República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020026557-8 A2

(22) Data do Depósito: 28/06/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 06/04/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MEDIAR EPS

(51) Int. Cl.: A61K 31/16; A61K 31/40; A61K 31/43; A61K 31/65; A61K 31/132; (...).

(30) Prioridade Unionista: 29/06/2018 US 62/692,581.

(71) Depositante(es): RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S HOSPITAL.

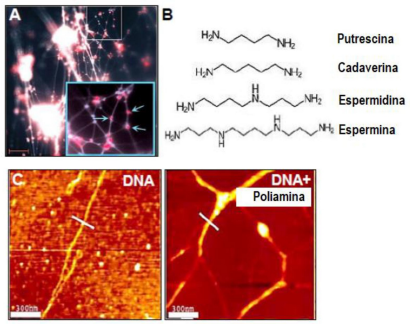
(72) Inventor(es): STEVEN DAVID GOODMAN; LAUREN OPREMCAK BAKALETZ.

(86) Pedido PCT: PCT US2019040008 de 28/06/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/006528 de 02/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 23/12/2020

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MEDIAR EPS. A divulgação se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendendo o contato do biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Também são fornecidos aqui métodos para tratar um biofilme em um sujeito, compreendendo administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Além disso, são descritos neste documento métodos para tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA em o biofilme ou seu ambiente local.



“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MEDIAR EPS”

REFERÊNCIA REMISSIVA A PEDIDOS CORRELATOS

RELATÓRIO DESCRITIVO

[0001] Este Pedido reivindica prioridade sob 35 U.S.C. § 119(e) do Pedido Provisório U.S. 62/692,581, depositado em 29 de junho de 2018, cujo conteúdo é incorporado por meio deste por referência em sua totalidade.

CAMPO

[0002] A presente divulgação geralmente se refere a métodos e composições para remover ou inibir a substância polimérica extracelular bacteriana (EPS).

FUNDAMENTOS

[0003] Os biofilmes desempenham um papel importante em ambientes médicos, agrícolas e industriais. Os biofilmes são responsáveis por grande parte das doenças, tanto animais como vegetais, bem como por incrustações de equipamentos industriais, e como tal são foco de intenso esforço de pesquisa. A erradicação ou tratamento de biofilmes é particularmente difícil de realizar devido a vários fatores, incluindo a produção de uma matriz extracelular que forma uma barreira física para efetores antimicrobianos, fisiologia alterada que é menos suscetível a estressores ambientais e interações cooperativas entre os constituintes do biofilme. A matriz do biofilme é variavelmente composta de polissacarídeos, proteínas e, talvez universalmente, DNA extracelular (eDNA). O eDNA de um biofilme microbiano é um constituinte crítico da matriz extracelular que fornece proteção. O enfraquecimento da estrutura do eDNA do biofilme, por meio da degradação do DNA ou da remoção das proteínas de ligação ao DNA que estabilizam a estrutura, resulta no colapso catastrófico do biofilme e na liberação da bactéria

residente em um estado mais vulnerável.

[0004] As bactérias são encontradas na natureza em dois estados distintos; as bactérias planctônicas têm vida livre, enquanto as bactérias que se desenvolvem em uma arquitetura de comunidade são chamadas de biofilmes (seja em uma superfície ou como agregados). O CDC e o NIH estimam que aproximadamente 80% de todas as infecções bacterianas envolvem um estado de biofilme necessário. Dongari-Bagtzoglou *et al.* (2008) Expert Rev Anti Infect Ther. 6(2):201-8. Estes incluem otite média (OM), rinossinusite crônica (CRS), infecções pulmonares crônicas, infecções crônicas de feridas, periodontite, cistite e infecções de implantes médicos e cateteres internos, entre muitos outros. De fato, um dos motivos mais comuns para procurar atendimento médico pediátrico é a OM [causada por *Haemphilus influenzae* não tipável (NTHI) *Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis*] e para adultos, cistite [por exemplo, *E. coli* Uropatogênica (UPEC)]; as prescrições de antibióticos são, portanto, as mais comuns para essas queixas. Nos Estados Unidos, estima-se que 500.000 mortes anualmente são atribuídas às consequências diretas das infecções do biofilme bacteriano. Os impactos econômicos são surpreendentes [$ 25B (bilhões) para feridas crônicas, $ 14B para periodontite, $ 5B para OM e $ 1B para cistite]. A prevalência mundial de doenças mediadas por biofilme, a taxa crescente de infecções bacterianas resistentes a antibióticos, particularmente entre os patógenos ESKAPE de alta prioridade (*Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecium*), e o grande fardo financeiro cria uma necessidade crítica de desenvolver novas abordagens para tratar infecções recalcitrantes causadas por comunidades bacterianas organizadas.

[0005] Assim, existe a necessidade de romper a barreira protetora de biofilmes para tratar ou matar as infecções bacterianas associadas e

eliminá-las das superfícies e dos sistemas de água.

SUMÁRIO

[0006] A matriz extracelular autoproduzida (ou substância polimérica extracelular, EPS) que protege as bactérias residentes nos biofilmes da eliminação imunológica e antimicrobianos é essencial para que os biofilmes patogênicos causem infecções crônicas e recorrentes, pois os biofilmes servem como reservatório recalcitrante dessas bactérias causadoras de doença. Os constituintes da EPS são específicos para espécies bacterianas individuais, mas contêm universalmente DNA extracelular (eDNA) derivado das bactérias residentes no biofilme. Na verdade, bactérias de gêneros variados normalmente entram em uma arquitetura de comunidade compartilhada de um biofilme multiespécie, o que requer que a EPS seja estruturalmente propícia para todas as espécies constituintes, mas também para conter componentes EPS derivados de, ou utilizáveis para, todas as bactérias residentes. A este respeito, a EPS de biofilmes de espécies únicas e múltiplas contém eDNA de andaimes que parecem ser a estrutura comum da EPS universal subjacente. Como aqui divulgado, os Requerentes descobriram que esta estrutura dependente de eDNA é estabilizada pela família DNABII ubíqua de proteínas de ligação a DNA bacterianas. Embora os Requerentes tenham demonstrado que as proteínas exógenas de DNA e DNABII podem conduzir bactérias de vida livre (planctônica) para a arquitetura da comunidade de um biofilme, esses dois componentes são insuficientes para recapitular o andaime de eDNA de assinatura.

[0007] Os requerentes divulgam aqui que as poliaminas são o terceiro componente crucial da EPS dependente de eDNA-DNABII universal. Poliaminas são moléculas orgânicas curtas carregadas positivamente ubíquas tanto intracelularmente quanto extracelularmente que, quando ligadas ao DNA, neutralizam a carga polianiônica de fosfatos de nucleotídeos e permitem que as moléculas de DNA se condensem/

agreguem. É importante ressaltar que os Requerentes divulgam aqui que as poliaminas podem conduzir o DNA da forma B para a direita mais comum para a forma Z para a esquerda, que é resistente à nuclease. Na verdade, embora as nucleases possam *prevenir a* formação de biofilme bacteriano, elas não podem *interromper* os biofilmes maduros. À medida que os biofilmes envelhecem, sua aquisição de resistência à nuclease é concomitante com (1) um aumento nas poliaminas e (2) o aparecimento da forma Z de DNA.

[0008] Descritos neste documento são métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente em, ou ainda consistindo em contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendem ou, alternativamente, consistem essencialmente em, ou ainda consistem ainda em um contato do biofilme com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Esta divulgação também se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste na essência ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de agente que elimina cátions, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme podem compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o

contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que depletam os cátions. O contato pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[0009] Em uma modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma quarta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo.

[0010] Ainda descritos neste documento são métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Esta divulgação também se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo

anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivados dos mesmos. O contato pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[0011] Também são aqui fornecidos métodos para tratar um biofilme em um sujeito, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina para o DNA no biofilme, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um sujeito compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme.

[0012] Esta divulgação também se refere a métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou, alternativamente, consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme.

[0013] Esta divulgação se refere ainda a métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme.

[0014] Para qualquer um dos métodos descritos acima, a poliamina pode ser selecionada do grupo de: putrescina, espermina, cadaverina, 1,3-diaminopropano ou espermidina. Em uma modalidade, para os métodos descritos acima, o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme é um tRNA. Em outra modalidade, o agente é um inibidor da síntese de poliamina ou um agente que inibe a ligação da poliamina ao DNA. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclo-hexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis[guanil-hidrazona] (MGBG), 1-amino-oxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina, diciclo-hexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos ou um sal dos mesmos. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente que depleta cátions do biofilme, opcionalmente, uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, um azacrown ou uma cripta. Em uma quarta modalidade, o agente que depleta cátions

do biofilme é selecionado do grupo de: sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, P11 fosfocelulose, sulfato de heparina ou um derivado ou análogo do mesmo. Em uma quinta modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em uma sexta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em uma oitava modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma nona modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga líquida negativa. Em outro aspecto, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga neutra.

[0015] Também são fornecidos aqui métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local são divulgados neste documento, em que o agente não é uma proteína

HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, os agentes são administrados na ausência de uma DNAse. Em uma modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma quarta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto, o derivado de cloroquina retém a capacidade de intercalar entre bases de DNA.

[0016] Métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo do mesmo e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo também são fornecidos aqui. Em um aspecto, o método para tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou tuberculose (TB), o método que compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Esta divulgação também se refere a métodos para tratar uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente recebendo ou tendo recebido a

quimioterapia compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, o método compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em um aspecto, os agentes são administrados na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto particular, o derivado de cloroquina retém a capacidade de intercalar entre bases de DNA. Ainda em um aspecto adicional, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em uma modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos.

[0017] Esta divulgação se refere ainda a métodos para o tratamento de uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo do mesmo e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Métodos para o tratamento de uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à

base de platina em um paciente recebendo ou tendo recebido a quimioterapia compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo também são fornecidos aqui.

[0018] Os métodos descritos acima podem compreender ainda, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em contatar o biofilme, ou alternativamente administrar ao sujeito, uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação do eDNA a uma ligação de DNA proteína e/ou um agente antibacteriano, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto, o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende, ou, alternativamente, consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU, ou fragmentos de cada um dos mesmos. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida negativa. Numa segunda modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga neutra. Em uma terceira modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva. Em um aspecto, os agentes são administrados na ausência de uma DNAse. Os métodos descritos acima podem ser realizados na ausência de administração de uma enzima DNAse.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0019] As **FIGS**. **1A - 1C: As poliaminas modulam a estrutura do DNA**. **(FIG**. **1A)** Imagem de microscopia de imunofluorescência de EPS do biofilme mucoso encontrado na orelha média de chinchila com OM aguda devido a NTHI (adaptada a partir de Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4 (6): 625-37). Sondado para proteínas DNABII (bolas cinza) e

eDNA (regiões brancas). DNABII localiza-se em vértices de fita de eDNA em biofilmes *in vivo*. **(FIG**. **1B)** Estrutura química de poliaminas comuns (adaptada a partir de Di Martino *et al.* (2013) Int J Med Microbiol. 303 (8): 484-91). **(FIG**. **1C)** Imagem de microscopia da força atômica de DNA sozinho ou DNA após incubação com poliaminas (adaptada a partir de Iacomino *et al.* (2011) Biomacromolecules. 12 (4): 1178-86). As poliaminas induzem a formação de fibras grossas e complexidade estrutural no eDNA.

[0020] As **FIGS**. **2A – 2B: Poliaminas induzem estrutura de andaime de eDNA**. **(FIG**. **2A)** Imagem de imunofluorescência CLSM do biofilme EPS da mucosa encontrado na orelha média de chinchila com OM aguda devido a NTHI. Sondado para poliaminas (pontos brancos) [putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermidina (Spd)] e eDNA (branco), contrastado com DAPI (regiões cinzas). As poliaminas localizam-se em fitas de eDNA em biofilmes que foram formados *in vivo*; a espermidina é a poliamina de maior prevalência no biofilme EPS. **(FIG**. **2B)** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de complexos de DNA (5 μM) e espermidina (700 μM) (superior) e DNA (5 μM), espermidina (700 μM) e HU (50 nM) (inferior) (adaptado a partir de Sarkar *et al.* (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951 61). Estruturas semelhantes são formadas por complexos DNA-poliamina-IHF. Sarkar *et al.* (2009) Biochemistry. 48(4):667-75. As poliaminas induzem a condensação do DNA e se combinam com as proteínas DNABII para formar fibras grossas.

[0021] As **FIGS**. **3A – 3C: O Inibidor da síntese de poliamina reduz a formação de biofilme**. **(FIG**. **3A)** Quantificação COMSTAT de biofilmes NTHI corados LIVE/DEAD® cultivados na presença de diciclohexilamina (DCHA, 50 μM), um inibidor de espermidina (Spd) sintase, Spd (1 mM) ou ambos. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P <0,05. A espessura média dos biofilmes foi diminuída pelo DCHA,

enquanto a adição simultânea de Spd exógeno restaurou a formação do biofilme. **(FIG**. **3B)** Imagens de microscopia de imunofluorescência da estrutura de andaime de eDNA em biofilmes NTHI *in vitro* cultivados por 3h na presença de DCHA (50 µM). Sondado para dsDNA (regiões brancas). A produção da estrutura de andaime de eDNA é bastante reduzida pela inibição da síntese de poliamina. **(FIG**. **3C)** Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes *in vitro* de NTHI cultivados por 40h na presença de DCHA. Sondado para Spd (pontos brancos no painel inferior da **FIG**. **3C**) e contrastado com DAPI (regiões cinza). O DCHA inibe a incorporação de poliamina no biofilme EPS.

[0022] As **FIGS**. **4A – 4B: Anti-DNABII interrompe estruturas dependentes de DNABII-poliamina (PA)**. **(FIG**. **4A)** Estruturas de DNA foram formadas pela incubação de espermidina (300 µM) e HU (1 µM) em tampão que continha DNA genômico (gDNA; 2 µg/ml) por 40h. Imagens de **imunofluorescência** CLSM de estruturas de DNA dependentes de DNABII-poliamina. Sondado para proteínas DNABII (branco; indicado no lado direito da imagem) e contrastado com DAPI (branco; indicado no lado esquerdo da imagem). As estruturas de DNA dependentes de poliamina DNABII incorporam proteínas DNABII. **(FIG**. **4B)** Estruturas EPS foram formadas como na **(FIG**. **4A)** por 24h e tratadas por 16h adicionais com diluição de 1:50 de anti-soro DNABII (indicado abaixo da imagem). Imagens de fluorescência CLSM coradas com DAPI (branco). Estruturas de DNA dependentes de DNABII-poliamina requerem proteínas DNABII.

[0023] A **FIG**. **5: O trocador de cátions fosfocelulose (P11) interrompe a formação de biofilme NTHI**. O crescimento do biofilme NTHI foi iniciado na câmara basolateral de um sistema de placa transwell, enquanto P11 (1%) foi adicionado à câmara apical. Espermidina (1 mM) e HU (1 µM) foram adicionados na semeadura e mantidos por 16h. Os biofilmes foram visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. A espessura média (não mostrada) mostrou tendências idênticas. Barras

representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, * P <0,05; ** P <0,01. P11 impede a formação de biofilme. Espermidina exógena e HU juntos restauram o desenvolvimento do biofilme, mas não por si só (não mostrado), o que sugere que a atividade do antibiofilme P11 é o resultado da titulação de componentes estruturais (poliaminas e proteínas DNABII) do EPS do biofilme.

[0024] A **FIG**. **6: Biofilmes maduros são resistentes à ruptura por DNase**. DNase (Pulmozyme; 5 unidades) foi adicionada na semeadura (prevenção) ou em 24h (interrupção) aos respectivos biofilmes NTHI e UPEC pré-formados *in vitro*. Após um total de 40h, os biofilmes foram corados com LIVE/DEAD®, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01. A DNase pode prevenir, mas não interromper os biofilmes existentes.

[0025] As **FIGS**. **7A – 7D: As proteínas DNABII e as poliaminas (PAs) interagem sinergicamente para induzir resistência à DNase**. **(FIG**. **7A)** Imagens de imunofluorescência CLSM de NTHI *in vitro* biofilmes cultivados por 40h. Sondado para espermidina (bolas cinza escuras), HU (bolas cinza claro) e contrastado com DAPI (regiões cinza). Poliaminas e proteínas DNABII co-localizam em biofilme EPS *in vitro* (bolas brancas). **(FIG**. **7B)** Imagem de imunofluorescência CLSM do biofilme EPS da mucosa encontrado na orelha média de chinchila com OM aguda devido a NTHI. Sondado para putrescina (bolas brancas) e HU (bolas cinza claro), contrastado com DAPI (regiões cinza escuro). Poliaminas e proteínas DNABII co-localizam em fitas de eDNA em biofilmes *in vivo* (regiões brancas). **(FIG**. **7C)** Níveis crescentes de espermidina (Spd) e HU, separadamente ou juntos, foram incubados com DNA genômico (2 µg/ml) por 1,5h a 37 ºC, seguido por tratamento com Pulmozyme® por 20 min.

A degradação do DNA foi avaliada usando eletroforese em gel de agarose. Spd e HU protegem sinergicamente o DNA genômico da digestão com DNase. **(FIG**. **7D)** Spd (300 μM) e HU (1 μM) foram incubados com DNA genômico (2 μg/ml) por 40h, seguido por tratamento com Pulmozyme® por 20 min. As estruturas foram coradas com LIVE/DEAD® e fotografadas com CLSM (branco). As estruturas de DNA dependentes de HU-Spd são resistentes ao tratamento com DNase.

