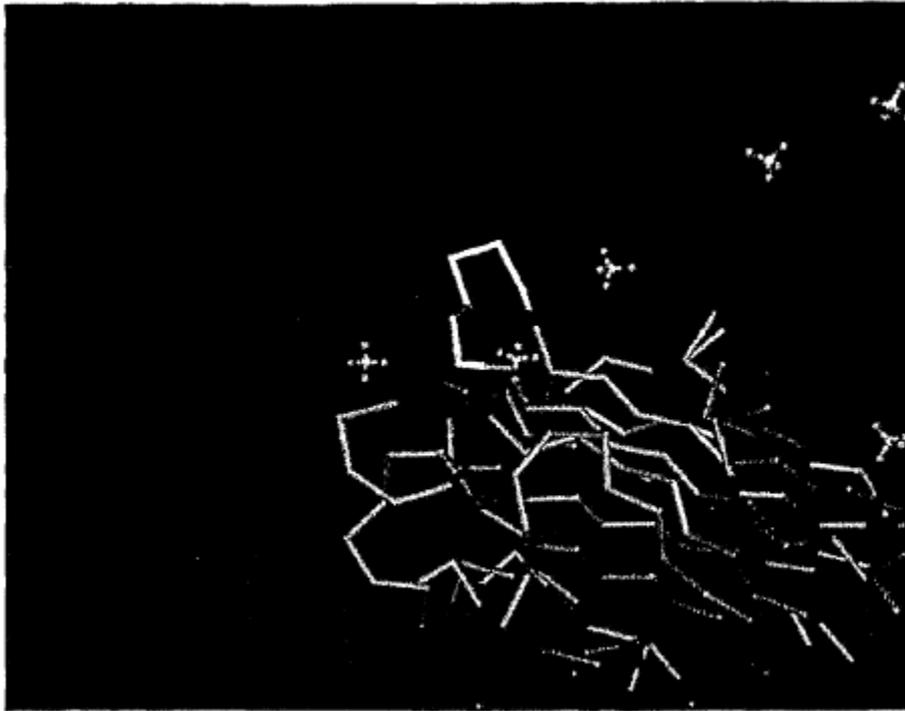


Figura 1: Cadena A de 1GWY, estructura cristalina del estado agua-S de la citolisina Sticholysin II formadora de poros

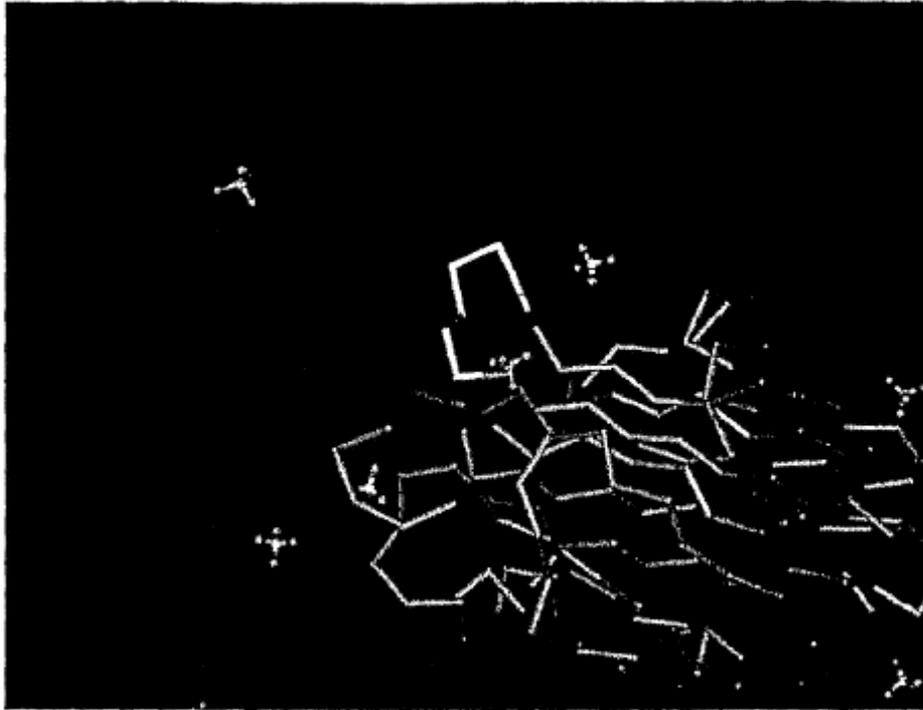


Figura 2: Cadena B de 1GWY, estructura cristalina del estado W de la citolisina Stichelysin II formadora de poros