[0026] As **FIGS**. **8A – 8B: O DNABII e as poliaminas combinam-se para converter a forma B- em ZDNA**. **(FIG**. **8A)** Estruturas de DNA dependentes de DNABII-poliamina foram formadas incubando DNA genômico (2 μg/ml) com HU (1 μM) e espermidina (300 μM) por 16h. Imagens de imunofluorescência CLSM de estruturas de DNA dependentes de DNABII-poliamina. Sondado para Z-DNA (branco) e corado com DAPI (cinza escuro). As poliaminas e as proteínas DNABII se sinergizam para induzir a conversão de B- para Z-DNA. (FIG. 8B) Topo: Espectro de dicroísmo circular de um substrato B-DNA sendo convertido em Z-DNA aumentando as concentrações do catalisador Z-DNA (adaptado de Jang *et al.* (2015) Sci Rep. 5: 9943). Observe a inversão do pico negativo em torno de 250 nm e o pico positivo em torno de 280 nm. Embaixo: DNA de poli (dGdC) (20 μg/ml) foi incubado com HU (15 μM) por 2h e os espectros de CD coletados. HU muda o espectro de CD de poli (dGdC) para uma assinatura de Z-DNA.

[0027] A **FIG. 9: O Z-DNA está presente no biofilme EPS de vários patógenos humanos**. **Superior:** Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes de 40h das bactérias indicadas, sondadas sem anticorpo primário (N.º 1º) ou com anticorpo Z-DNA (branco). Z-DNA é um componente do EPS de vários biofilmes bacterianos em diferentes níveis de estado estacionário. **Inferior:** Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos HU (branco) e espermidina (cinza escuro), a co-localização é (branco). Os componentes

DNABII e poliamina co-localizam no EPS de vários biofilmes bacterianos em níveis de estado estacionário que se correlacionam com a abundância de Z-DNA.

[0028] A **FIG**. **10: Z-DNA e poliaminas aumentam em abundância conforme os biofilmes UPEC e NTHI amadurecem**. Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes *in vitro* UTI89 e NTHI em vários estágios de formação, sondados com anti-Z-DNA (branco) ou anti-espermidina (cinza escuro). Biofilmes maduros incorporam uma quantidade crescente de Z-DNA (branco) e espermidina (cinza escuro) no biofilme EPS ao longo do tempo.

[0029] A **FIG**. **11: HU é necessário para conversão de B- para Z-DNA e incorporação de poliaminas no biofilme EPS**. Imagens de imunofluorescência CLSM de 40h NTHI de tipo selvagem e o mutante ΔHU em biofilmes *in vitro*, sondados com espermidina (cinza escuro) ou anti-Z-DNA (branco). Na ausência de HU, as poliaminas e o Z-DNA diminuem em abundância no biofilme EPS.

[0030] A **FIG**. **12:** Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados por 40h em meio BHI suplementado em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37 ºC e 5% de CO_2. Os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários indicados, um anticorpo secundário fluorescente (pontos cinza escuros) e corados com DAPI (regiões cinza). Nota: a coloração cinza escuro mínima na imagem inferior à esquerda representa o fundo. Putrescina, espermidina e espermina estavam presentes em toda a matriz do biofilme.

[0031] A **FIG**. **13:** *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados por 16h em meio BHI suplementado contendo aditivos como indicado acima em placas de 96 poços a 37 ºC e 5% de CO_2. O crescimento foi quantificado por absorbância espectrofotométrica a 490 nm (esquerda) e por enumeração de unidades formadoras de colônia (direita). O inibidor

da espermidina sintase não afetou o crescimento normal.

[0032] A **FIG**. **14:** Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados por 40h em meio BHI suplementado contendo aditivos como indicado abaixo de cada barra em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37 ºC e 5% de CO_2. Os biofilmes foram lavados, corados com LIVE/DEAD®, fixados e fotografados por CLSM. Os parâmetros do biofilme foram quantificados usando o software COMSTAT. A diciclohexilamina inibiu a biogênese do biofilme, enquanto a espermidina exógena foi capaz de resgatar o crescimento do biofilme.

[0033] A **FIG**. **15:** Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados por 40h em meio BHI suplementado contendo aditivos como indicado acima em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37 ºC e 5% de CO_2. Os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários direcionados à espermidina, um anticorpo secundário fluorescente (pontos cinza escuro) e corados com DAPI (regiões cinza). O inibidor da espermidina sintase reduziu a presença da espermidina na matriz do biofilme.

[0034] A **FIG**. **16:** *Haemophilus influenzae* não tipáveis aderidos à superfície foram cultivados por 3h em meio BHI suplementado contendo aditivos como indicado acima em placas de lamínulas Fluorodish a 37ºC e 5% de CO_2. Os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários direcionados ao DNA de fita dupla e um anticorpo secundário fluorescente (branco). O inibidor da espermidina sintase reduziu tanto a presença quanto a complexidade da estrutura extracelular do DNA dentro da matriz do biofilme.

[0035] As **FIGS**. **17A – 17D: A espermidina está presente no biofilme EPS formado por vários patógenos humanos**. (**FIG**. **17A**). Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos HU (cinza claro) e espermidina (cinza escuro), a co-localização

é branca. Os componentes DNABII e poliamina co-localizam no EPS de vários biofilmes bacterianos em níveis de estado estacionário. **(FIG**. **17B)** A inibição da biossíntese de espermidina por diciclohexilamina (DCHA) reduz os níveis de espermidina nos biofilmes NTHI e UPEC indicados por uma diminuição no sinal IF e resulta em uma espessura média significativamente diminuída em comparação com o controle de sBHI **(FIG**. **17C)**. UPEC representado como alteração percentual da espessura média em comparação com o controle LB **(FIG**. **17D)**.

[0036] As **FIGS**. **18A – 18B: A fosfocelulose tem um efeito negativo dependente da dose na formação do biofilme e na estabilidade do biofilme NTHI pré-formado *in vitro***. (**FIG**. **18A**) O crescimento do biofilme foi iniciado e mantido por 24 horas e depois tratado por 16 horas com 0 (controle SBHI), 0,1%, 1% e 5% (p/v) de Fosocelulose (P11). **(FIG**. **18B)** O crescimento do biofilme foi iniciado e então mantido por 40 horas na presença de 0 (Controle de sBHI), 0,1%, 1% e 5% (p/v) de (P11). Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X.

[0037] A **FIG**. **19: A heparina-sepharose tem um efeito negativo na formação de biofilme NTHI *in vitro***. O crescimento do biofilme foi iniciado e então mantido por 40 horas na presença de 0 (controle de sBHI) ou 5% (p/v) de resina de heparina-sepharose. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X.

[0038] A **FIG**. **20: A adição exógena de HU resgata o efeito negativo da fosfocelulose na estabilidade do biofilme NTHI *in vitro***. O crescimento do biofilme foi iniciado e mantido por 24 horas, depois tratado por 16 horas, conforme indicado. Os biofilmes foram lavados com

solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa e comparadas com o controle sBHI. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01.

[0039] A **FIG**. **21: A adição exógena de $MgCl_2$ resgata o efeito negativo da fosfocelulose na estabilidade do biofilme NTHI *in vitro***. O crescimento do biofilme foi iniciado e mantido por 24 horas, em seguida, tratado por 16 horas, conforme indicado. Os biofilmes foram lavados com solução salina e machados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X.

[0040] A **FIG**. **22: A adição exógena de espermidina resgata o efeito negativo da fosfocelulose na estabilidade do biofilme NTHI *in vitro***. O crescimento do biofilme foi iniciado e mantido por 24 horas, em seguida, tratado por 16 horas, conforme indicado. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X.

[0041] A **FIG**. **23: Os efeitos de depleção de cátions da fosfocelulose P11 não requerem contato direto com o biofilme**. O crescimento do biofilme foi iniciado na câmara basolateral de um sistema de placa transwell enquanto 0, 0,5, 1 ou 1,5% (p/v) de fosfocelulose P11 foi adicionado à câmara apical e foi mantida por 16 horas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa e foram comparadas com o controle sBHI. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X. Barras representam

o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01.

[0042] A **FIG**. **24: A adição exógena de espermidina reduz os efeitos de depleção de cátions da fosfocelulose P11 sem a necessidade de contato direto com o biofilme**. O crescimento do biofilme foi iniciado na câmara basal de um sistema de placa transwell enquanto 0 ou 1,5% (p/v) de P11 Fosfocelulose foi adicionada à câmara apical e foi mantida por 16 horas na presença de 100, 500 ou 1000 uM de biofilmes espermidina foram lavados com solução salina e corada com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa e foram comparadas com o controle sBHI. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01. Os colchetes indicam comparação estatística entre as condições.

[0043] A **FIG**. **25: A adição exógena de espermidina e DNABII reduz os efeitos de depleção de cátions da fosfocelulose P11 sem contato direto com o biofilme**. O crescimento do biofilme foi iniciado na câmara basolateral de um sistema de placa transwell enquanto 0 ou 1,5% (p/v) de fosfocelulose P11 foi adicionada à câmara apical e foi mantida por 16 horas na presença de espermidina 100 uM ou HU 500 nM ou em combinação. Os biofilmes foram lavados com solução salina e machados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa e foram comparadas com o controle sBHI. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01. Os colchetes indicam comparação estatística entre as condições.

[0044] As **FIGS**. **26A – 26B: O revestimento de superfícies abióticas com resina de troca catiônica evita a formação de biofilme de maneira dependente da dose**. As lâminas da câmara foram revestidas com soluções de fosfocelulose P11 **(FIG**. **26A)** ou heparina-sepharose **(FIG**. **26B)** conforme indicado. O crescimento do biofilme foi iniciado e mantido por 40 horas em lâminas revestidas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com coloração LIVE/DEAD®. As imagens foram analisadas pelo COMSTAT para calcular a espessura média e a biomassa. Todas as imagens foram capturadas com uma objetiva de 63X. Barras representam o SEM.

[0045] A **FIG**. **27: Biofilmes maduros são resistentes à ruptura por DNase**. DNase (Pulmozyme; 5 unidades) foi adicionada na semeadura (prevenção) ou em 24h (interrupção) aos respectivos biofilmes pré-formados NTHI ou UPEC *in vitro*. Após um total de 40h, os biofilmes foram corados com LIVE/DEAD®, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. Tendências semelhantes foram observadas para a biomassa. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t não pareados, *P<0,05; **P<0,01. A DNase pode prevenir, mas não interromper os biofilmes existentes.

[0046] A **FIG**. **28: Z-DNA e poliaminas aumentam em abundância conforme os biofilmes UPEC e NTHI amadurecem**. Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes UPEC e NTHI formados *in vitro* em vários estágios de maturação, sondados com anti-Z-DNA (cinza claro) ou anti-espermidina (cinza escuro). Biofilmes maduros incorporam uma quantidade crescente de Z-DNA (cinza claro) e espermidina (cinza escuro) dentro do EPS do biofilme ao longo do tempo.

[0047] A **FIG**. **29: Z-DNA está presente em biofilmes fúngicos patogênicos maduros**. Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes formados por *Candida albicans in vitro*, contrastados com DAPI e sondados com anti-B-DNA, anti-Z-DNA ou sem primário (cinza claro).

Biofilmes fúngicos maduros incorporam Z-DNA (cinza claro) no biofilme EPS.

[0048] A **FIG**. **30: Anticorpos Anti-Z-DNA estimulam a biogênese do biofilme**. Anticorpos anti-Z-DNA (1 mg) foram adicionados aos biofilmes NTHI *in vitro* na semeadura. Após 16h, os biofilmes foram corados com LIVE/DEAD®, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. Tendências semelhantes foram observadas para a biomassa. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t pareados. Os anticorpos Anti-Z-DNA estabilizam a matriz extracelular do biofilme, estimulando a biogênese do biofilme, enquanto os anticorpos para B-DNA (por exemplo, anti-dsDNA) não estimulam a biogênese do biofilme.

[0049] A **FIG**. **31: A DNase degrada o B-DNA**, **mas não o Z-DNA**, **dentro da matriz extracelular do biofilme**. DNase (Pulmozyme; 5 unidades) foi adicionada 24h após a semeadura do biofilme em biofilmes NTHI pré-formados *in vitro*. Após um total de 40 h, os biofilmes foram sondados com anti-Z-DNA, anti-B-DNA ou sem anticorpos primários, que foram revelados pelo uso de anticorpos fluorescentes secundários correspondentes e visualizados via CLSM. O tratamento com DNase degrada estruturas de eDNA da forma de B-DNA, mas revela extensa forma de eDNA de Z-DNA dentro da matriz extracelular do biofilme.

[0050] A **FIG**. **32: A formação de Z-DNA protege o DNA da degradação da nuclease**. Um substrato poli(dG-dC) foi incubado com nuclease ativada por sal (SAN) ou DNase I em concentrações crescentes de NaCl, espermina ou espermidina como indicado acima. Os produtos de degradação foram visualizados por eletroforese em gel. O alto teor de sal e as poliaminas protegem o DNA da degradação por meio da conversão para a forma Z-DNA.

[0051] A **FIG**. **33: Proteínas DNABII e poliaminas co-localizam dentro**

da matriz extracelular do biofilme. Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados em meio BHI suplementado em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37 ºC e 5% de CO_2. Os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários contra proteínas DNABII (cinza claro) ou poliaminas (cinza escuro), um anticorpo secundário fluorescente, corados com DAPI (regiões cinza) e visualizados por microscopia de fluorescência. Poliaminas co-localizadas com HU, mas não com IHF na matriz do biofilme. Uma cepa NTHI incapaz de produzir HU reduziu o acúmulo de poliaminas na matriz do biofilme. As proteínas DNABII e as poliaminas interagem para estabilizar a matriz extracelular do biofilme.

[0052] As **FIGS**. **34A – 34B: As proteínas DNABII protegem o DNA mudando para a forma Z-DNA**. **(FIG**. **34A)** Um substrato poli(dG-dC) foi incubado com DNase I em concentrações crescentes de NTHi HU como indicado acima. Os produtos de degradação foram visualizados por eletroforese em gel. HU protegeu o DNA da degradação. **(FIG**. **34B)** Superior: Espectro de dicroísmo circular de um substrato B-DNA sendo convertido em Z-DNA aumentando as concentrações de um catalisador Z-DNA (adaptado de Rahmouni (1992) Mol Microbiol. 6(5):569-72.) Observe a inversão do pico negativo em torno de 250 nm e o pico positivo em torno de 280 nm. Inferior: DNA de poli(dGdC) (5 μg) foi incubado com HU (15 μM) por 2h e espectros de CD coletados. HU muda o espectro de CD de poli(dGdC) em direção a uma assinatura de Z-DNA.

[0053] As **FIGS**. **35A – 35D: As proteínas DNABII e as poliaminas (PAs) interagem sinergicamente para induzir a resistência à DNase**. **(FIG**. **35A)** Níveis crescentes de espermidina (Spd) e HU, separadamente ou em conjunto, foram incubados com DNA genômico (gDNA; 2 μg/ml) por 1,5h a 37 ºC, seguido de tratamento com Pulmozyme® por 20 min. A degradação do DNA foi avaliada usando eletroforese em gel de agarose. Spd e HU protegem sinergicamente o DNA genômico da digestão com

DNase. **(FIG. 35B)** Spd (300 µM) e HU (1 µM) foram incubados com DNA genômico (2 µg/ml) por 40 h, seguido por tratamento com Pulmozyme® por 20 min. As estruturas foram coradas com LIVE/DEAD® e fotografadas com CLSM (branco). **(FIG. 35C)** Imagem de imunofluorescência CLSM do biofilme EPS da mucosa encontrado na orelha média de chinchila com MO experimental devido a NTHI. Sondado para putrescina (cinza escuro) e HU (cinza claro), contrastado com DAPI (cinza). As estruturas de DNA dependentes de HU-Spd são resistentes ao tratamento com DNase. Poliaminas e proteínas DNABII co-localizam em fitas de eDNA em biofilmes *in vivo* (branco). **(FIG. 35D):** Concentrações crescentes de DNase foram adicionadas por 16h na semeadura (Prevenção) ou em 24h (Ruptura) a biofilmes NTHI ou UPEC. Os biofilmes foram corados, fixados, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle (sem DNase) foi avaliada por testes t não pareados, **P<0,01. A DNase pode prevenir a formação de, mas não interromper os biofilmes existentes.

[0054] A **FIG. 36: O Z-DNA está presente no biofilme EPS de vários patógenos humanos**. Superior: Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes de 40h formados pela bactéria indicada, sondados sem anticorpo primário (N.º 1º) ou com anticorpo específico para Z-DNA (cinza claro). Z-DNA é um componente do EPS de vários biofilmes bacterianos em diferentes níveis de estado estacionário. Inferior: Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos HU (cinza claro) e espermidina (cinza escuro), a co-localização é (branco). Os componentes DNABII e poliamina co-localizam no EPS de vários biofilmes bacterianos em níveis de estado estacionário que se correlacionam com a abundância de Z-DNA.

[0055] A **FIG. 37: HMGB1 desestabiliza estruturas Z-DNA na matriz extracelular do biofilme**. Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis

foram cultivados em meio BHI suplementado em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37ºC e 5% de CO_2. Após 24h, os biofilmes foram tratados conforme indicado acima. Após 40h, os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários dirigidos contra Z-DNA (pontos cinza claro), um anticorpo secundário fluorescente, corados com DAPI (regiões cinza) e visualizados por microscopia de fluorescência. O tratamento com HMGB1 reduziu as estruturas de Z-DNA na matriz do biofilme.

[0056] As **FIGS**. **38A – 38C: HMGB1 desloca proteínas DNABII**, **interrompendo biofilmes NTHI**. Biofilmes *Haemophilus influenzae* não tipáveis foram cultivados em meio BHI suplementado em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37ºC e 5% de CO_2. Após 24h, os biofilmes foram tratados conforme indicado. **(FIG**. **38A)** Após 40h, os biofilmes foram lavados, sondados com anticorpos primários direcionados contra proteínas DNABII (pontos cinza claro), um anticorpo secundário fluorescente, corados com DAPI (regiões cinza) e visualizados por meio de microscopia de fluorescência. **(FIG**. **38B)** O meio de culturas de biofilme foi coletado e analisado via Western blot com um anticorpo primário que reconhece proteínas DNABII. O tratamento com HMGB1 deslocou as proteínas DNABII da matriz do biofilme. **(FIG**. **38C)** Quantificação COMSTAT de biofilmes NTHI corados com LIVE/DEAD® e visualizados com microscopia confocal após tratamento com 5 mg/mL de HMGB1. HMGB1 interrompe biofilmes, deslocando proteínas DNABII.

[0057] As **FIGS**. **39A – 39B: HMGB1 promove resolução de biofilme em um modelo experimental (hospedeira chinchila) de OM**. Diluente ou 5 µg de rHMGB1 ou mHMGB1 foram entregues diretamente às orelhas médias de chinchilas 4 e 5 dias após a infecção com NTHI. Os animais foram sacrificados 24h mais tarde, e suas orelhas médias foram fotografadas **(FIG**. **39A)** e pontuadas às cegas **(FIG**. **39B)** com base nos critérios descritos na parte inferior de **(FIG**. **39A)**. Barras representam

SEM. ***P<0,001. As imagens e a pontuação demonstram que o HMGB1 promoveu a eliminação de biofilmes NTHI pré-existentes *in situ*.

[0058] As **FIGS**. **40A – 40C: HMGB1 interrompe biofilmes de *Burkholderia cenocepacia***. **(FIG**. **40A)** Biofilmes de *B. cenocepacia* foram cultivados em meio LB em 8 lamínulas de vidro com câmara em forma de poço a 37°C e 5% de CO_2. Após 24h, os biofilmes foram tratados com 5 mg/mL HMGB1. Após um total de 40h, os biofilmes foram corados com LIVE/DEAD®, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. **(FIG**. **40B)** Camundongos C57BL/6 foram infectados com 10^7 CFU i.t., e simultaneamente receberam 5 mg de rHMGB1 ou mHMGB1, uma variante não inflamatória de C45S. Os agregados de *B. cenocepacia* foram visíveis por microscopia de fluorescência em seções sondadas com um α-*B*. anticorpo *cenocepacia* (cinza). Após 18h, **(FIG**. **40C)** CFUs foram quantificados em BAL. Barras representam SD. *P<0,05, ***P<0,001. O tratamento com HMGB1 interrompe significativamente os biofilmes de *B. cenocepacia in situ*.

[0059] A **FIG**. **41: HMGB1 reverte o Z-DNA induzido por poliamina para um estado B-DNA sensível a nuclease**. Um substrato poli(dG-dC) foi incubado com espermidina e HMGB1. Os produtos de degradação foram visualizados por eletroforese em gel. O tratamento com HMGB1 restaurou a sensibilidade da nuclease aos substratos de Z-DNA induzidos por espermidina.

[0060] As **FIGS**. **42A – 42D: As proteínas DNABII e as poliaminas são necessárias para resgatar a prevenção do biofilme mediada pelo trocador de cátions (P11)**. **(FIG**. **42A)** O crescimento do biofilme NTHI foi iniciado a 37°C, 5% de CO_2 na câmara basolateral de um sistema de placa transwell, enquanto a resina P11 foi adicionada à câmara apical e incubada por 16h. **(FIG**. **42B)** Os biofilmes foram corados, fixados, visualizados via CLSM e analisados por COMSTAT. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle (sem

P11) foi avaliada por testes t não pareados, ****P<0,0001. **(FIG. 42C)** Espermidina (Spd, 300 μM) e HU (500 nM) foram adicionados na semeadura. Os biofilmes foram quantificados como em **(FIG. 42B)**. **P<0,01, ***P<0,001 e ****P<0,0001 em comparação com o Controle (sem P11). **(FIG. 42D)** Imagens representativas de biofilmes formados nas condições quantificadas em **(FIG. 42C)**, biomassa média no canto superior direito. A adição de P11 evita a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose. Espermidina exógena e HU juntos restauram o desenvolvimento do biofilme, mas não sozinhos, o que sugere que a atividade anti-biofilme P11 é o resultado da titulação de componentes estruturais (poliaminas, proteínas DNABII) longe do biofilme EPS sem contato direto.

[0061] As **FIGS. 43A – 43B: Especificidade de anticorpos B- e Z-DNA**. **(FIG. 43A)** DNA genômico bromado (2μg/mL) e polydGdC foram incubados em tampão e os valores de absorbância em 260nm e 295nm foram medidos e a razão A260/295 foi calculada. Uma razão **>8,6** é indicativa de **B-DNA** (cinza escuro), enquanto um valor próximo a **3,2** é indicativo de **Z-DNA** (branco). **(FIG. 43B)** Uma placa ELISA foi revestida com 1 μg de poli dGdC (B-DNA) ou poli dGdC bromado (Z-DNA Hindler *et al.* (2013) J Clin Microbiol. 51(6):1678-84.), seguido de bloqueio com 0,5% BSA. Os poços foram então sondados com camundongo (ms) IgG1 (controle negativo), anti-B-DNA de camundongo ou anti-Z-DNA de camundongo e detectados com uma cabra anti-camundongo secundária IgG-HRP. TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foi o substrato colorimétrico usado para detecção de HRP (poços cinza escuro). Os anticorpos anti-B e anti-Z eram específicos para suas respectivas formas de DNA.

[0062] A **FIG. 44: Proteínas DNABII**, **poliaminas e eDNA (B- e Z-DNA) se acumulam continuamente dentro do EPS de biofilmes NTHI ao longo do tempo**. Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes NTHI em vários estágios de formação, sondados com anticorpos anti-B-

DNA (cinza claro; primeiro da esquerda), anti-anti-espermidina (cinza claro; segundo da esquerda), anti-DNABII (cinza ; terceiro da esquerda), ou anti-Z-DNA (branco; quarto do elft). Biofilmes maduros incorporam uma quantidade crescente de cada componente TEDS no EPS ao longo do tempo.

[0063] A **FIG**. **45: As poliaminas e as proteínas DNABII estimulam o Z-DNA**, **que é resistente ao DNAse**. Imagens de imunofluorescência do mimético de andaime EPS formado de novo pela adição de proteína DNABII (HU_{NTHI}, 500 nM) e espermidina (300 μM) para DNA genômico purificado (2 μg/ml) e incubação a 37ºC por 16h. Os miméticos de andaime de biofilme foram incubados com Pulmozyme® (DNase, 5 U/ml) por 1h e então sondados para B-DNA (cinza escuro) e Z-DNA (branco). Barra de escala 10 μM. B-DNA e Z-DNA foram observados dentro das estruturas miméticas, e a adição de DNase eliminou seletivamente o B-DNA, enquanto o Z-DNA permaneceu intacto. Assim, as poliaminas e as proteínas DNABII podem induzir o estado de resistência à DNase por conversão de eDNA de B-DNA em Z-DNA.

[0064] A **FIG**. **46: TEDS e Z-DNA estão presentes dentro do biofilme EPS formado por vários patógenos humanos**. (A) Superior: Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos ingênuos ou anti-HU (cinza) e anti-espermidina (Spd, cinza claro), a co-localização é branca. Inferior: Imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes formados por 40h das bactérias indicadas, sondadas com naive ou anti-B-DNA (cinza escuro) e anticorpos anti-Z-DNA (branco). Um anticorpo monoclonal específico de Z-DNA bem caracterizado (clone Z22 Heydorn *et al.* (2002) COMSTAT. Microbiology; 146; Yang *et al.* (2017) Paediatr Respir Rev. 21: 65-7; Xu *et al.* (2016) Molecules; 21 (8).) Foi usado para detectar Z-DNA. Os componentes DNABII, poliaminas, Z-DNA e B-DNA estão todos presentes no EPS de vários biofilmes bacterianos. O Z-DNA é parte integrante do EPS de vários

biofilmes bacterianos em diferentes níveis de estado estacionário.

[0065] As **FIGS**. **47A – 47B: O Z-DNA está presente em amostras *in vivo* e *ex vivo***. Esquerda: Z-DNA (branco) e B-DNA (cinza escuro) dentro **(FIG**. **47A)** biofilme NTHI durante OM induzida por NTHI experimental e **(FIG**. **47B)** expectoração de paciente com fibrose cística. Inserção, neg. ao controle. Barra de escala 10 µm. Direita: proteína DNABII (cinza) e espermidina (Spd, cinza claro) dentro **(FIG**. **47A)** do biofilme NTHI durante OM induzida por NTHI experimental e **(FIG**. **47B**) expectoração de paciente com fibrose cística. Inserção, neg. ao controle. Barra de escala 10 µm. Os componentes DNABII, poliaminas, Z-DNA e B-DNA estão todos presentes em seções da orelha média de chinchila infectada com biofilmes NTHI. O Z-DNA é parte integrante do EPS de vários biofilmes bacterianos em diferentes níveis de estado estacionário.

[0066] As **FIGS**. **48A - 48B: Z-DNA em biofilmes forma uma estrutura resistente à nuclease**. **(FIG**. **48A)** Biofilmes formados por 24h pelas bactérias indicadas (Kp = K. pneumoniae) foram incubados com DNase (Pulmozyme®; 40 U/ml) por mais 16h. Biofilmes foram então sondados com anticorpos anti-B-DNA (cinza escuro) e anti-Z-DNA (branco) e contrastados com a coloração da membrana da célula bacteriana FM4-64TM (não mostrado). (FIG. 48B) Mudanças na abundância de B-DNA ou Z-DNA foram quantificadas usando ImageJ por cálculo da razão da intensidade de fluorescência de B-DNA ou Z-DNA após a adição de DNase dividido pela intensidade de fluorescência na ausência de DNase (Ao controle). A intensidade da fluorescência foi normalizada para o sinal de fluorescência das células coradas com FM4-64TM. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle (sem DNase, linha pontilhada) foi avaliada por testes t pareados, *P<0,05; ****P<0,0001. Enquanto o B-DNA é degradado pela DNase, o Z-DNA é resistente e serve para manter a integridade estrutural do biofilme EPS.

[0067] A **FIG**. **49: A estabilização do Z-DNA estimula a formação de**

biofilme. O crescimento do biofilme NTHI e UPEC foi iniciado na presença de anticorpos ingênuos ou anti-Z-DNA (5 mg/ml) por 16h. Os biofilmes foram corados, fixados, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle (sem anticorpos) foi avaliada por testes t pareados, *P<0,05, **P<0,01. Os anticorpos anti-Z-DNA estimulam a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose, enquanto os anticorpos naive não.

[0068] As **FIGS**. **50A – 50B: A mudança de equilíbrio da conversão de B-DNA para Z-DNA altera a formação de biofilme**. Biofilmes NTHI formados por 24h foram incubados com cloreto de cério ($CeCl_3$) ou cloroquina por mais 16 h e foram sondados com naive ou anti-Z-DNA (branco) por imunofluorescência CLSM. **(FIG**. **50A)** A imagem representativa do biofilme NTHI indicou um aumento da abundância de Z-DNA após a adição de 1 mM $CeCl_3$. **(FIG**. **50B)** A imagem representativa do biofilme NTHI indicou uma diminuição da abundância de Z-DNA após a adição de cloroquina 1 μM.

[0069] As **FIGS**. **51A – 51B: A mudança de equilíbrio da conversão de B-DNA para Z-DNA altera a formação de biofilme**. Biofilmes NTHI formados por 24h foram incubados com cloreto de cério ($CeCl_3$) **(FIG**. **51A)** ou cloroquina **(FIG**. **51B)** por mais 16h. O Z-DNA foi medido por IF e CLSM usando anti-Z-DNA e as células foram coradas com a coloração de membrana FM4-64. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle foi avaliada por testes t pareados, *P<0,05, **P<0,01. $CeCl_3$ aumentou o Z-DNA e a formação de biofilme, enquanto a cloroquina reduziu o Z-DNA e o desenvolvimento de biofilme.

[0070] As **FIGS**. **52A – 52B: A homeostase do RNA modula o desenvolvimento do biofilme bacteriano**. **(FIG**. **52A)** O crescimento do biofilme NTHI foi iniciado na presença de RNase A por 16h. Os biofilmes

foram corados, fixados, visualizados via CLSM e analisados pelo COMSTAT. A adição de RNase A estimulou a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose, provavelmente pela liberação de poliaminas, um catalisador crítico para a conversão extracelular de B-DNA em Z-DNA. **(FIG**. **52B**) Biofilmes NTHI formados por 16h foram incubados com tRNA e analisados como em **(FIG**. **52A)**. Monofosfato de guanosina (GMP) serviu como controle negativo. Barras representam o SEM. A significância estatística em comparação com o controle (sem RNase A ou tRNA/GMP) foi avaliada por testes t pareados, *P<0,05, **P<0,01. A adição de tRNA (mas não GMP) interrompeu biofilmes NTHI iniciais de uma maneira dependente da dose, provavelmente por sequestro de poliaminas do biofilme EPS.

[0071] A **FIG**. **53: DNABII e poliaminas sinergizam para converter B-DNA em Z-DNA**. Em um aspecto, os agentes são administrados na ausência de uma DNAse. Esquerda: DNA genômico (2 µg/mL) foi incubado com espermidina (spd: 300 µM), HU (500 nM), uma combinação de ambos spd e HU por 2h a 37 ºC. A incubação de gDNA com 3,6 M NaCl foi usada como um controle Z-DNA positivo. Meio: o gDNA (2 µg/mL) foi incubado com concentrações aumentadas de cloreto de cério ($CeCl_3$) que é conhecido por induzir Z-DNA. À direita: poli (dGdC) (1µg) foi incubado com NaCl (3,6M), cloroquina (100µM) ou uma combinação de NaCl e cloroquina. A cloroquina impede a transição de B-DNA para Z-DNA. Os valores de absorbância em 260nm e 295nm foram medidos e a razão A260/295 foi calculada. Uma razão> 8,6 é indicativa de B-DNA, enquanto um valor próximo a 3,2 é indicativo de Z-DNA. DNABII e poliaminas, bem como $CeCl_3$ sinergizaram para induzir Z-DNA, enquanto a cloroquina preveniu a conversão de Z-DNA de acordo com um ensaio de taxa de absorbância espectroscópica bem estabelecido e verificado.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0072] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e

científicos usados neste documento têm os mesmos significados como comumente entendidos por alguém versado na técnica à qual esta divulgação pertence. Todas as sequências de nucleotídeos fornecidas aqui são apresentadas na direção 5' a 3'. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente divulgação, métodos, dispositivos e materiais exemplares não limitativos e particulares são agora descritos. Todas as publicações técnicas e de patentes aqui citadas são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Nada neste documento deve ser interpretado como uma admissão de que a divulgação não tem o direito de anteceder tal divulgação em virtude da invenção anterior.

[0073] A prática da presente divulgação empregará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de cultura de tecidos, imunologia, biologia molecular, microbiologia, biologia celular e DNA recombinante, que estão dentro da habilidade na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook e Russel eds, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edição; a série de Ausubel *et al.* eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology; a série Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson *et al.* (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press em Oxford University Press); MacPherson *et al.* (1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow e Lane eds. (1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5ª edição; Gait ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Patente U.S. N.º 4.683.195; Eds de Hames e Higgins. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization; Eds de Hames e Higgins. (1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986)); Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller e Calos eds, (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed. (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer e Walker eds. (1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology

(Academic Press, Londres); e Herzenberg *et al.* eds (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology.

[0074] Todas as designações numéricas, por exemplo, pH, temperatura, tempo, concentração e peso molecular, incluindo intervalos, são aproximações que são variadas (+) ou (-) por incrementos de 1,0 ou 0,1, conforme apropriado ou alternativamente por uma variação de +/- 15%, ou alternativamente 10% ou alternativamente 5% ou alternativamente 2%. Deve ser entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que todas as designações numéricas são precedidas do termo "cerca de". Também deve ser entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que os reagentes descritos neste documento são meramente exemplificativos e que seus equivalentes são conhecidos na técnica.

[0075] Conforme utilizado no Relatório Descritivo e nas Reivindicações, a forma singular "um", "uma" e "o" incluem referências plurais, a menos que o contexto dite claramente o contrário. Por exemplo, o termo "um polipeptídeo" inclui uma pluralidade de polipeptídeos, incluindo misturas do mesmo.

[0076] Conforme utilizado aqui, o termo "compreendendo" se destina a significar que as composições e métodos incluem os elementos citados, mas não excluem outros. "Consistindo essencialmente em" quando usado para definir composições e métodos, deverá significar a exclusão de outros elementos de qualquer significado essencial para a combinação para o uso pretendido. Assim, uma composição consistindo essencialmente nos elementos conforme definidos não excluiria vestígios de contaminantes do método de isolamento e purificação e veículos farmaceuticamente aceitáveis, tais como solução salina tamponada com fosfato, conservantes e semelhantes. "Consistindo em" deverá significar excluir mais do que elementos vestigiais de outros ingredientes e etapas substanciais do método para administrar as composições aqui divulgadas. As modalidades definidas por cada um desses termos de

transição estão dentro do escopo desta divulgação.

[0077] Um "biofilme" significa uma comunidade organizada de microrganismos que por vezes aderem à superfície de uma estrutura, que pode ser orgânica ou inorgânica, juntamente com os polímeros como o DNA que secretam e/ou libertam. Os biofilmes são muito resistentes a agentes microbióticos e antimicrobianos. Eles vivem nos tecidos gengivais, dentes e restaurações, causando cárie e doença periodontal, também conhecida como doença da placa periodontal. Eles também causam infecções crônicas do ouvido médio. Biofilmes também podem se formar na superfície de implantes dentários, stents, linhas de cateter e lentes de contato. Eles crescem em marca-passos, substitutos de válvula cardíaca, articulações artificiais e outros implantes cirúrgicos. Os Centros de Controle de Doenças estimam que mais de 65% das infecções nosocomiais (adquiridas em hospitais) são causadas por biofilmes. Eles causam infecções vaginais crônicas e levam a infecções sistêmicas com risco de vida em pessoas com sistema imunológico debilitado. Os biofilmes também estão envolvidos em várias doenças. Por exemplo, pacientes com fibrose cística têm infecções por *Pseudomonas* que frequentemente resultam em biofilmes resistentes a antibióticos.

[0078] O termo "inibir, competir ou titular" pretende uma redução na formação da matriz de DNA/proteína que é um componente de um biofilme microbiano.