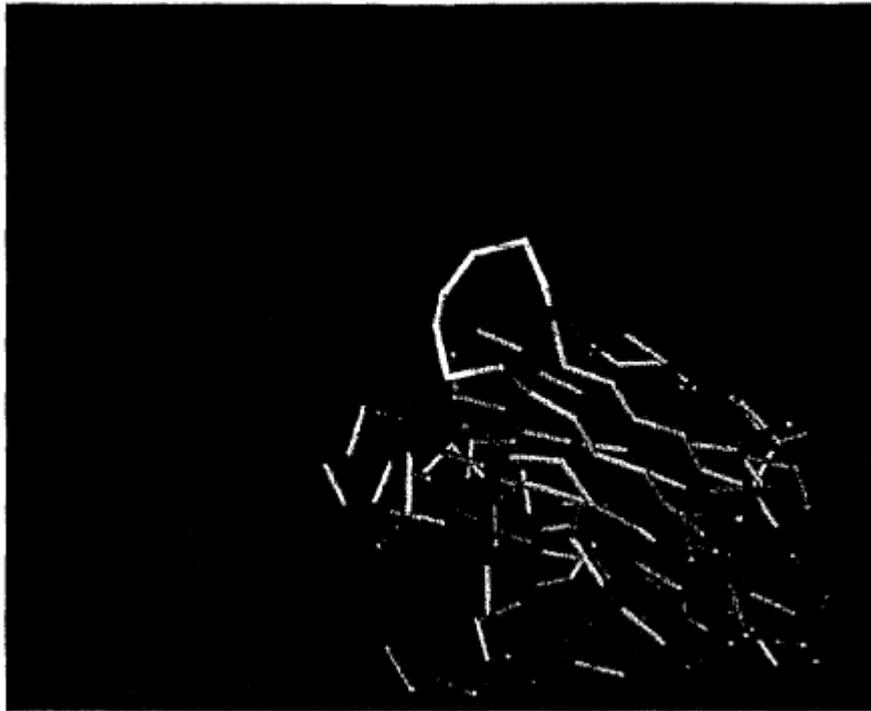


Figura 3: Cadena A de 1KD6, estructura en solución de la citolisina Equinatoxina II formadora de poros

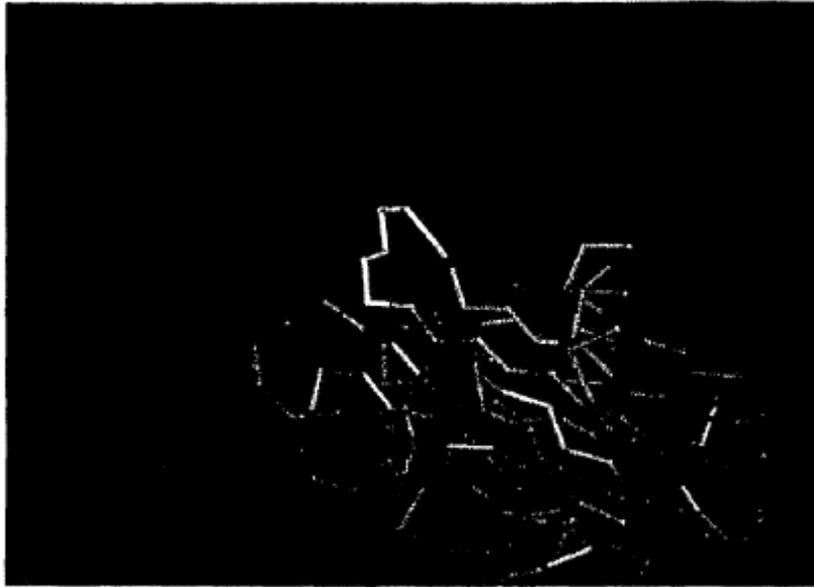
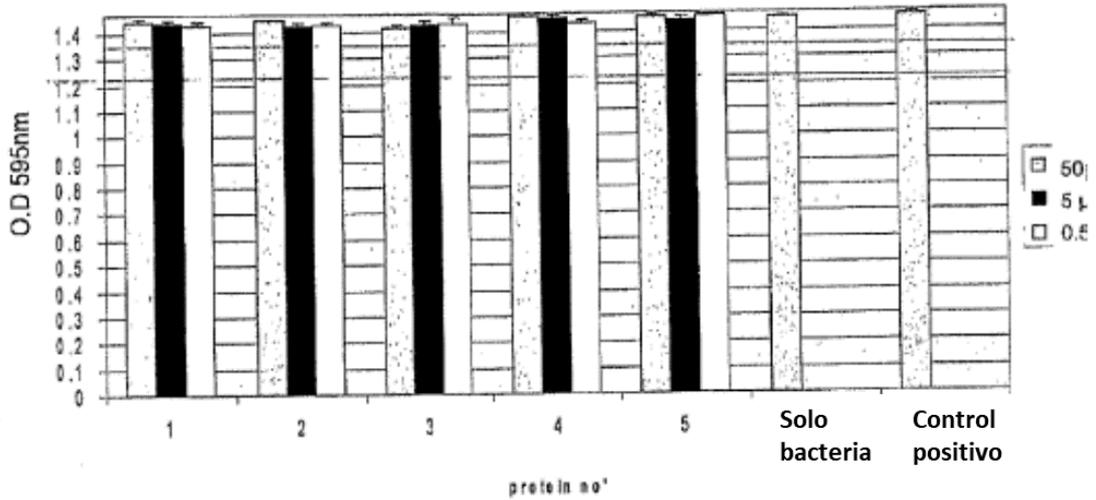


Figura 4: Cadena A de 1TZQ, estructura cristalina del mutante de doble cisteina de la Equinatoxin II 8-69

Figura 5

Crecimiento a 24 h de las Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



- 1- AbacZ-17C
- 2- AbacZ-17
- 3- AbacZ-16C
- 4- AbacZ-6
- 5- AbacZ-8C

Figura 6

Prevención de la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

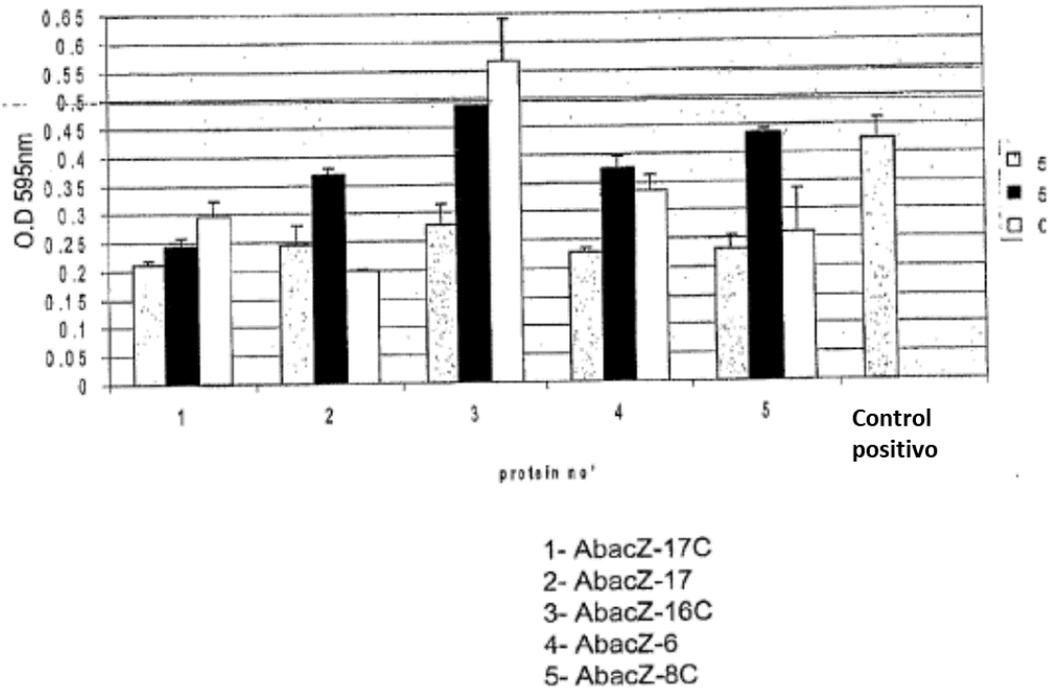


Figura 7

Crecimiento a 24 horas de *Acinetobacter Baumannii* (aislado clínico)