[0079] Um "polipeptídeo ou proteína DNABII" se refere a uma proteína ou polipeptídeo de ligação ao DNA que é composto de domínios de ligação ao DNA e, portanto, tem uma afinidade específica ou geral para o DNA microbiano. Em um aspecto, eles se ligam ao DNA no bosque menor. Exemplos não limitativos de proteínas DNABII são uma proteína do fator de integração do hospedeiro (IHF) e uma proteína semelhante a histona de *E. coli* cepa U93 (HU). Outras proteínas de ligação ao DNA que podem estar associadas ao biofilme incluem DPS (N.º de acesso Genbank:

CAA49169), H-NS (N.º de acesso Genbank: CAA47740), Hfq (N.º de acesso Genbank: ACE63256), CbpA (N.º de acesso Genbank: : BAA03950) e CbpB (No de Acesso do Genbank: NP — 418813).

[0080] Um "fator hospedeiro de integração" da proteína "IHF" é uma proteína bacteriana que é usada por bacteriófagos para incorporar seu DNA na bactéria hospedeira. Eles também se ligam ao DNA microbiano extracelular. Os genes que codificam as subunidades da proteína IHF em *E. coli* são os genes himA (Genbank Accession N.º.:POA6X7.1) e himD (POA6Y1.1). Homólogos para estes genes são encontrados em outros organismos, e os peptídeos correspondentes a esses genes de outros organismos são divulgados na técnica, por exemplo, na Tabela 10 da Patente US N.º 8.999.291.

[0081] "HMGB1" é uma proteína de caixa de grupo de alta mobilidade (HMGB) 1 que se liga e distorce o sulco menor do DNA e é um exemplo de agente. Proteína e polipeptídeo recombinantes ou isolados estão comercialmente disponíveis na Atgenglobal, ProSpecBio, Protein1 e Abnova. HMGB1 é uma pequena proteína de proteína de 215 aminoácidos (de aproximadamente 30 Kda) composta por 3 domínios: dois domínios carregados positivamente, a caixa A e B, cada um compreendendo de 80 aminoácidos e um terminal carbocil carregado negativamente, a cauda C ácida que consiste em aproximadamente 30 resíduos consecutivos de aspartato e glutamato. Em seguida, é fornecido um exemplo não limitativo de uma sequência de polipeptídeo de HMGB1 tipo selvagem:

MGKGDPKKPRRKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSE RWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYI_PPKGETKKKF_*KDP NAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQPY EKKAEKLKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVV*_KAEKSKKKKEEEEGEED EEDEEEEEDEEDEDEEEDDDDE

Os aminoácidos em negrito (aminoácidos 1-70) representam o domínio A Box.

Os aminoácidos em itálico (aminoácidos 88-164) representam o domínio B Box.

Os aminoácidos sublinhados (aminoácidos 186-215) representam o domínio da cauda C. Estes são exemplos não limitativos de fragmentos, por exemplo, o domínio A Box, o domínio B Box, os domínios A e B box (domínio AB box), o domínio da cauda C e o domínio N (aminoácidos 1-185) . Em um aspecto, o fragmento consiste essencialmente no domínio C-terminal ou um polipeptídeo compreendendo o domínio B Box.

[0082] "HU" ou "proteína semelhante a histona de *E. coli* cepa U93" refere-se a uma classe de proteínas heterodiméricas tipicamente associadas a *E. coli*. Proteínas HU são conhecidas por se ligarem a junções de DNA. Proteínas relacionadas foram isoladas de outros microrganismos. A sequência de aminoácidos completa de *E. coli* HU foi relatada por Laine *et al.* (1980) Eur. J. Biochem 103 (3) 447-481. Os anticorpos para a proteína HU estão disponíveis comercialmente na Abeam.

[0083] O termo "antígenos de superfície" ou "proteínas de superfície" refere-se a proteínas ou peptídeos na superfície das células, como células bacterianas. Exemplos de antígenos de superfície são proteínas de membrana externa, como OMP P5 (N.º de acesso Genbank: YP — 004139079.1), OMP P2 (N.º de acesso Genbank: ZZX87199.1), OMP P26 (N.º de acesso Genbank: YP — 665091.1), rsPilA ou PilA solúvel recombinante (No de acesso do Genbank: EFU96734.1) e Pilin do tipo IV (No de acesso do Genbank: Yp — 003864351.1).

[0084] O termo "*Haemophilus influenzae*" refere-se a bactérias

patogênicas que podem causar muitas infecções diferentes, como, por exemplo, infecções de ouvido, infecções oculares e sinusite. Muitas cepas diferentes de *Haemophilus influenzae* foram isoladas e possuem um gene ou proteína IhfA. Alguns exemplos não limitativos de diferentes cepas de *Haemophilus influenzae* incluem Rd KW20, 86-028NP, R2866, PittGG, PittEE, R2846 e 2019.

[0085] "DNA microbiano" significa DNA de fita simples ou dupla de um microrganismo que produz um biofilme.

[0086] "Inibir, prevenir ou quebrar" um biofilme pretende a redução profilática ou terapêutica na estrutura de um biofilme.

[0087] Um "polinucleotídeo dobrado" significa um polinucleotídeo de fita dupla que contém uma pequena alça em uma fita que não emparelha com a outra fita. Em algumas modalidades, o loop tem de 1 base a cerca de 20 bases de comprimento, ou alternativamente de 2 bases a cerca de 15 bases de comprimento, ou alternativamente de cerca de 3 bases a cerca de 12 bases de comprimento, ou alternativamente de cerca de 4 bases a cerca de 10 bases de comprimento, ou alternativamente tem cerca de 4, 5 ou 6 ou 7 ou 8 ou 9 ou 10 bases.

[0088] Um "sujeito" de diagnóstico ou tratamento é uma célula ou um animal, como um mamífero ou um ser humano. Animais não humanos sujeitos a diagnóstico ou tratamento e são aqueles sujeitos a infecções ou modelos animais, por exemplo, símios, murinos, tais como, ratos, camundongos, chinchilas, caninos, tais como cães, leporídeos, tais como coelhos, gado, esporte animais e animais de estimação. Os termos "sujeito", "hospedeiro", "indivíduo" e "paciente" são indistintamente usados aqui para se referir a animais, normalmente animais mamíferos. Exemplos não limitativos de mamíferos incluem humanos, primatas não humanos (por exemplo, macacos, gibões, chimpanzés, orangotangos, macacos, *macaques* e semelhantes), animais domésticos (por exemplo,

cães e gatos), animais de fazenda (por exemplo, cavalos, vacas, cabras, ovelhas, porcos) e animais experimentais (por exemplo, camundongo, rato, coelho, porquinho da índia). Em algumas modalidades, um mamífero é um humano. Um mamífero pode ter qualquer idade ou em qualquer estágio de desenvolvimento (por exemplo, um adulto, adolescente, criança, bebê ou um mamífero no útero). Um mamífero pode ser macho ou fêmea. Em algumas modalidades, um sujeito é um humano.

[0089] O termo “proteína”, “peptídeo” e “polipeptídeo” são usados indistintamente e em seu sentido mais amplo para se referir a um composto de duas ou mais subunidades de aminoácidos, análogos de aminoácidos ou peptidomiméticos. As subunidades podem ser ligadas por ligações peptídicas. Em outra modalidade, a subunidade pode ser ligada por outras ligações, por exemplo, éster, éter, etc. Uma proteína ou peptídeo deve conter pelo menos dois aminoácidos e nenhuma limitação é colocada no número máximo de aminoácidos que podem compreender uma proteína ou sequência do peptídeo. Tal como aqui utilizado, o termo “aminoácido” refere-se a aminoácidos naturais e/ou não naturais ou sintéticos, incluindo glicina e ambos os isômeros ópticos D e L, análogos de aminoácidos e peptidomiméticos.

[0090] Os termos “polinucleotídeo” e “oligonucleotídeo” são usados indistintamente e referem-se a uma forma polimérica de nucleotídeos de qualquer comprimento, sejam desoxirribonucleotídeos ou ribonucleotídeos ou análogos dos mesmos. Os polinucleotídeos podem ter qualquer estrutura tridimensional e podem desempenhar qualquer função, conhecida ou desconhecida. Os seguintes são exemplos não limitativos de polinucleotídeos: um gene ou fragmento de gene (por exemplo, uma sonda, iniciador, EST ou etiqueta SAGE), exons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência, RNA ribossômico, RNAi, ribozimas, cDNA, polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos

ramificados, plasmídeos, vetores, DNA isolado de qualquer sequência, RNA isolado de qualquer sequência, sondas de ácido nucleico e iniciadores. Um polinucleotídeo pode compreender nucleotídeos modificados, tais como nucleotídeos metilados e análogos de nucleotídeos. Se presente, modificações na estrutura do nucleotídeo podem ser transmitidas antes ou depois da montagem do polinucleotídeo. A sequência de nucleotídeos pode ser interrompida por componentes não nucleotídeos. Um polinucleotídeo pode ser modificado posteriormente após a polimerização, tal como por conjugação com um componente de marcação. O termo também se refere a moléculas de fita simples e dupla. A menos que especificado ou requerido de outra forma, qualquer modalidade aqui divulgada que seja um polinucleotídeo abrange tanto a forma de fita dupla quanto cada uma das duas formas de fita simples complementares conhecidas ou previstas para constituir a forma de fita dupla.

[0091] Um polinucleotídeo é composto de uma sequência específica de quatro bases de nucleotídeo: adenina (A); citosina (C); guanina (G); timina (T); e uracila (U) para timina quando o polinucleotídeo é RNA. Assim, o termo “sequência polinucleotídica” é a representação alfabética de uma molécula polinucleotídica. Esta representação alfabética pode ser inserida em bancos de dados em um computador com uma unidade de processamento central e usada para aplicações de bioinformática, como genômica funcional e pesquisa de homologia.

[0092] O termo “isolado” ou “recombinante”, tal como aqui utilizado com relação aos ácidos nucleicos, como DNA ou RNA, refere-se a moléculas separadas de outros DNAs ou RNAs, respectivamente, que estão presentes na fonte natural da macromolécula, bem como polipeptídeos. O termo “ácido nucleico isolado ou recombinante” pretende incluir fragmentos de ácido nucleico que não ocorrem naturalmente como fragmentos e não seriam encontrados no estado natural. O termo

“isolado” também é usado neste documento para se referir a polinucleotídeos, polipeptídeos e proteínas que são isolados de outras proteínas celulares e se destina a abranger polipeptídeos purificados e recombinantes. Em outras modalidades, o termo “isolado ou recombinante” significa separado dos constituintes, celulares e outros, nos quais a célula, tecido, polinucleotídeo, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou fragmento(s) do mesmo, que são normalmente associados na natureza. Por exemplo, uma célula isolada é uma célula que é separada do tecido ou células de fenótipo ou genótipo diferente. Um polinucleotídeo isolado é separado dos nucleotídeos contíguos 3’ e 5’ com os quais está normalmente associado em seu ambiente nativo ou natural, por exemplo, no cromossomo. Como é aparente para os versados na técnica, um polinucleotídeo, peptídeo, polipeptídeo, proteína, anticorpo ou fragmento(s) do mesmo de ocorrência não natural não requer “isolamento” para distingui-lo de sua contraparte de ocorrência natural.

[0093] Deve ser inferido sem recitação explícita e a menos que de outra forma pretendido, que quando a presente divulgação se refere a um polipeptídeo, proteína, polinucleotídeo ou anticorpo, um equivalente ou um equivalente biologicamente de tal é pretendido dentro do escopo desta divulgação. Tal como aqui utilizado, o termo “seu equivalente biológico” se destina a ser sinônimo de “seu equivalente” quando se refere a uma proteína, anticorpo, fragmento, polipeptídeo ou ácido nucleico de referência, destina-se àqueles com homologia mínima, embora ainda mantendo a estrutura ou funcionalidade desejada. A menos que especificamente recitado aqui, está contemplado que qualquer polinucleotídeo, polipeptídeo ou proteína aqui mencionado também inclui seus equivalentes. Em um aspecto, um polinucleotídeo equivalente é aquele que hibridiza sob condições rigorosas com o polinucleotídeo ou complemento do polinucleotídeo como descrito neste documento para uso nos métodos descritos. Em outro aspecto, um anticorpo equivalente ou polipeptídeo de ligação ao antígeno pretende um que se liga com pelo

menos 70%, ou alternativamente pelo menos 75%, ou alternativamente pelo menos 80%, ou alternativamente pelo menos 85%, ou alternativamente pelo menos 90%, ou alternativamente, pelo menos 95% de afinidade ou afinidade superior para um anticorpo de referência ou fragmento de ligação ao antígeno. Em outro aspecto, o equivalente deste compete com a ligação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno ao seu antígeno tinder um ensaio ELISA competitivo. Em outro aspecto, um equivalente pretende pelo menos cerca de 80% de homologia ou identidade e, alternativamente, pelo menos cerca de 85%, ou alternativamente, pelo menos cerca de 90%, ou alternativamente pelo menos cerca de 95%, ou alternativamente 98% por cento de homologia ou identidade e exibe atividade biológica substancialmente equivalente à proteína, polipeptídeo ou ácido nucleico de referência.

[0094] Um polinucleotídeo ou região polinucleotídica (ou um polipeptídeo ou região polipeptídica) tendo uma certa porcentagem (por exemplo, 80%, 85%, 90% ou 95%) de "identidade de sequência" com outra sequência significa que, quando alinhada, essa porcentagem de bases (ou aminoácidos) são os mesmos na comparação das duas sequências. O alinhamento e a homologia percentual ou identidade de sequência podem ser determinados usando programas de software conhecidos na técnica, por exemplo aqueles descritos em Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds. 1987) Suplemento 30, seção 7.7.18, Tabela 7.7.1. Em certas modalidades, os parâmetros padrão são usados para alinhamento. Um programa de alinhamento exemplar não limitante é o BLAST, usando parâmetros padrão. Em particular, os programas exemplares incluem BLASTN e BLASTP, usando os seguintes parâmetros padrão: Código genético = padrão; filtro = nenhum; fita = ambos; corte = 60; esperar = 10; Matriz = BLOSUM62; Descrições = 50 sequências; classificar por = HIGH SCORE; Bancos de dados = não redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traduções CDS do GenBank + SwissProtein + SPupdate + PIR. Os detalhes desses programas podem ser

encontrados no seguinte endereço da Internet: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST. A identidade da sequência e a porcentagem de identidade foram determinadas incorporando-as ao clustalW (disponível no endereço da web: align.genome.jp, acessado pela última vez em 7 de março de 2011.

[0095] "Homologia" ou "identidade" ou "similaridade" refere-se à semelhança de sequência entre dois peptídeos ou entre duas moléculas de ácido nucleico. A homologia pode ser determinada comparando uma posição em cada sequência que pode ser alinhada para efeitos de comparação. Quando uma posição na sequência comparada é ocupada pela mesma base ou aminoácido, então as moléculas são homólogas nessa posição. Um grau de homologia entre as sequências é uma função do número de posições correspondentes ou homólogas compartilhadas pelas sequências. Uma sequência "não relacionada" ou "não homóloga" compartilha menos de 40% de identidade ou, alternativamente, menos de 25% de identidade, com uma das sequências da presente divulgação.

[0096] "Homologia" ou "identidade" ou "similaridade" também pode se referir a duas moléculas de ácido nucleico que hibridizam sob condições rigorosas.

[0097] "Hibridização" refere-se a uma reação na qual um ou mais polinucleotídeos reagem para formar um complexo que é estabilizado por meio de ligações de hidrogênio entre as bases dos resíduos de nucleotídeos. A ligação de hidrogênio pode ocorrer por emparelhamento de bases Watson-Crick, ligação de Hoogstein ou de qualquer outra maneira específica de sequência. O complexo pode compreender duas fitas formando uma estrutura duplex, três ou mais fitas formando um complexo de fitas múltiplas, uma única fita auto-hibridizante ou qualquer combinação destas. Uma reação de hibridização pode constituir uma etapa de um processo mais extenso, como o início de uma reação de PCR ou a clivagem enzimática de um polinucleotídeo por uma ribozima.

[0098] Exemplos de condições de hibridização rigorosas incluem: temperaturas de incubação de cerca de 25 ºC a cerca de 37 ºC; concentrações de tampão de hibridização de cerca de 6 × SSC a cerca de 10 × SSC; concentrações de formamida de cerca de 0% a cerca de 25%; e soluções de lavagem de cerca de 4 × SSC a cerca de 8 × SSC. Exemplos de condições de hibridização moderadas incluem: temperaturas de incubação de cerca de 40 ºC a cerca de 50 ºC; concentrações de tampão de cerca de 9 × SSC a cerca de 2 × SSC; concentrações de formamida de cerca de 30% a cerca de 50%; e soluções de lavagem de cerca de 5 × SSC a cerca de 2 × SSC. Exemplos de condições de alto rigor incluem: temperaturas de incubação de cerca de 55 ºC a cerca de 68 ºC; concentrações de tampão de cerca de 1 × SSC a cerca de 0,1 × SSC; concentrações de formamida de cerca de 55% a cerca de 75%; e soluções de lavagem de cerca de 1 × SSC, 0,1 × SSC ou água desionizada. Em geral, os tempos de incubação de hibridização são de 5 minutos a 24 horas, com 1, 2 ou mais etapas de lavagem, e os tempos de incubação de lavagem são de cerca de 1, 2 ou 15 minutos. SSC é NaCl 0,15 M e tampão citrato 15 mM. Entende-se que equivalentes de SSC usando outros sistemas tampão podem ser empregados.

[0099] Tal como aqui utilizado, “expressão” refere-se ao processo pelo qual os polinucleotídeos são transcritos em mRNA e/ou o processo pelo qual o mRNA transcrito é subsequentemente traduzido em peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Se o polinucleotídeo é derivado de DNA genômico, a expressão pode incluir emenda de mRNA em uma célula eucariótica.

[0100] O termo “codificar” conforme aplicado a polinucleotídeos refere-se a um polinucleotídeo que “codifica” um polipeptídeo se, em seu estado nativo ou quando manipulado por métodos bem conhecidos pelos versados na técnica, ele pode ser transcrito e/ou traduzido para produzir o mRNA para o polipeptídeo e/ou um fragmento do mesmo. A fita

antisense é o complemento de tal ácido nucleico e a sequência de codificação pode ser deduzida a partir dela.