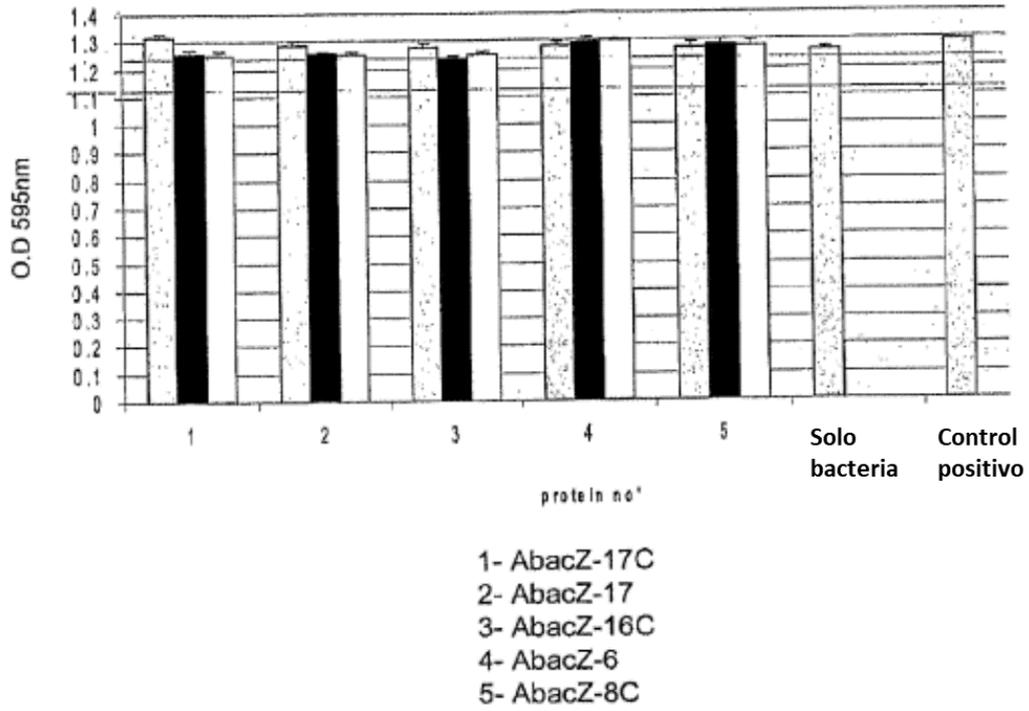
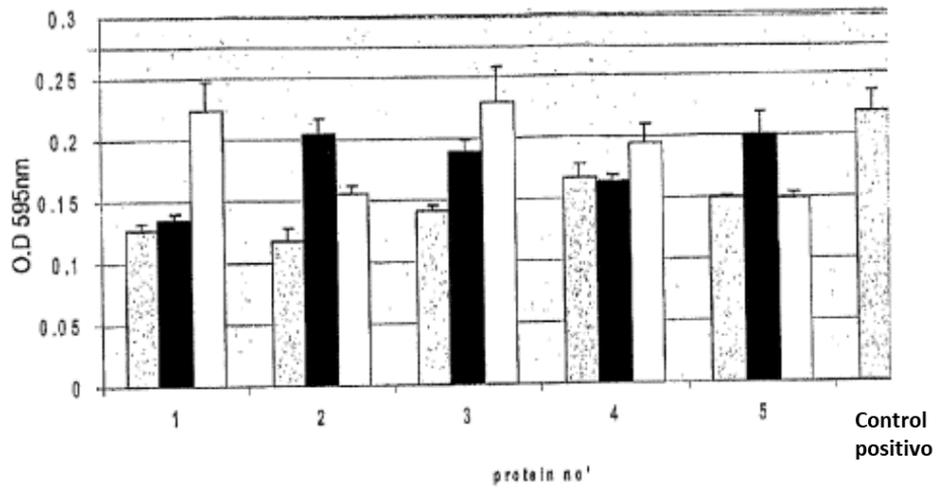


Figura 8

Prevención de la formación de biopelícula de *Acinetobacter Baumannii* (aislado clínico)