[0101] Conforme usado neste documento, os termos “tratamento”, “tratamento” e semelhantes são usados neste documento para significar a obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser terapêutico em termos de cura parcial ou completa para um distúrbio e/ou efeito adverso atribuível ao distúrbio. Tal como aqui utilizado, “tratar” ou “tratamento” de uma doença em um sujeito também pode se referir a (1) impedir que os sintomas ou doença ocorram em um sujeito que está predisposto ou ainda não apresenta sintomas da doença; (2) inibir a doença ou interromper seu desenvolvimento; ou (3) melhorar ou causar regressão da doença ou dos sintomas da doença. Conforme entendido na técnica, “tratamento” é uma abordagem para obter resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Para os fins da presente tecnologia, os resultados benéficos ou desejados podem incluir um ou mais, mas sem limitação, alívio ou melhoria de um ou mais sintomas, diminuição da extensão de uma condição (incluindo uma doença), estabilizado (ou seja, não agravamento) estado de uma condição (incluindo doença), atraso ou desaceleração da condição (incluindo doença), progressão, melhoria ou paliação da condição (incluindo doença), estados e remissão (seja parcial ou total), sejam detectáveis ou indetectáveis. Em um aspecto, o tratamento exclui a profilaxia. Quando a doença é LES (lúpus eritematoso sistêmico) e/ou fibrose cística (FC), a evidência do tratamento incluiu evidência reduzida de inflamação e/ou o nível de atividade autoimune ou sintomas.

[0102] Para prevenir pretende prevenir um distúrbio ou efeito *in vitro* ou *in vivo* em um sistema ou sujeito que está predisposto ao distúrbio ou efeito. Um exemplo disso é prevenir a formação de um biofilme em um sistema que está infectado com um microrganismo conhecido por produzi-lo.

[0103] Uma “composição” se destina a significar uma combinação de agente ativo e outro composto ou composição, inerte (por exemplo, um agente detectável ou marcador) ou ativo, tal como um adjuvante, diluente, ligante, estabilizador, tampões, sais, solventes lipofílicos, conservante, adjuvante ou semelhantes e incluem veículos farmaceuticamente aceitáveis. Os transportadores também incluem excipientes farmacêuticos e proteínas aditivas, peptídeos, aminoácidos, lipídeos e carboidratos (por exemplo, açúcares, incluindo monossacarídeos, di-, tri, tetra-oligossacarídeos e oligossacarídeos; açúcares derivados, como alditóis, ácidos aldônicos, açúcares esterificados e semelhantes; e polissacáridos ou polímeros de açúcar), que podem estar presentes isoladamente ou em combinação, compreendendo isoladamente ou em combinação 1-99,99% em peso ou volume. Excipientes de proteína exemplares incluem albumina de soro, como albumina de soro humano (HSA), albumina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína e semelhantes. Componentes de aminoácido/anticorpo representativos, que também podem funcionar em uma capacidade de tamponamento, incluem alanina, arginina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartame, e similar. Excipientes de carboidratos também se destinam ao escopo desta tecnologia, exemplos dos quais incluem, mas sem limitação, monossacarídeos, tais como frutose, maltose, galactose, glicose, D-manose, sorbose e semelhantes; dissacarídeos, tais como lactose, sacarose, trealose, celobiose e semelhantes; polissacarídeos, tais como rafinose, melezitose, maltodextrinas, dextranos, amidos e semelhantes; e alditóis, tais como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) e mioinositol.

[0104] Uma “composição farmacêutica” se destina a incluir a combinação de um agente ativo com um carreador, inerte ou ativo, tornando a composição adequada para uso diagnóstico ou terapêutico *in vitro*, *in vivo*

ou *ex vivo*.

[0105] "Transportadores farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a quaisquer diluentes, excipientes ou transportadores que podem ser usados nas composições aqui divulgadas. Os transportadores farmaceuticamente aceitáveis incluem trocadores de íons, alumina, estearato de alumínio, lecitina, proteínas de soro, como albumina de soro humano, substâncias tampão, como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potássio, misturas de glicerídeos parciais de ácidos graxos vegetais saturados, água, sais ou eletrólitos, tais como sulfato de protamina, hidrogenofosfato dissódico, hidrogenofosfato de potássio, cloreto de sódio, sais de zinco, sílica coloidal, trissilicato de magnésio, polivinilpirrolidona, substâncias à base de celulose, polietilenoglicol, carboximetilcelulose de sódio, poliacrilatos, ceras, polietileno-polioxipropileno-polímeros em bloco, polietilenoglicol e gordura de lã. Veículos farmacêuticos adequados são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, um texto de referência padrão neste campo. Eles podem ser selecionados em relação à forma pretendida de administração, isto é, comprimidos orais, cápsulas, elixires, xaropes e semelhantes, e consistentes com as práticas farmacêuticas convencionais.

[0106] As composições utilizadas de acordo com a divulgação podem ser embaladas na forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. O termo "dose unitária" ou "dosagem" refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas para uso em um sujeito, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada da composição calculada para produzir as respostas desejadas em associação com sua administração, ou seja, a via e o regime apropriados . A quantidade a ser administrada, tanto em número de tratamentos quanto em dose unitária, depende do resultado e/ou proteção desejada. Quantidades precisas da composição também

dependem do julgamento do praticante e são peculiares a cada indivíduo. Os fatores que afetam a dose incluem o estado físico e clínico do sujeito, a via de administração, o objetivo pretendido do tratamento (alívio dos sintomas versus cura) e a potência, estabilidade e toxicidade da composição específica. Após a formulação, as soluções são administradas de uma maneira compatível com a formulação de dosagem e em uma quantidade que seja terapêutica ou profilaticamente eficaz. As formulações são facilmente administradas em uma variedade de formas de dosagem, tais como o tipo de soluções injetáveis aqui descritas.

[0107] O termo "contato" significa ligação direta ou indireta ou interação entre dois ou mais. Um exemplo particular de interação direta é a ligação. Um exemplo particular de uma interação indireta é quando uma entidade atua sobre uma molécula intermediária, que por sua vez atua sobre a segunda entidade referenciada. O contato, conforme usado aqui, inclui em solução, em fase sólida, *in vitro*, *ex vivo*, em uma célula e *in vivo*. O contato *in vivo* pode ser referido como administração ou administração.

[0108] Um "agente biologicamente ativo" ou um agente ativo divulgado aqui pretende um ou mais de um polipeptídeo isolado ou recombinante, um polinucleotídeo isolado ou recombinante, um vetor, uma célula hospedeira isolada ou um anticorpo, bem como composições compreendendo um ou mais de mesmo.

[0109] A "administração" pode ser efetuada em uma dose, contínua ou intermitentemente ao longo do curso do tratamento. Os métodos de determinação do meio e dosagem de administração mais eficazes são conhecidos pelos versados na técnica e irão variar com a composição usada para a terapia, o propósito da terapia, a célula alvo a ser tratada e o sujeito a ser tratado. As administrações únicas ou múltiplas podem ser realizadas com o nível de dose e o padrão selecionado pelo médico assistente. As formulações de dosagem adequadas e métodos de administração dos agentes são conhecidos na técnica. A via de

administração também pode ser determinada e o método de determinação da via de administração mais eficaz é conhecido pelos versados na técnica e irá variar com a composição usada para o tratamento, a finalidade do tratamento, a condição de saúde ou estágio da doença do sujeito a ser tratado e célula ou tecido alvo. Exemplos não limitativos de via de administração incluem administração oral, administração nasal, injeção e aplicação tópica.

[0110] Um agente da presente divulgação pode ser administrado para terapia por qualquer via de administração adequada. Também será tido em consideração que a rota ideal irá variar com a condição e idade do receptor e a doença a ser tratada.

[0111] O termo “quantidade eficaz” refere-se a uma quantidade suficiente para atingir o efeito desejado. No contexto de aplicações terapêuticas ou profiláticas, a quantidade eficaz dependerá do tipo e gravidade da condição em questão e das características do sujeito individual, tal como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância a composições farmacêuticas. No contexto de uma composição imunogênica, em algumas modalidades, a quantidade eficaz é a quantidade suficiente para resultar em uma resposta protetora contra um patógeno. Em outras modalidades, a quantidade eficaz de uma composição imunogênica é a quantidade suficiente para resultar na geração de anticorpos contra o antígeno. Em algumas modalidades, a quantidade eficaz é a quantidade necessária para conferir imunidade passiva a um sujeito em necessidade. Com relação às composições imunogênicas, em algumas modalidades, a quantidade eficaz dependerá do uso pretendido, do grau de imunogenicidade de um composto antigênico particular e da saúde/capacidade de resposta do sistema imunológico do sujeito, além dos fatores descritos acima. O especialista na técnica será capaz de determinar as quantidades apropriadas dependendo destes e de outros fatores.

[0112] No caso de uma aplicação *in vitro*, em algumas modalidades, a quantidade eficaz dependerá do tamanho e da natureza da aplicação em questão. Dependerá também da natureza e sensibilidade do alvo *in vitro* e dos métodos em uso. O perito na arte será capaz de determinar a quantidade eficaz com base nestas e outras considerações. A quantidade eficaz pode compreender uma ou mais administrações de uma composição dependendo da modalidade.

[0113] Um "conjugado de peptídeo" refere-se à associação por ligação covalente ou não covalente de um ou mais polipeptídeos e outro composto químico ou biológico. Em um exemplo não limitativo, a "conjugação" de um polipeptídeo com um composto químico resulta em estabilidade ou eficácia melhorada do polipeptídeo para a finalidade pretendida. Em uma modalidade, um peptídeo é conjugado a um carreador, em que o carreador é um lipossoma, uma micela ou um polímero farmaceuticamente aceitável.

[0114] "Lipossomas" são vesículas microscópicas que consistem em bicamadas lipídicas concêntricas. Estruturalmente, os lipossomas variam em tamanho e forma de tubos longos a esferas, com dimensões de algumas centenas de Angstroms a frações de um milímetro. Os lipídios formadores de vesículas são selecionados para atingir um determinado grau de fluidez ou rigidez do complexo final, fornecendo a composição lipídica da camada externa. Estes são neutros (colesterol) ou bipolares e incluem fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SM) e outros tipos de lipídios bipolares incluindo, mas sem limitação dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), com um comprimento de cadeia de hidrocarboneto no intervalo de 14-22 e saturado ou com uma ou mais ligações C═C duplas. Exemplos de lipídios capazes de produzir um lipossoma estável, sozinho ou em combinação com outros componentes lipídicos são fosfolipídios, tais como fosfatidilcolina de soja hidrogenada

(HSPC), lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, distearoylphosphatidylethan-olamina (DSPE), dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), palmitoyloteoylphosphatidylcholine (POPC), palmitoyloleoylphosphatidylethanolamine (PAPA) e dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimido-trietilo)ciclo-hexano-1-carboxilato de (DOPE -mal). Lípidos contendo não fósforo adicionais que podem ser incorporados em lipossomas incluem estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, miristato de isopropila, trietanolamina-lauril sulfato, alquil-aril sulfato, acetil palmitato, glicerol ricinoleato, hexadecil estereato, ácido graxo ácido polietilico polimérico, polímeros anfotéricos acrílicos e os lípidos catiónicos mencionados acima (DDAB, DODAC, DMRIE, DMTAP, DOGS, DOTAP (DOTMA), DOSPA, DPTAP, DSTAP, DC-Chol). Lípidos carregados negativamente incluem ácido fosfatídico (PA), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioteoilfosfatidilglicerol e (DOPG), dicetilfosfato que são capazes de formar vesículas. Normalmente, os lipossomas podem ser divididos em três categorias com base no seu tamanho geral e na natureza da estrutura lamelar. As três classificações, conforme desenvolvidas pelo Conferência de Ciências da Academia de Nova York, “Lipossomas e seu uso em Biologia e Medicina”, dezembro de 1977, são vesículas multilamelares (MLVs), pequenas vesículas unilamelares (SUVs) e grandes unilamelares vesículas (LUVs). Os agentes biológicos ativos podem ser encapsulados para administração de acordo com os métodos aqui descritos.

[0115] Uma “micela” é um agregado de moléculas de surfactante dispersas em um colóide líquido. Uma micela típica em solução aquosa forma um agregado com as regiões da “cabeça” hidrofílica em contato com o solvente circundante, sequestrando as regiões hidrofóbicas da cauda no centro da micela. Este tipo de micela é conhecido como micela de fase

normal (micela óleo-em-água). As micelas inversas têm os grupos de cabeça no centro com as caudas estendendo-se para fora (micela de água em óleo). As micelas podem ser utilizadas para anexar um polinucleotídeo, polipeptídeo, anticorpo ou composição aqui descrita para facilitar a entrega eficiente à célula ou tecido alvo.

[0116] A frase "polímero farmaceuticamente aceitável" refere-se ao grupo de compostos que podem ser conjugados a um ou mais polipeptídeos descritos aqui. É contemplado que a conjugação de um polímero ao polipeptídeo é capaz de estender a meia-vida do polipeptídeo *in vivo* e *in vitro*. Exemplos não limitativos incluem polietilenoglicóis, polivinilpirrolidonas, polivinilálcoois, derivados de celulose, poliacrilatos, polimetacrilatos, açúcares, polióis e suas misturas. Os agentes ativos biológicos podem ser conjugados a um polímero farmaceuticamente aceitável para administração de acordo com os métodos aqui descritos.
[0117] Um "veículo de entrega de gene" é definido como qualquer molécula que pode transportar polinucleotídeos inseridos em uma célula hospedeira. Exemplos de veículos de entrega de genes são lipossomas, polímeros biocompatíveis de micelas, incluindo polímeros naturais e polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipeptídeos; polissacarídeos; lipopolissacarídeos; envelopes virais artificiais; partículas de metal; e bactérias ou vírus, tais como baculovírus, adenovírus e retrovírus, bacteriófago, cosmídeo, plasmídeo, vetores fúngicos e outros veículos de recombinação tipicamente usados na técnica que foram descritos para expressão em uma variedade de hospedeiros eucarióticos e procarióticos, e podem ser usados para terapia genética, bem como para expressão simples de proteínas.

[0118] Um polinucleotídeo aqui divulgado pode ser entregue a uma célula ou tecido usando um veículo de entrega de gene. "Entrega de genes", "transferência de genes", "transdução" e semelhantes, conforme usados neste documento, são termos que se referem à introdução de um

polinucleotídeo exógeno (às vezes referido como um “transgene”) em uma célula hospedeira, independentemente do método usado para a introdução. Tais métodos incluem uma variedade de técnicas bem conhecidas, tais como transferência de genes mediada por vetor (por exemplo, infecção/transfecção viral ou vários outros complexos de entrega de genes baseados em proteínas ou lipídios), bem como técnicas que facilitam a entrega de “polinucleotídeos “nus” (como eletroporação, entrega de “arma de gene” e várias outras técnicas usadas para a introdução de polinucleotídeos). O polinucleotídeo introduzido pode ser estável ou transitoriamente mantido na célula hospedeira. A manutenção estável normalmente requer que o polinucleotídeo introduzido contenha uma origem de replicação compatível com a célula hospedeira ou se integre em um replicon da célula hospedeira, como um replicon extracromossômico (por exemplo, um plasmídeo) ou um cromossomo nuclear ou mitocondrial. Vários vetores são conhecidos por serem capazes de mediar a transferência de genes para células de mamíferos, como é conhecido na técnica e descrito aqui.

[0119] Tal como aqui utilizado, o termo “eDNA” refere-se ao DNA extracelular encontrado como um componente para biofilmes patogênicos.

[0120] Um “plasmídeo” é uma molécula de DNA extra-cromossômica separada do DNA cromossômico que é capaz de se replicar independentemente do DNA cromossômico. Em muitos casos, é circular e de fita dupla. Os plasmídeos fornecem um mecanismo para transferência horizontal de genes dentro de uma população de micróbios e, normalmente, fornecem uma vantagem seletiva sob um determinado estado ambiental. Os plasmídeos podem carregar genes que fornecem resistência a antibióticos de ocorrência natural em um nicho ambiental competitivo ou, alternativamente, as proteínas produzidas podem atuar como toxinas em circunstâncias semelhantes.

[0121] “Plasmídeos” usados em engenharia genética são chamados de “vetores de plasmídeo”. Muitos plasmídeos estão disponíveis comercialmente para tais usos. O gene a ser replicado é inserido em cópias de um plasmídeo contendo genes que tornam as células resistentes a antibióticos específicos e um local de clonagem múltipla (MCS, ou poliligante), que é uma região curta contendo vários locais de restrição comumente usados, permitindo a fácil inserção de DNA fragmentos neste local. Outro uso importante dos plasmídeos é a produção de grandes quantidades de proteínas. Nesse caso, os pesquisadores cultivam bactérias contendo um plasmídeo que abriga o gene de interesse. Assim como a bactéria produz proteínas para conferir sua resistência aos antibióticos, também pode ser induzida a produzir grandes quantidades de proteínas a partir do gene inserido. Essa é uma maneira fácil e barata de produzir em massa um gene ou a proteína para a qual ele codifica.

[0122] “Plasmídeos” usados em engenharia genética são chamados de “vetores de plasmídeo”. Muitos plasmídeos estão disponíveis comercialmente para tais usos. O gene a ser replicado é inserido em cópias de um plasmídeo contendo genes que tornam as células resistentes a antibióticos específicos e um local de clonagem múltipla (MCS, ou poliligante), que é uma região curta contendo vários locais de restrição comumente usados, permitindo a fácil inserção de DNA fragmentos neste local. Outro uso importante dos plasmídeos é a produção de grandes quantidades de proteínas. Nesse caso, os pesquisadores cultivam bactérias contendo um plasmídeo que abriga o gene de interesse. Assim como a bactéria produz proteínas para conferir sua resistência aos antibióticos, também pode ser induzida a produzir grandes quantidades de proteínas a partir do gene inserido. Essa é uma maneira fácil e barata de produzir em massa um gene ou a proteína para a qual ele codifica.