- 1- AbacZ-17C
- 2- AbacZ-17
- 3- AbacZ-16C
- 4- AbacZ-6
- 5- AbacZ-8C

Figura 9

Prevención de la formación de biopelículas en las fracciones equina de *Actinetobacter baumannii*

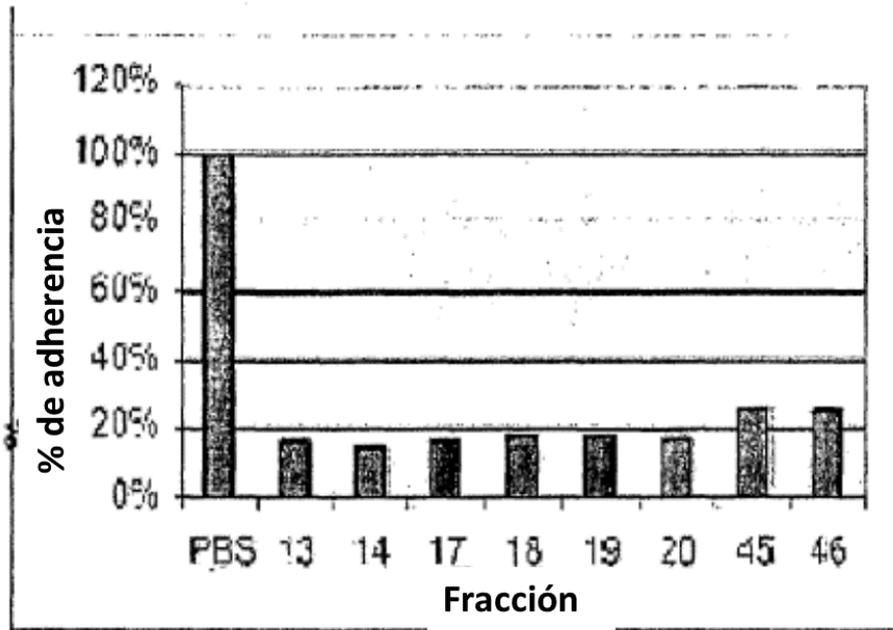
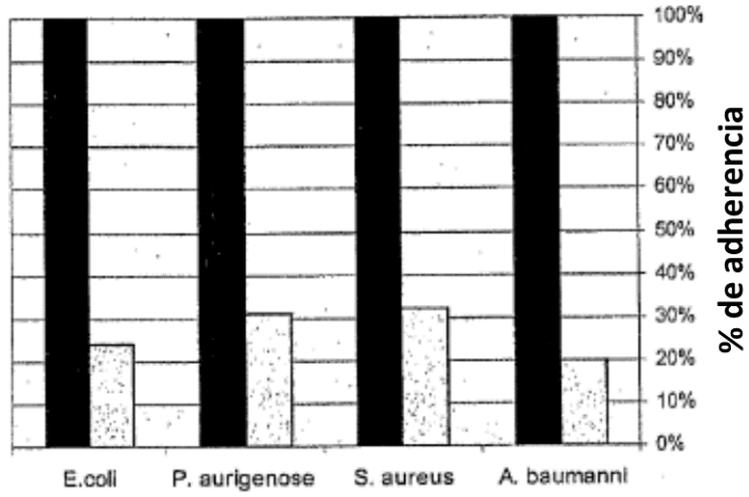


Figura 10

Prevención de la formación de biopelículas para la fracción 13



Prevención de la formación de biopelículas de *Anemonia*, *Aiptasia* y *Physcomitrella* (Musgo) de *Pseudomonas aeruginosa*