[0123] Um "vetor viral" é definido como um vírus ou partícula viral produzida de forma recombinante que compreende um polinucleotídeo a ser entregue em uma célula hospedeira, seja *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Exemplos de vetores virais incluem vetores retrovirais, vetores de adenovírus, vetores de vírus adeno-associados, vetores de alfavírus e semelhantes. Os vetores baseados no vírus do mosaico infeccioso do tabaco (TMV) podem ser usados para fabricar proteínas e foi relatado que expressam Griffithsina em folhas de tabaco (O'Keefe *et al.* (2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106 (15): 6099-6104). Os vetores de alfavírus, como os vetores baseados no vírus Semliki Forest e os vetores baseados no vírus Sindbis, também foram desenvolvidos para uso em terapia genética e imunoterapia. Ver, Schlesinger & Dubensky (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5: 434-439 e Ying *et al.* (1999) Nat. Med. 5(7):823-827. Em aspectos onde a transferência de genes é mediada por um vetor retroviral, um construto de vetor refere-se ao polinucleotídeo que compreende o genoma retroviral ou parte dele, e um gene terapêutico.

[0124] Conforme aqui utilizado, a "transferência de gene mediada por retrovírus" ou a "transdução retroviral" carrega o mesmo significado e se refere ao processo pelo qual um gene ou sequências de ácido nucleico são transferidos de forma estável para a célula hospedeira em virtude da entrada do vírus na célula e integração do seu genoma no genoma da célula hospedeira. O vírus pode entrar na célula hospedeira através de seu mecanismo normal de infecção ou ser modificado de modo que se ligue a um receptor ou ligante da superfície da célula hospedeira diferente para entrar na célula. Conforme aqui utilizado, o vetor retroviral se refere a uma partícula viral capaz de introduzir ácido nucleico exógeno em uma célula através de um mecanismo de entrada viral ou semelhante a vírus.

[0125] Os retrovírus carregam sua informação genética na forma de RNA; entretanto, uma vez que o vírus infecta uma célula, o RNA é transcrito reversamente na forma de DNA que se integra ao DNA genômico da célula

infectada. A forma de DNA integrada é chamada de provírus.

[0126] Em aspectos em que a transferência de genes é mediada por um vetor viral de DNA, como um adenovírus (Ad) ou vírus adeno-associado (AAV), uma construção de vetor se refere ao polinucleotídeo que compreende o genoma viral ou parte dele, e um transgene. Os adenovírus (Ads) são um grupo de vírus homogêneo relativamente bem caracterizado, incluindo mais de 50 serotipos. Ver, por exemplo, Publicação do Pedido Internacional PCT N.º WO 95/27071. Os Ads não requerem integração no genoma da célula hospedeira. Vectores derivados do Ad recombinante, particularmente aqueles que reduzem o potencial de recombinação e geração de vírus de tipo selvagem, também foram construídos. Ver, Publicação de Pedido Internacional PCT N.os WO 95/00655 e WO 95/11984, o AAV de tipo selvagem tem alta infectividade e especificidade integrando-se no genoma da célula hospedeira. Ver, Hermonat & Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6466-6470 e Lebkowski *et al.* (1988) Mol. Célula. Biol. 8: 3988-3996.

[0127] Os vetores que contêm um promotor e um local de clonagem no qual um polinucleotídeo pode ser operativamente ligado são bem conhecidos na técnica. Esses vetores são capazes de transcrever RNA *in vitro* ou *in vivo*, e estão comercialmente disponíveis em fontes como Stratagene (La Jolla, Calif.) E Promega Biotech (Madison, Wis.). A fim de otimizar a expressão e/ou transcrição *in vitro*, pode ser necessário remover, adicionar ou alterar as partes 5' e/ou 3' não traduzidas dos clones para eliminar códons de iniciação de tradução alternativos potencialmente inadequados extras ou outras sequências que podem interferir com ou reduzir a expressão, seja ao nível da transcrição ou tradução. Alternativamente, os locais de ligação ao ribossomo de consenso podem ser inseridos imediatamente 5' do códon de início para aumentar a expressão.

[0128] Os veículos de entrega de genes também incluem complexos de

DNA/lipossoma, micelas e complexos de proteína viral-DNA direcionados. Os lipossomas que também compreendem um anticorpo de direcionamento ou fragmento do mesmo podem ser usados nos métodos aqui divulgados. Além da entrega de polinucleotídeos a uma célula ou população de células, a introdução direta das proteínas aqui descritas na célula ou população de células pode ser feita pela técnica não limitativa de transfecção de proteínas, alternativamente condições de cultura que podem aumentar a expressão e/ou promover a atividade das proteínas aqui divulgadas são outras técnicas não limitantes.

[0129] Tal como aqui utilizado, os termos “anticorpo”, “anticorpos” e “imunoglobulina” incluem anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação ao antígeno ou uma única cadeia do mesmo. Assim, o termo “anticorpo” inclui qualquer proteína ou peptídeo contendo molécula que compreende pelo menos uma parte de uma molécula de imunoglobulina. Os termos “anticorpo”, “anticorpos” e “imunoglobulina” também incluem imunoglobulinas de qualquer isótipo, fragmentos de anticorpos que retêm ligação específica ao antígeno, incluindo, mas sem limitação, Fab, Fab’, $F(ab)_2$, Fv, scFv, dsFv, fragmentos Fd, domínios dAb, VH, VL, VhH e V-NAR; minicorpos, diacorpos, triacorpos, tetracorpos e corpos kappa; fragmentos de anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos e um ou mais isolados. Exemplos de tais incluem, mas sem limitação, uma região determinante de complementaridade (CDR) de uma cadeia pesada ou leve ou uma parte de ligação de ligante desta, uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve, uma estrutura (FR) região, ou qualquer parte da mesma, pelo menos uma parte de uma proteína de ligação, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia única e proteínas de fusão compreendendo uma parte de ligação ao antígeno de um anticorpo e uma proteína não anticorpo. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves da molécula de imunoglobulina contêm um domínio de ligação que

interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos (Abs) podem mediar a ligação da imunoglobulina aos tecidos do hospedeiro. O termo “anti-” quando usado antes de um nome de proteína, anti-DNABII, anti-IHF, anti-HU, anti-OMP P5, por exemplo, refere-se a um anticorpo monoclonal ou policlonal que se liga e/ou tem afinidade com um proteína particular. Por exemplo, “anti-IHF” refere-se a um anticorpo que se liga à proteína IHF. O anticorpo específico pode ter afinidade ou ligar-se a proteínas diferentes da proteína contra a qual foi criado. Por exemplo, o anti-IHF, embora especificamente criado contra a proteína IHF, também pode se ligar a outras proteínas que estão relacionadas por homologia de sequência ou por homologia de estrutura.

[0130] Os anticorpos podem ser policlonais, monoclonais, multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos, desde que exibam a atividade biológica desejada. Os anticorpos podem ser isolados de qualquer fonte biológica adequada, por exemplo, murino, rato, ovelha e canino.

[0131] Conforme usado aqui, “anticorpo monoclonal” se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, pois cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. Os anticorpos podem ser marcados de forma detectável, por exemplo, com um radioisótopo, uma enzima que gera um produto detectável, uma proteína fluorescente e semelhantes. Os anticorpos podem ser ainda conjugados com outras partes, tais como membros de pares de ligação específica, por exemplo, biotina (membro do par de ligação específica de biotina-avidina) e semelhantes. Os anticorpos também podem ser ligados a um suporte sólido, incluindo, mas sem limitação, placas ou grânulos de poliestireno e semelhantes.

[0132] Os anticorpos monoclonais podem ser gerados usando técnicas de hibridoma ou métodos de DNA recombinante conhecidos na técnica.

Um hibridoma é uma célula produzida em laboratório a partir da fusão de um linfócito produtor de anticorpos e uma célula cancerosa não produtora de anticorpos, geralmente um mieloma ou linfoma. Um hibridoma prolifera e produz uma amostra contínua de um anticorpo monoclonal específico. Técnicas alternativas para gerar ou selecionar anticorpos incluem a exposição *in vitro* de linfócitos a antígenos de interesse e a triagem de bibliotecas de exibição de anticorpos em células, fagos ou sistemas semelhantes.

[0133] O termo “anticorpo humano”, tal como aqui utilizado, destina-se a incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos aqui divulgados podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*). No entanto, o termo “anticorpo humano”, tal como aqui utilizado, não se destina a incluir anticorpos nos quais as sequências CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamífero, como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturais humanas. Assim, tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo humano” refere-se a um anticorpo em que substancialmente todas as partes da proteína (por exemplo, CDR, estrutura, C_L, domínios C_H (por exemplo, C_{H1}, C_{H2}, CH_3), dobradiça, (VL, VH)) é substancialmente não imunogênico em humanos, com apenas pequenas alterações ou variações de sequência. Da mesma forma, os anticorpos designados de primata (macaco, babuíno, chimpanzé, etc.), roedor (camundongo, rato, coelho, porquinho-da-índia, hamster e semelhantes) e outros mamíferos designam tais espécies, subgênero, gênero, subfamília, anticorpos específicos da família. Além disso, os anticorpos quiméricos incluem qualquer combinação dos anteriores. Tais mudanças ou variações retêm ou reduzem opcionalmente a imunogenicidade em humanos ou outras espécies em relação aos

anticorpos não modificados. Assim, um anticorpo humano é distinto de um anticorpo quimérico ou humanizado. Salienta-se que um anticorpo humano pode ser produzido por um animal não humano ou célula procariótica ou eucariótica que é capaz de expressar genes de imunoglobulina humana funcionalmente reorganizados (por exemplo, cadeia pesada e/ou cadeia leve). Além disso, quando um anticorpo humano é um anticorpo de cadeia única, ele pode compreender um peptídeo ligante que não é encontrado em anticorpos humanos nativos. Por exemplo, um Fv pode compreender um peptídeo ligante, tal como dois a cerca de oito glicina ou outros resíduos de aminoácidos, que conecta a região variável da cadeia pesada e a região variável da cadeia leve. Tais peptídeos de ligação são considerados de origem humana.

[0134] Tal como aqui utilizado, um anticorpo humano é “derivado de” uma sequência de linha germinativa específica se o anticorpo for obtido de um sistema usando sequências de imunoglobulina humana, por exemplo, imunizando um camundongo transgênico carregando genes de imunoglobulina humana ou por triagem de uma biblioteca de genes de imunoglobulina humana. Um anticorpo humano que é “derivado de” uma sequência de imunoglobulina da linha germinativa humana pode ser identificado como tal comparando a sequência de aminoácidos do anticorpo humano com a sequência de aminoácidos de imunoglobulinas da linha germinativa humana. Um anticorpo humano selecionado é tipicamente pelo menos 90% idêntico na sequência de aminoácidos a uma sequência de aminoácidos codificada por um gene da imunoglobulina da linha germinativa humana e contém resíduos de aminoácidos que identificam o anticorpo humano como sendo humano quando comparado com as sequências de aminoácidos da imunoglobulina da linha germinativa de outras espécies (por exemplo, sequências de linha germinativa murina). Em certos casos, um anticorpo humano pode ser pelo menos 95%, ou mesmo pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% idêntico na sequência de aminoácidos à sequência de

aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa. Normalmente, um anticorpo humano derivado de uma sequência particular da linha germinativa humana exibirá não mais do que 10 diferenças de aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certos casos, o anticorpo humano pode apresentar não mais do que 5, ou mesmo não mais do que 4, 3, 2 ou 1 diferença de aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada pelo gene da imunoglobulina da linha germinativa.

[0135] Um "anticorpo monoclonal humano" refere-se a anticorpos que exibem uma única especificidade de ligação que têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. O termo também se refere a anticorpos humanos recombinantes. Métodos para fazer esses anticorpos são descritos neste documento.

[0136] O termo "anticorpo humano recombinante", tal como aqui utilizado, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para imunoglobulina humana genes ou um hibridoma preparado a partir deles, anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatórios e recombinantes e anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolvem a emenda de sequências de genes de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Esses anticorpos humanos recombinantes têm regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas modalidades, no entanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser

submetidos a mutagênese *in vitro* (ou, quando um animal transgênico para sequências de Ig humana é usado, mutagênese somática *in vivo*) e, assim, as sequências de aminoácidos das regiões VH e VL do Os anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas com as sequências VH e VL da linha germinativa humana, podem não existir naturalmente no repertório da linha germinativa do anticorpo humano *in vivo*. Métodos para fazer esses anticorpos são descritos neste documento.

[0137] Tal como aqui utilizado, os anticorpos quiméricos são anticorpos cujos genes de cadeia leve e pesada foram construídos, normalmente por engenharia genética, a partir de genes de região constante e variável de anticorpo pertencentes a espécies diferentes.

[0138] Tal como aqui utilizado, o termo “anticorpo humanizado” ou “imunoglobulina humanizada” refere-se a um anticorpo quimérico humano/não humano que contém uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que os resíduos de uma região variável do receptor são substituídos por resíduos de uma região variável de uma espécie não humana (anticorpo doador), como camundongo, rato, coelho, ou primata não humano com a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. O anticorpo humanizado pode opcionalmente compreender também pelo menos uma parte de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana, um anticorpo não humano contendo um ou mais aminoácidos em uma região estrutural, uma região constante ou um CDR, que foram substituídos por um aminoácido posicionado correspondentemente de um anticorpo humano. Em geral, espera-se que os anticorpos humanizados produzam uma resposta imune reduzida em

um hospedeiro humano, em comparação com uma versão não humanizada do mesmo anticorpo. Os anticorpos humanizados podem ter substituições conservativas de aminoácidos que não têm substancialmente nenhum efeito na ligação ao antígeno ou outras funções do anticorpo. Os agrupamentos de substituições conservadoras incluem: glicina-alanina, valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, serina-treonina e asparagina-glutamina.

[0139] Os termos “anticorpo policlonal” ou “composição de anticorpo policlonal”, tal como aqui utilizados, referem-se a uma preparação de anticorpos que são derivados de diferentes linhas de células B. Eles são uma mistura de moléculas de imunoglobulina secretadas contra um antígeno específico, cada uma reconhecendo um epítopo diferente.

[0140] Tal como aqui utilizado, o termo “derivado de anticorpo” compreende um anticorpo de comprimento total ou um fragmento de um anticorpo, em que um ou mais dos aminoácidos são quimicamente modificados por alquilação, peguilação, acilação, formação de éster ou formação de amida ou semelhantes, por exemplo, para ligar o anticorpo a uma segunda molécula. Isto inclui, mas sem limitação, anticorpos peguilados, anticorpos peguilados com cisteína e suas variantes.

[0141] Tal como aqui utilizado, o termo “marcador” se refere a um composto ou composição detectável direta ou indiretamente que é conjugado direta ou indiretamente à composição a ser detectada, por exemplo, marcadores de histidina N-terminal (N-His), isótopos magneticamente ativos, por exemplo, ^{115}Sn, ^{117}Sn e ^{119}Sn, um isótopo não radioativo, como ^{13}C e ^{15}N, polinucleotídeo ou proteína, como um anticorpo, de modo a gerar uma composição “rotulada”. O termo também inclui sequências conjugadas com o polinucleotídeo que fornecerá um sinal após a expressão das sequências inseridas, tais como proteína fluorescente verde (GFP) e semelhantes. O marcador pode ser detectável por si mesmo (por exemplo, marcadores de radioisótopo ou marcadores

fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável. Os rótulos podem ser adequados para detecção em pequena escala ou mais adequados para triagem de alto rendimento. Como tal, os marcadores adequados incluem, mas sem limitação, isótopos magneticamente ativos, isótopos não radioativos, radioisótopos, fluorocromos, compostos quimioluminescentes, corantes e proteínas, incluindo enzimas. O marcador pode ser simplesmente detectado ou pode ser quantificado. Uma resposta que é simplesmente detectada geralmente compreende uma resposta cuja existência é meramente confirmada, enquanto uma resposta que é quantificada geralmente compreende uma resposta com um valor quantificável (por exemplo, relatável numericamente), como uma intensidade, polarização e/ou outra propriedade. Em ensaios de luminescência ou fluorescência, a resposta detectável pode ser gerada diretamente usando um luminóforo ou fluoróforo associado a um componente de ensaio realmente envolvido na ligação, ou indiretamente usando um luminóforo ou fluoróforo associado a outro componente (por exemplo, repórter ou indicador). Exemplos de marcadores luminescentes que produzem sinais incluem, mas sem limitação bioluminescência e quimioluminescência. A resposta de luminescência detectável geralmente compreende uma mudança ou uma ocorrência de um sinal de luminescência. Métodos e luminóforos adequados para componentes de ensaio de marcação luminescente são conhecidos na técnica e descritos, por exemplo, em Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª edição). Exemplos de sondas luminescentes incluem, mas sem limitação, aequorina e luciferases.

[0142] Tal como aqui utilizado, o termo “imunoconjugado” compreende um anticorpo ou um derivado de anticorpo associado ou ligado a um segundo agente, tal como um agente citotóxico, um agente detectável, um agente radioativo, um agente de direcionamento, um anticorpo humano,

um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo sintético, um anticorpo semissintético ou um anticorpo multiespecífico.

[0143] Exemplos de marcadores fluorescentes adequados incluem, mas sem limitação, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde Malaquita, estilbeno, Amarelo de Lucifer, *Blue Cascade™* e Vermelho Texas. Outros corantes ópticos adequados são descritos em Haugland, Richard P. (1996) Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6ª ed.).

[0144] Em outro aspecto, o marcador fluorescente é funcionalizado para facilitar a fixação covalente a um componente celular presente na ou sobre a superfície da célula ou tecido, como um marcador de superfície celular. Grupos funcionais adequados incluem, mas sem limitação, grupos isotiocianato, grupos amino, grupos haloacetil, maleimidas, ésteres de succinimidil e halogenetos de sulfonil, todos os quais podem ser usados para anexar o marcador fluorescente a uma segunda molécula. A escolha do grupo funcional do marcador fluorescente dependerá do local de ligação a um ligante, ao agente, ao marcador ou ao segundo agente de marcação.

[0145] "Células eucarióticas" compreendem todos os reinos da vida, exceto monera. Eles podem ser facilmente distinguidos por meio de um núcleo ligado à membrana. Animais, plantas, fungos e protistas são eucariotos ou organismos cujas células são organizadas em estruturas complexas por membranas internas e um citoesqueleto. A estrutura mais característica ligada à membrana é o núcleo. A menos que especificamente recitado, o termo "hospedeiro" inclui um hospedeiro eucariótico, incluindo, por exemplo, levedura, planta superior, inseto e células de mamífero. Exemplos não limitativos de células eucarióticas ou hospedeiros incluem símios, bovinos, porcinos, murinos, ratos, aves, reptilianos e humanos.

[0146] “Células procarióticas” que geralmente carecem de um núcleo ou de qualquer outra organela ligada à membrana e são divididas em dois domínios, bactérias e arqueas. Além do DNA cromossômico, essas células também podem conter informações genéticas em um loop circular denominado episssoma. As células bacterianas são muito pequenas, aproximadamente do tamanho de uma mitocôndria animal (cerca de 1-2 µm de diâmetro e 10 µm de comprimento). As células procarióticas apresentam três formas principais: em forma de bastonete, esférica e espiral. Em vez de passar por processos de replicação elaborados, como os eucariotos, as células bacterianas se dividem por fissão binária. Os exemplos incluem, mas sem limitação bactérias *Bacillus*, bactéria *E. coli* e bactéria *Salmonella*.

[0147] Um antígeno “nativo” ou “natural” é um polipeptídeo, proteína ou um fragmento que contém um epítopo, que foi isolado de uma fonte biológica natural, e que pode se ligar especificamente a um receptor de antígeno, em particular um receptor de antígeno de célula T (TCR), em um assunto.

[0148] Os termos “antígeno” e “antigênico” referem-se a moléculas com a capacidade de serem reconhecidas por um anticorpo ou de outra forma agirem como um membro de um par anticorpo-ligante. “Ligação específica” refere-se à interação de um antígeno com as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves de imunoglobulina. A ligação anticorpo-antígeno pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. O versado na técnica entenderá que macromoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, ácidos graxos, lipídios, lipopolissacarídeos e polissacarídeos têm o potencial para atuar como um antígeno. O versado na técnica entenderá ainda que os ácidos nucleicos que codificam uma proteína com potencial para atuar como um ligante de anticorpo necessariamente codificam um antígeno. O especialista compreenderá ainda que os antígenos não estão limitados a moléculas de comprimento total, mas também podem incluir moléculas

parciais. O termo “antigênico” é uma referência adjetiva a moléculas com propriedades de um antígeno. O termo abrange substâncias que são imunogênicas, isto é, imunogênios, bem como substâncias que induzem insensibilidade imunológica, ou anergia, isto é, anergênios.

[0149] Um “antígeno alterado” é aquele que tem uma sequência primária que é diferente daquela do antígeno de tipo selvagem correspondente. Os antígenos alterados podem ser produzidos por métodos sintéticos ou recombinantes e incluem, mas sem limitação, peptídeos antigênicos que são modificados diferencialmente durante ou após a tradução, por exemplo, por fosforilação, glicosilação, reticulação, acilação, clivagem proteolítica, ligação a um anticorpo molécula, molécula de membrana ou outro ligante. (Ferguson *et al.* (1988) Ann. Rev. Biochem. 57: 285-320). Um antígeno sintético ou alterado aqui divulgado destina-se a se ligar ao mesmo TCR que o epítopo natural.

[0150] “Resposta imune” refere-se amplamente às respostas específicas do antígeno de linfócitos a substâncias estranhas. Os termos “imunógeno” e “imunogênico” referem-se a moléculas com a capacidade de induzir uma resposta imune. Todos os imunógenos são antígenos, entretanto, nem todos os antígenos são imunogênicos. Uma resposta imune divulgada neste documento pode ser humoral (via atividade de anticorpo) ou mediada por células (via ativação de célula T). A resposta pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*. O perito na arte compreenderá que uma variedade de macromoléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, ácidos gordos, lípidos, lipopolissacáridos e polissacáridos têm o potencial de serem imunogênicos. O versado na técnica entenderá ainda que os ácidos nucleicos que codificam uma molécula capaz de induzir uma resposta imune necessariamente codificam um imunógeno. O especialista compreenderá ainda que os imunógenos não estão limitados a moléculas de comprimento total, mas podem incluir moléculas parciais.

[0151] O termo “imunidade passiva” refere-se à transferência de

imunidade de um sujeito para outro por meio da transferência de anticorpos. A imunidade passiva pode ocorrer naturalmente, como quando os anticorpos maternos são transferidos para o feto. A imunidade passiva também pode ocorrer artificialmente como quando as composições de anticorpos são administradas a indivíduos não imunes. Os doadores e receptores de anticorpos podem ser seres humanos ou não humanos. Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais, podem ser gerados *in vitro* ou *in vivo* e podem ser purificados, parcialmente purificados ou não purificados, dependendo da modalidade. Em algumas modalidades aqui descritas, a imunidade passiva é conferida a um sujeito em necessidade por meio da administração de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que reconhecem ou se ligam especificamente a um antígeno particular. Em algumas modalidades, a imunidade passiva é conferida através da administração de um polinucleotídeo isolado ou recombinante que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que reconhece especificamente ou se liga a um antígeno particular.

[0152] No contexto desta divulgação, um “ligante” é um polipeptídeo. Em um aspecto, o termo “ligante”, tal como aqui utilizado, refere-se a qualquer molécula que se liga a um local específico em outra molécula. Em outras palavras, o ligante confere a especificidade da proteína em uma reação com uma célula imune efetora ou um anticorpo para uma proteína ou DNA para uma proteína. Em um aspecto, é o local do ligante dentro da proteína que se combina diretamente com o local de ligação complementar na célula imune efetora.

[0153] Conforme usado neste documento, o termo “induzir uma resposta imune em um sujeito” é um termo bem compreendido na técnica e pretende que um aumento de pelo menos cerca de 2 vezes, pelo menos cerca de 5 vezes, pelo menos cerca de 10 vezes, pelo menos cerca de 100 vezes, pelo menos cerca de 500 vezes, ou pelo menos cerca de 1000 vezes

ou mais em uma resposta imune a um antígeno (ou epítopo) pode ser detectado ou medido, após a introdução do antígeno (ou epítopo) no sujeito, em relação à resposta imune (se houver) antes da introdução do antígeno (ou epítopo) no sujeito. Uma resposta imune a um antígeno (ou epítopo) inclui, mas sem limitação, produção de um anticorpo específico do antígeno (ou específico do epítopo) e produção de uma célula imune que expressa em sua superfície uma molécula que se liga especificamente a um antígeno (ou epítopo). Os métodos para determinar se uma resposta imune a um determinado antígeno (ou epítopo) foi induzida são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o anticorpo específico do antígeno pode ser detectado usando qualquer um de uma variedade de imunoensaios conhecidos na técnica, incluindo, mas sem limitação, ELISA, em que, por exemplo, a ligação de um anticorpo em uma amostra a um antígeno imobilizado (ou epítopo) é detectado com um segundo anticorpo marcado de forma detectável (por exemplo, anticorpo Ig de camundongo anti-humano marcado com enzima).

[0154] Conforme usado neste documento, “suporte de fase sólida” ou “suporte sólido”, usado de forma intercambiável, não está limitado a um tipo específico de suporte. Em vez disso, um grande número de suportes estão disponíveis e são conhecidos por aqueles versados na técnica. Os suportes de fase sólida incluem gel de sílica, resinas, filmes plásticos derivados, contas de vidro, algodão, contas de plástico, géis de alumina. Conforme usado neste documento, “suporte sólido” também inclui matrizes de apresentação de antígenos sintéticos, células e lipossomas. Um suporte de fase sólida adequado pode ser selecionado com base no uso final desejado e na adequação para vários protocolos. Por exemplo, para a síntese de peptídeos, o suporte de fase sólida pode se referir a resinas, tais como poliestireno (por exemplo, PAM-resina obtida de Bachem Inc., Peninsula Laboratories, etc.), resina POLYHIPE® (obtida de Aminotech, Canadá), resina de poliamida (obtido de Peninsula Laboratories), resina de poliestireno enxertada com polietilenoglicol

(TentaGel®, Rapp Polymere, Tubingen, Germany) ou resina de polidimetilacrilamida (obtida de Milligen/Biosearch, Calif.).

[0155] Um exemplo de um suporte de fase sólida inclui vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, náilon, amilases, celuloses naturais e modificadas, poliacrilamidas, gabros e magnetita. A natureza do transportador pode ser solúvel até certo ponto ou insolúvel. O material de suporte pode ter virtualmente qualquer configuração estrutural possível, desde que a molécula acoplada seja capaz de se ligar a um polinucleotídeo, polipeptídeo ou anticorpo. Assim, a configuração do suporte pode ser esférica, como em um cordão, ou cilíndrica, como na superfície interna de um tubo de ensaio, ou a superfície externa de uma haste. Alternativamente, a superfície pode ser plana, como uma folha, tira de teste, etc. ou, alternativamente, contas de poliestireno. Os versados na técnica conhecerão muitos outros transportadores adequados para a ligação de anticorpo ou antígeno, ou serão capazes de determinar o mesmo por meio de experimentação de rotina.

[0156] O termo “modular uma resposta imune” inclui induzir (aumentar, desencadear) uma resposta imune; e reduzir (suprimir) uma resposta imune. Um método imunomodulatório (ou protocolo) é aquele que modula uma resposta imune em um sujeito.

Modos de realização da divulgação

I. A Estrutura do Biofilme e a Doença

[0157] O reservatório de bactérias que sustentam infecções bacterianas crônicas e recorrentes reside em um biofilme, uma comunidade de bactérias que aderiram a uma superfície e, quando neste estado, podem resistir à depuração pelo sistema imunológico do hospedeiro, bem como por antimicrobianos. Na verdade, as bactérias em um estado de biofilme são tipicamente > 1000 vezes mais resistentes a antibióticos do que as

mesmas bactérias em um estado de vida livre ou planctônico. Ceri *et al.* (1999) J Clin Microbiol. 37(6):1771-6. A capacidade das bactérias do biofilme de resistir à depuração deve-se principalmente à matriz semipermeável autofabricada ou às substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que atuam como uma barreira física aos riscos ambientais, bem como cria condições para uma fisiologia alterada que limita o metabolismo para intensificar este estado de resistência. Embora os constituintes da EPS sejam específicos para cada bactéria e incluam proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos, a natureza da EPS precisa ser suficientemente propícia para que os gêneros bacterianos em geral interajam de forma produtiva (por exemplo, como parceiros metabólicos). Para este fim, várias descobertas recentes levaram à possibilidade de uma estrutura de EPS universal subjacente comum a todas as eubactérias. Whitchurch e colegas (Whitchurch *et al.* (2002) Science. 295 (5559)) mostraram que o DNA extracelular (eDNA) era um constituinte comum da EPS e que o tratamento de bactérias com DNase era suficiente para prevenir a formação de biofilme. Embora este resultado tenha sido replicado para vários gêneros, o uso de DNase falhou em tratar biofilmes existentes mais de um ou dois dias após a semeadura de biofilme, apesar do fato de que o eDNA é evidente em biofilmes ao longo de seu ciclo de vida. Separadamente, os Requerentes identificaram previamente as proteínas DNABII, a única família de proteínas associadas a nucleoides (NAPs) que é comum a todas as eubactérias, como sendo um componente necessário da EPS dependente de eDNA. Na verdade, os anticorpos dirigidos contra as proteínas DNABII titulam as proteínas DNABII do meio em massa e, assim, mudam o equilíbrio das proteínas DNABII do estado ligado ao eDNA para o estado não ligado, o que resulta em colapso catastrófico de todos os biofilmes bacterianos testados até o momento, e inclui biofilmes de espécies mistas. Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Gustave *et al.* (2013)

J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny *et al.* (2016) EBioMedicine. 10:33-44. É importante ressaltar que, ao contrário da DNase, o tratamento com anticorpo dirigido contra proteínas DNABII é eficaz em *todos os estágios do desenvolvimento do biofilme,* o que demonstra que o EPS dependente de eDNA é uma estrutura crítica, independentemente da idade do biofilme. Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58. Apesar de saber que o eDNA e os membros da família DNABII são componentes essenciais da EPS, compreender a estrutura completa da EPS tem se mostrado difícil; as proteínas DNABII e DNA são insuficientes para recapitular as estruturas EPS funcionais *in vitro*. Os Requerentes descrevem aqui que para múltiplos patógenos humanos que conforme o biofilme amadurece, a EPS dependente de eDNA é dependente de ambas as proteínas DNABII, bem como de poliaminas de modo que o eDNA muda de uma conformação B-DNA para uma Z-DNA. Este último resultado é particularmente intrigante, pois provavelmente explica a falha da DNase em interromper biofilmes maduros; nucleases apenas clivam a forma B mais clássica de DNA.

Nucleoide bacteriano intracelular

[0158] O DNA dentro da bactéria é altamente estruturado e facilita a regulação de todas as formas de processos de ácido nucleico que incluem a replicação, reparo, transcrição e recombinação do DNA. Ao contrário das células eucarióticas, as bactérias são desprovidas de histonas. Em vez disso, o DNA bacteriano é estruturado em parte por uma classe de proteínas chamadas proteínas associadas a nucleoides (NAPs). As NAPs se ligam coletivamente ao DNA para criar estruturas funcionais. Dillon *et al.* (2010) Nat Rev Microbiol. 8(3):185-95. Entre os vários membros da NAP que existem entre os gêneros, apenas a família DNABII é ubíqua entre todas as eubactérias. Dey *et al.* (2017) Mol Phylogenet Evol. 107:356-66. A família de proteínas DNABII funciona como dímeros (homodímeros ou heterodímeros, dependendo da espécie) e inclui as

proteínas semelhantes às histonas HU e IHF. HU se liga fracamente e não especificamente a e dobra o DNA de fita dupla (dsDNA), mas tem uma afinidade muito maior para dsDNA3 pré-dobrado ou estruturado. IHF como HU se liga e dobra o DNA com uma forte preferência por DNA pré-dobrado/estruturado. Ao contrário de HU, IHF é expresso apenas por proteobactérias e também tem preferência por uma sequência de consenso de DNA específica. Swinger *et al.* (2004) Curr Opin Struct Biol. 14(1):28-35.

Núcleo bacteriano extracelular

[0159] O DNA extracelular (eDNA) é conhecido por ter um papel biológico desde a descoberta de que o 'princípio de transformação' era o resultado do DNA. Avery *et al.* (1944) J Exp Med. 79(2):137-58. Na verdade, o eDNA também é crítico para a matriz extracelular (substâncias poliméricas extracelulares, EPS) de biofilmes bacterianos. Gunn *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46. No entanto, a estrutura do eDNA do biofilme e a importância dessa estrutura para a função do eDNA ainda não foram investigadas.

Infecções crônicas e recorrentes são o resultado de biofilmes bacterianos

[0160] Embora os biofilmes sejam ainda mais distintos das bactérias planctônicas por sistemas de comunicação e transporte intercelulares, sua característica mais distintiva é a EPS autofabricada, que protege as bactérias do biofilme residente, atuando como uma barreira semipermeável e criando um ambiente para alterações/metabolismo lento; na verdade, as bactérias do biofilme são 1000 vezes mais resistentes a antibióticos do que suas contrapartes planctônicas. Ceri *et al.* (1999) J Clin Microbiol. 37(6):1771-6. Curiosamente, a EPS de cada bactéria é distinta e consiste em uma variedade de proteínas, lipídeos, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Gunn *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46. No entanto, embora os biofilmes possam consistir em

uma única espécie, comumente em infecções crônicas e invariavelmente no ambiente, eles são compostos por vários gêneros e, como tal, precisam ser capazes de interagir produtivamente (por exemplo, coagregação com parceiros metabólicos específicos Stacy *et al.* (2016) Nat Rev Microbiol. 14(2):93-105; Wolcott *et al.* (2013) Clin Microbiol Infect. 19(2):107-12). Este conceito de comunidade implica que, apesar da variação da composição da EPS, cada EPS deve ser suficientemente flexível para permitir que bactérias divergentes interajam dentro do biofilme e, além disso, sugere que a EPS do biofilme provavelmente tem uma estrutura subjacente universal.

EPS dependente de eDNA tem as qualidades de uma arquitetura subjacente universal

[0161] Vários grupos examinaram o eDNA associado a biofilmes bacterianos de ambos os gêneros humanos e ecológicos e observaram uma estrutura de andaime (**FIG**. **1A**). Jurcisek *et al.* (2017) Proc Natl Acad Sci U S A. 114(32):E6632-E41; Sena-Velez *et al.* (2016) PLoS One. 11(6):e0156695; Wang *et al.* (2015) Environ Microbiol Rep. 7(2):330-40. Whitchurch e colegas mostraram pela primeira vez que os biofilmes de *P. aeruginosa* poderiam ser evitados pelo tratamento com desoxinuclease I (DNase) (Whitchurch *et al.* (2002) Science. 295(5559)), que indica que o eDNA é um componente estrutural crítico da EPS. Enquanto a DNase pode inibir a formação precoce de biofilme em muitos gêneros (Frederiksen *et al.* (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4; Martins *et al.* (2012) Mycoses. 55(1):80-5; Hymes *et al.* (2013) J Infect Dis. 207(10):1491-7)), os biofilmes tornam-se recalcitrantes à DNase ao longo do tempo, apesar do fato de que o eDNA persiste claramente conforme o biofilme amadurece. Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Hall-Stoodley *et al.* (2008) BMC Microbiol. 8:173; Izano *et al.* (2009) Microb Pathog. 46(4):207-13; Kaplan *et al.* (2012) J Antibiot (Tokyo). 65(2):73-7; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Tetz *et al.* (2010)

DNA Cell Biol. 29(8):399-405. Embora esse resultado tenha sido frequentemente interpretado como significando que o eDNA não é mais importante para a integridade estrutural da EPS, os Requerentes mostraram que não apenas o eDNA persiste, mas se torna a estrutura básica da EPS. Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58.