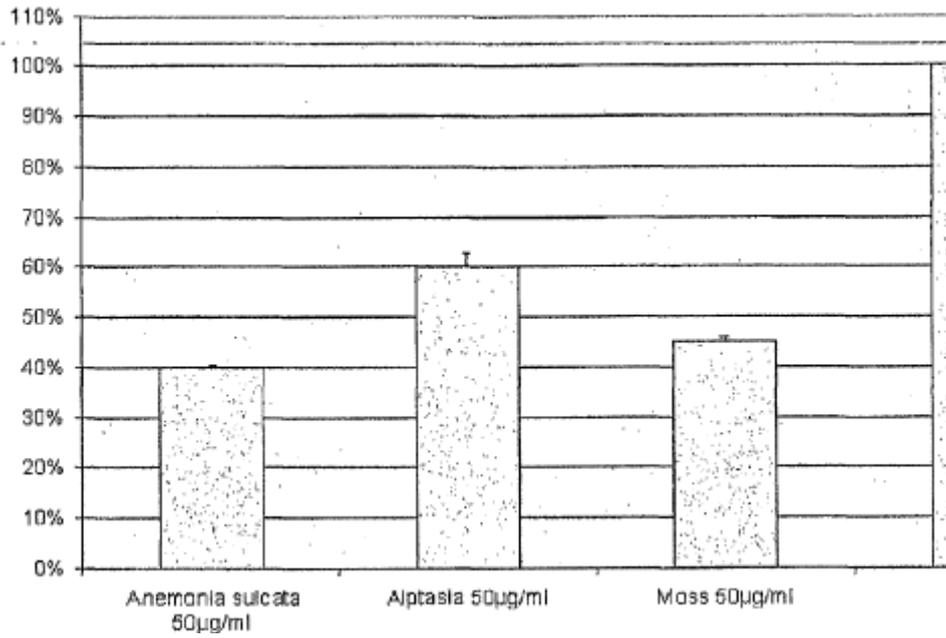
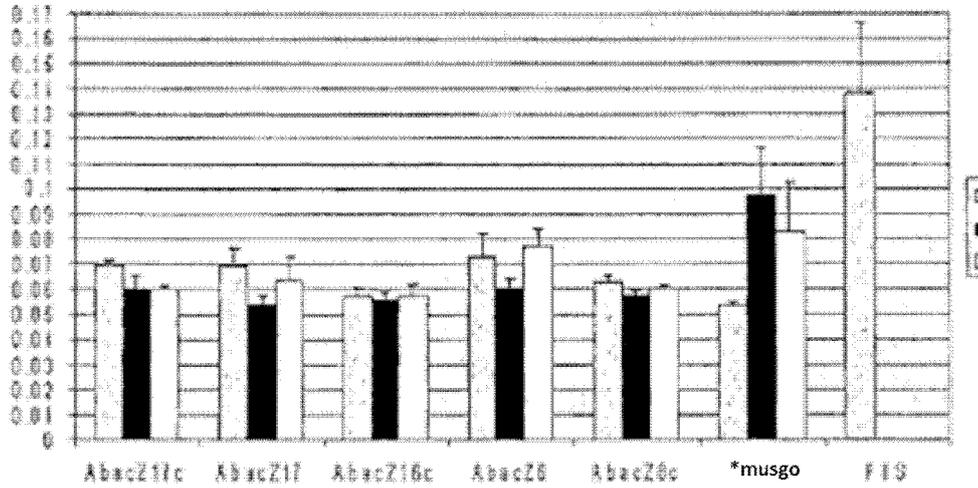


Figura 11

Figura 12

Ensayos de anti-adherencia con péptidos Abac Z y Musgo en S.a



*Las concentraciones de musgo son: 50 µg/ml, 5 µg/ml y 0,5 µg/ml

Figura 13

Fig. 8

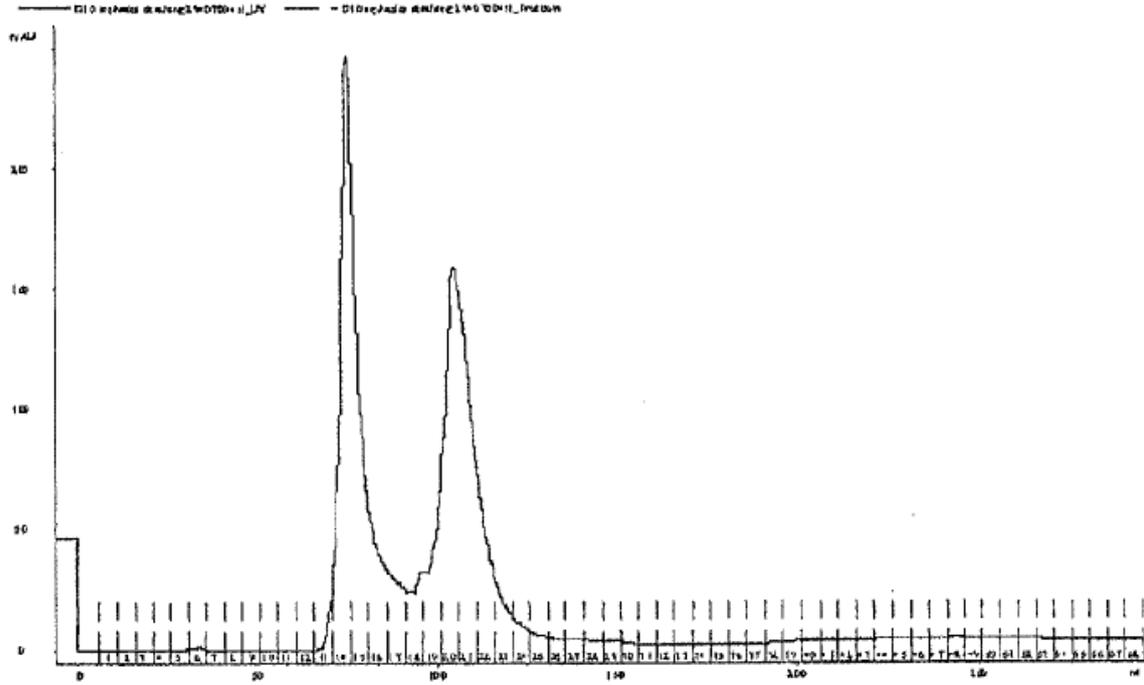


Figura 14

Fig. 9-

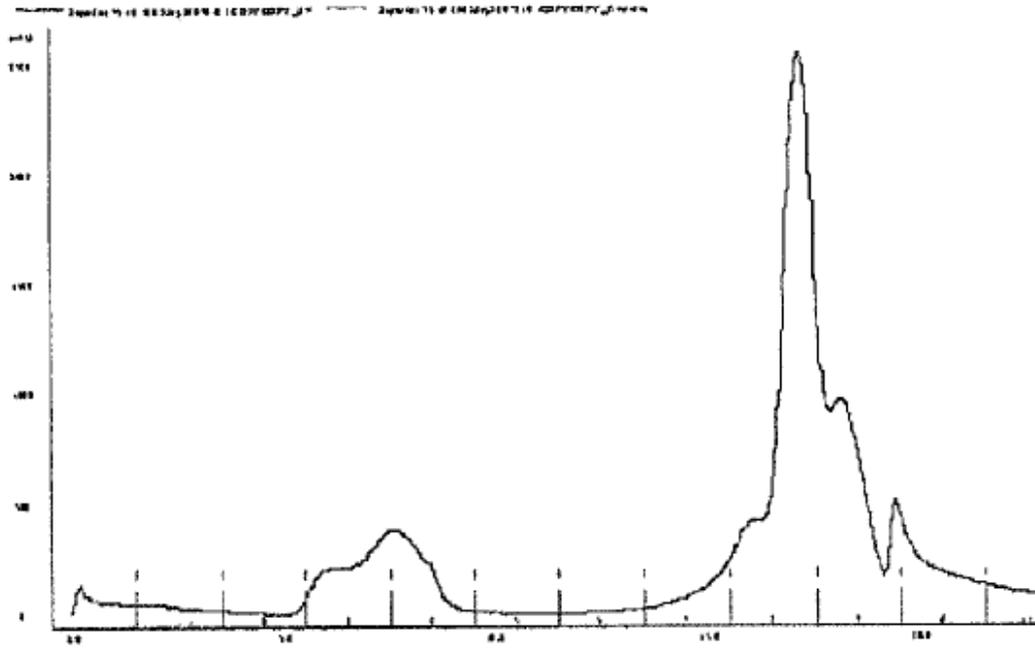


Figura 15

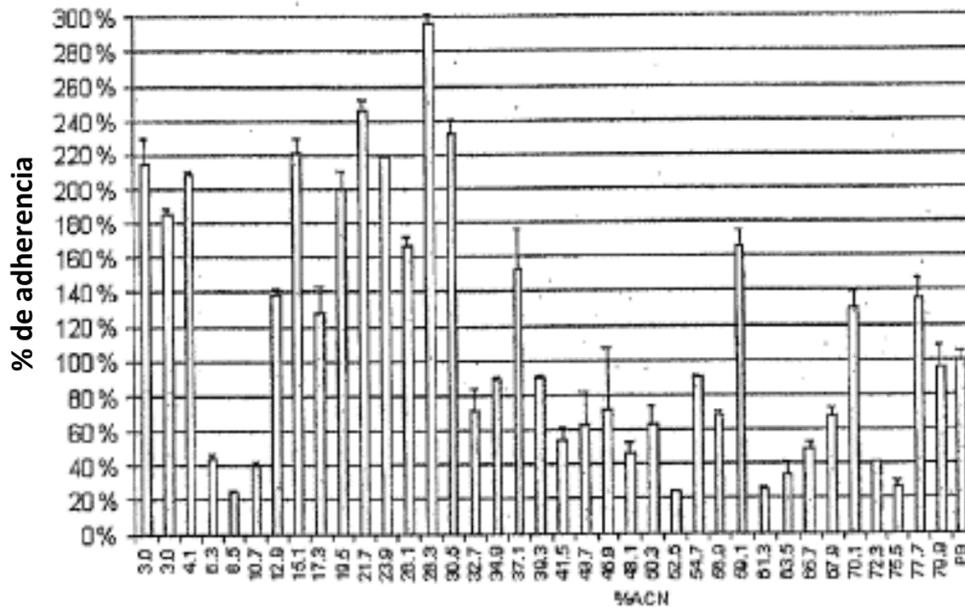
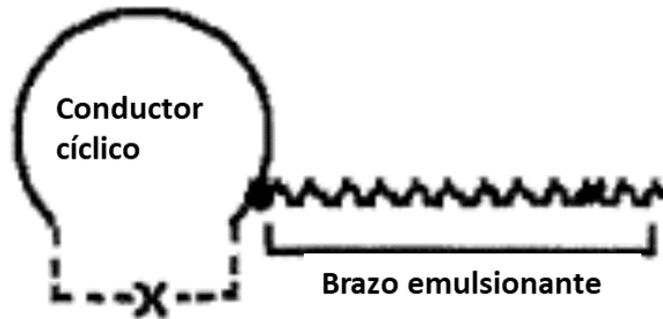
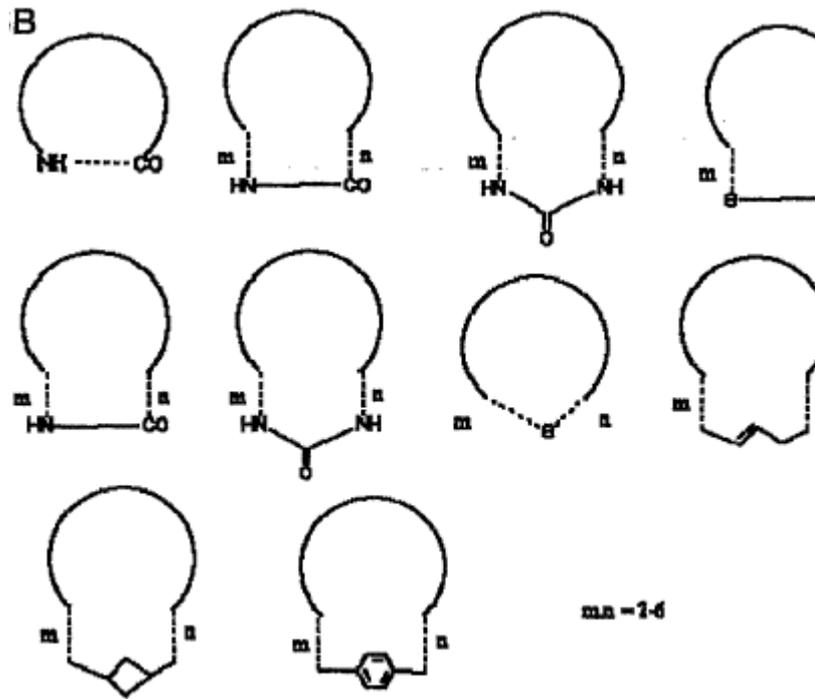


Figura 16A



Esquema 1. Estructura general del conductor cíclico con un brazo emulsionante

Figura 16B



Esquema 2. Estrategias de ciclación

Figura 17

DIAGRAMA DE FLUJO DEL DESARROLLO DE UN PÉPTIDO CÍCLICO CON BRAZO EMULSIONANTE