A família de proteínas DNABII é o eixo que mantém a integridade estrutural do biofilme EPS com andaime de eDNA

[0162] Os requerentes mostraram anteriormente que as proteínas DNABII ubíquas e provavelmente *nenhum* outro NAP (Devaraj et al (2017) Microbiologyopen.), são constituintes estruturais do eDNA e que, uma vez removidos, a estrutura do eDNA é interrompida. Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30. Na verdade, as proteínas DNABII foram encontradas para se ligar especificamente aos vértices (DNA pré-dobrado) do andaime de eDNA de biofilmes formados *in vivo,* enquanto os anticorpos dirigidos contra as proteínas DNABII são suficientes para minar a estrutura do EPS com andaime de eDNA e como um resultado causa o colapso catastrófico de biofilmes de uma e várias espécies para todas as espécies que os Requerentes examinaram (Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30), independentemente da maturidade do biofilme. Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58. Essa interrupção libera bactérias residentes em um estado planctônico e, portanto, antimicrobiano e imunossensível (Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37;

Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58), o que demonstra a importância e universalidade dessa família de proteínas na estrutura do biofilme. Dadas as interações conhecidas da família DNABII com DNA, foi inesperado que os Requerentes foram incapazes de criar condições apenas com DNA e proteínas DNABII que recapitulam as estruturas tridimensionais semelhantes a andaimes observadas em biofilmes bacterianos.

As poliaminas são ubíquas intra e extracelularmente e são necessárias para a estrutura EPS com andaime de eDNA dos biofilmes

[0163] As poliaminas são normalmente moléculas orgânicas curtas que contêm várias aminas primárias que são carregadas positivamente (básicas) em pH neutro e são comumente derivadas por descarboxilação de aminoácidos (**FIG**. **1B**). Michael *et al.* (2016) Biochem J. 473(15):2315-29. As poliaminas são ubíquas na natureza, encontradas em concentrações tão altas quanto mM tanto intra quanto extracelularmente (Tabor *et al.* (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99) sendo a espermidina, a espermina e a putrescina as mais abundantes. Embora as poliaminas estejam envolvidas em vários processos na fisiologia bacteriana, talvez sejam mais importantes para a EPS com andaime de eDNA por 5 razões. Primeiro, eles se ligam ao DNA e neutralizam a carga negativa da estrutura do fosfato e, como resultado, alteram a estrutura do DNA. Bachrach *et al.* (2005) Curr Protein Pept Sci. 6(6):559-66; Pasini *et al.* (2014) Amino Acids. 46(3):595-603. Em segundo lugar, enquanto as poliaminas tendem a promover interações proteína-DNA em baixas concentrações (mM), elas tendem a interferir em concentrações mais altas (mM), sendo uma exceção as interações DNABII-DNA que fazem com que o DNA forme fibras grossas. Sarkar *et al.* (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar *et al.* (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951 61. Terceiro, descobriu-se que a síntese de poliamina é induzida durante a formação de biofilme, com alguns desses efeitos ocorrendo

extracelularmente (embora apenas examinados até agora na membrana bacteriana). Wilton *et al.* (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60(1):544-53. Em quarto lugar, experimentos de microscopia de força atômica (AFM) para visualizar misturas de poliaminas e DNA revelam uma estrutura altamente semelhante aos andaimes de eDNA de biofilme (**FIG**. **1C**). Finalmente, as poliaminas podem induzir uma conversão de DNA de forma B nativo em DNA de forma Z em sequências propensas em concentrações fisiológicas (100 μM). Thomas *et al.* (1986) Nucleic Acids Res. 14(16):6721-33; Thomas *et al.* (1988) J Mol Biol. 201(2):463-7.

A conversão de B-DNA em Z-DNA pode ser um novo meio para tornar a nuclease de EPS com andaime de eDNA resistente e criar um material estrutural estável

[0164] B-DNA e Z-DNA são conformações distintas de dsDNA que existem em equilíbrio, com B-DNA predominando na maioria das condições fisiológicas. Alternando purinas e pirimidinas (particularmente dGdC) são mais propensas a existir como Z-DNA em alto sal (mono molar ou cátions divalentes) ou sob superenrolamento negativo. Pohl *et al.* (1983) Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 47 Pt 1:113-7; Pohl *et al.* (1986) Proc Natl Acad Sci U S A. 83(14):4983-7. No último caso, as regiões propensas a formar Z-DNA podem ser justapostas ao lado do B-DNA brevemente durante a transcrição quando o superenrolamento negativo é induzido transitoriamente. Rahmouni *et al.* (1992) Mol Microbiol. 6(5):569-72. Enquanto as bases do B-DNA adotam uma hélice para a direita (10 bp/volta), o Z-DNA forma uma hélice para a esquerda (12 bp/volta). Jovin *et al.* (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. O B-DNA tem duas ranhuras (maior e menor), e a maioria das proteínas que interagem reconhece/liga na ranhura principal devido ao seu tamanho maior e doadores e aceitadores de ligações de hidrogênio discriminantes para cada base de nucleotídeo. Em contraste, a ranhura maior está ausente no Z-DNA, e a maioria desses contatos de ligação são encontrados na face

convexa. Jovin *et al.* (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60. O Z-DNA possui uma única ranhura que corresponde à ranhura menor do B-DNA. Curiosamente, as proteínas DNABII são uma das poucas proteínas de ligação ao DNA que se ligam na ranhura menor (Kim *et al.* (2014) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 70(Pt 12):3273-89), sugerindo que eles podem se ligar a Z-DNA. A mudança de eDNA de B-DNA para Z-DNA é consistente com 4 observações do EPS com andaime de eDNA. Primeiro, a mudança para Z-DNA ocorre sob condições presentes no biofilme EPS; as sequências propensas mudarão para Z-DNA na presença de concentrações fisiológicas (100 mM) de algumas poliaminas (espermidina e espermina). Em segundo lugar, o Z-DNA tende a se agregar e formar fibras. Chaires *et al.* (1988) J Biomol Struct Dyn. 5(6):1187-207. A neutralização de carga negativa forte (por exemplo, poliaminas) da estrutura do fosfato favorece o Z-DNA, uma vez que os fosfatos na estrutura do Z-DNA estão mais próximos do que no B-DNA, mas também é permissiva para a agregação do DNA. Terceiro, o Z-DNA é mais rígido do que B-DNA com quase um aumento de 3 vezes no comprimento de persistência (Thomas *et al.* (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1919-30) consistente com as fibras retas que os Requerentes observam na estrutura de eDNA (**FIG**, **1A**, **FIG**. **2**, **FIG**.**3**). E, finalmente, o Z-DNA é resistente à nuclease. Ao contrário das proteínas de ligação de B-DNA canônicas, existem apenas algumas proteínas conhecidas que reconhecem Z-DNA (Athanasiadis *et al.* (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80) (no entanto, anticorpos discriminantes Z- vs B-DNA estão disponíveis). Bergen *et al.* (1987) J Immunol. 139(3):743-8. Curiosamente, as proteínas de ligação ao Z-DNA são homólogas, ligam-se ao Z-DNA sobre o B-DNA com afinidade de 1.000 a 10.000 vezes maior (Herbert *et al.* (1996) J Biol Chem. 271(20):11595-8), induzem a conformação Z-DNA em sequências propensas e, pelo menos no caso da ZBP1, fazem parte do sistema imune inato que detecta a presença de DNA microbiano. Athanasiadis *et al.* (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80. É importante notar que as proteínas que usam B-DNA como substrato

(por exemplo, nucleases) falham em reconhecer e, portanto, funcionar na mesma sequência de DNA na configuração Z, apesar do fato de que o par de bases de Watson Crick é preservado.

II. Uma Abordagem Tripartida

[0165] Os Requerentes demonstraram anteriormente que as interações eDNA-DNABII servem para manter a integridade estrutural do biofilme EPS (Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Devaraj *et al.* (2017) Microbiologyopen.; Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58), e que interromper essas interações leva a resultados positivos *ex vivo* (Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9) e *in vivo* (Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37; Novotny *et al.* (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Freire *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74-88). Embora tenha sido demonstrado que as proteínas DNA e DNABII são necessárias, elas não são suficientes para recapitular a arquitetura de andaime de EPS. É divulgado neste documento um andaime tripartido dependente de eDNA (TEDS) da EPS dependente de eDNA-DNABII que se baseia na presença e localização relativa de (1) eDNA, (2) proteínas DNABII e o constituinte EPS recentemente descoberto, (3) poliaminas.

[0166] Em um aspecto, os Requerentes mostram que, além das proteínas eDNA e DNABII, as poliaminas são um componente essencial da estrutura TEDS dos biofilmes bacterianos. Em segundo lugar, os requerentes mostram que, juntos, todos os três desses componentes facilitam a formação de um EPS universal que pode promover interações produtivas entre gêneros bacterianos no estado de biofilme protetor. Terceiro, usando esses componentes, os Requerentes definem e recapitulam esta estrutura universal e fornecem evidências consistentes com as observações de fibras de DNA de fita dupla espessas, indução de

um estado resistente à nuclease e demonstram se este estado requer Z-DNA como um ponto final estrutural. Por fim, oferece intervenções diagnósticas e terapêuticas que enfocam a própria estrutura do TEDS como alvo de intervenção.

A. Poliaminas

As poliaminas funcionam em conjunto com as proteínas DNABII para direcionar a montagem de andaimes de eDNA

[0167] O modelo de chinchila de otite média aguda causada por NTHI recapitula fielmente o curso e a fisiopatologia da doença humana (Bakaletz *et al.* (2009) Expert Rev Vaccines. 8(8):1063-82) e é dependente de um biofilme recalcitrante no ouvido médio. Usando este modelo, os Requerentes mostraram anteriormente que as proteínas DNABII se associam com eDNA, que se localizam nos vértices das fitas de eDNA (**FIG**. **1A**) (Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37) e essas fitas de eDNA parecem surpreendentemente semelhantes às poliaminas visualizadas com DNA por AFM (**FIG**. **1C**). Iacomino *et al.* (2011) Biomacromolecules. 12(4):1178-86. As proteínas DNABII ligam-se ao DNA na presença de concentrações mM de espermidina *in vitro* (**FIG**. **2B**), o que levou à investigação da potencial interação entre as proteínas DNABII e poliaminas para produzir uma estrutura de andaime de eDNA de biofilme. Os requerentes realizaram microscopia confocal de varredura a laser de imunofluorescência (CLSM) em seções de biofilmes da mucosa da orelha média fixados e incorporados para visualizar as poliaminas interagindo com o eDNA dentro do biofilme EPS, como os requerentes observaram anteriormente para as proteínas DNABII. Imagens de imunofluorescência mostram que eDNA e poliaminas colocalizam ao longo de fibras que estão presentes dentro do biofilme da mucosa (**FIG**. **2A**) e são visualmente semelhantes aos observados por Hud e colegas de trabalho com proteínas DNABII e poliaminas *in vitro* (Sarkar *et al.* (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar *et al.* (2007) Nucleic Acids Res.

35(3):951 61) (**FIG**. **2B**).

A biossíntese de poliamina é necessária para a estrutura do biofilme

[0168] Os Requerentes investigaram se o inibidor da biossíntese de poliamina de ampla ação diciclo-hexilamina (DCHA) alteraria a biogênese do biofilme NTHI *in vitro*. A DCHA inibe a espermidina sintase (Paulin *et al.* (1986) Antonie Van Leeuwenhoek. 52(6):483-90; Pegg *et al.* (1983) FEBS Lett. 155(2):192-6), a enzima que catalisa a conversão de putrescina em espermidina. Embora a DCHA não tenha afetado o crescimento do NTHI (dados não mostrados), DCHA inibiu a biogênese do biofilme *in vitro*, diminuindo a espessura média e a biomassa conforme determinado pela análise COMSTAT (Heydorn *et al.* (2000) Microbiology. 146 (Pt 10):2395-407) de imagens CLSM de biofilmes NTHI corados com LIVE/DEAD® (**FIG**. **3A**). Além disso, os Requerentes descobriram que a DCHA inibiu a produção do andaime de eDNA no desenvolvimento inicial do biofilme (**FIG**. **3B**), o que sugere que a biossíntese de poliamina é uma etapa necessária na formação do biofilme. Em apoio a estes resultados, os Requerentes observaram que a DCHA reduziu a incorporação de poliamina extracelular no biofilme EPS por imunofluorescência (**FIG**. **3C**), e que os defeitos na biogênese do biofilme poderiam ser compensados pela adição de espermidina exógena (**FIG**. **3A**). Juntos, esses resultados revelam que a incorporação de poliamina na EPS é crítica para o desenvolvimento e a função do andaime de eDNA no suporte ao crescimento robusto de biofilme.

Anti-DNABII interrompe a estrutura de DNA dependente de DNABII-poliamina

[0169] A imunofluorescência foi usada para determinar se as proteínas DNABII são incorporadas em estruturas miméticas de EPS. Espermidina (300 μM) e HU (1 μM) foram incubados com DNA genômico (2 μg/ml). Estruturas miméticas de EPS foram então sondadas com IgGs naïve

(controle) ou anti-DNABII, um anticorpo secundário fluorescente, corado com DAPI e fotografado por CLSM. As proteínas DNABII foram totalmente incorporadas na estrutura EPS (**FIG**. **4A**). Em seguida, estruturas miméticas de EPS foram formadas, tratadas com anticorpos anti-DNABII, coradas com DAPI e fotografadas por CLSM. O sequestro de proteínas DNABII com anticorpos anti-DNABII dos miméticos EPS reduziu drasticamente a abundância e o tamanho das estruturas agregadas (**FIG**. **4B**), o que confirmou ainda a incorporação de DNABII e sua importância para a estabilidade estrutural do DNA.

A ruptura do biofilme NTHI pelo trocador de cátions P11 pode ser evitada pela adição de DNABII (HU) exógeno e espermidina

[0170] Fosfocelulose (P11) é uma resina carregada negativamente que tem alta afinidade para moléculas carregadas positivamente, como poliaminas e proteínas DNABII. Para determinar o efeito do sequestro de P11 dessas moléculas na formação de biofilme bacteriano, os Requerentes utilizaram um sistema transwell. O crescimento de NTHI foi iniciado na câmara basolateral enquanto P11 (1% p/v) foi adicionado à câmara apical na semeadura. Às 16 h, os biofilmes foram lavados e corados com LIVE/DEAD®, fotografados com CLSM e analisados com COMSTAT. P11 reduziu significativamente a espessura média e a biomassa (**FIG**. **5**). Para determinar se a depleção do cátion P11 incluiu poliaminas e/ou proteínas DNABII, o crescimento de NTHI foi iniciado na câmara basolateral com a adição exógena de 1 mM de espermidina e 1 μM de HU, enquanto P11 foi adicionado a 1% p/v à câmara apical. Tanto a espermidina quanto a HU eram componentes estruturais necessários da matriz do biofilme e apenas juntos evitavam a ruptura do biofilme por P11 (**FIG**. **5**); individualmente HU e espermidina foram insuficientes (dados não mostrados).

DNase é incapaz de interromper biofilmes bacterianos patogênicos maduros

[0171] Os candidatos avaliaram o efeito antibiofilme de Pulmozyme®, uma DNase humana recombinante que é usada em conjunto com terapias padrão para o tratamento de pacientes com fibrose cística (CF) para melhorar a função pulmonar. Yang *et al.* (2017) Paediatr Respir Rev. 21:65-7. Pulmozyme® foi adicionado na semeadura (prevenção de biofilme) ou a biofilmes pré-formados (ruptura de biofilme) (**FIG**. **6**). Os biofilmes resultantes foram corados com LIVE/DEAD® e avaliados usando análises CLSM e COMSTAT. A adição de DNase na semeadura resultou em uma redução significativa na espessura média e biomassa de biofilmes NTHI e UPEC em comparação com biofilmes não tratados (**FIG**. **6**). No entanto, a DNase foi incapaz de interromper os biofilmes maduros (**FIG**. **6**), o que sugere que o eDNA perde a suscetibilidade à digestão com nuclease à medida que os biofilmes se desenvolvem. Os requerentes propõem que, como biofilmes maduros, o eDNA é estericamente protegido de nucleases e/ou o eDNA assume uma nova estrutura, tornando-o recalcitrante à digestão por nuclease.

Proteínas DNABII e poliaminas interagem sinergicamente para conferir resistência de nuclease ao DNA

[0172] A imunofluorescência de biofilmes NTHI sondados com anticorpos anti-DNABII e anti-espermidina indicou que as poliaminas colocalizam com proteínas *DNABII in vitro* (**FIG**. **7A**) e *in vivo* (**FIG**. **7B**). Os Requerentes levantaram a hipótese de que DNABII e poliaminas interagem com eDNA sinergicamente para conferir resistência à DNase a biofilmes maduros. Para testar o sinergismo *in vitro*, os Requerentes incubaram o DNA genômico NTHI (gDNA) com espermidina (10, 20, 50 ou 100 μM) na presença ou ausência de HU (50 ou 100 nM) e DNase (0,5 unidades). A degradação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose e iluminação UV. Enquanto a espermidina (> 100 μM) e HU (1 μM) protegeram o gDNA individualmente, níveis mais baixos misturados de espermidina (<50 μM) e HU (<100 nM) inibiram a digestão do gDNA

sinergicamente (**FIG**. **7C**), sugerindo que a resistência à nuclease se deve à combinação de proteínas DNABII e poliaminas dentro da matriz de biofilme. Em seguida, os Requerentes queriam testar se as estruturas miméticas de EPS eram resistentes à DNase. HU (1 μM) e espermidina (300 mM) foram incubados com gDNA (2 μg/ml) por 40 h para criar um mimético de andaime EPS, seguido por tratamento com DNase (5 unidades). Como mostrado por CLSM, essas estruturas de DNA dependentes de DNABII-poliamina eram resistentes à DNase (**FIG**. **7D**), semelhante a biofilmes maduros.

B. **DNABII**, **Poliaminas e DNA formam Z-DNA *in vitro***

[0173] As poliaminas causam sequências de Z-DNA propensas a deslocarem o equilíbrio B-Z para a configuração Z-DNA após a ligação (Thomas *et al.* (1986) Nucleic Acids Res. 14(16):6721-33; Thomas *et al.* (1988) J Mol Biol. 201(2):463-7), enquanto as proteínas DNABII dobram e condensam o DNA. Devido ao sinergismo de inibição por HU e ligação de espermidina em ensaios de degradação de DNase *in vitro* dos Requerentes (**FIG**. **7**), e a capacidade do Z-DNA para resistir a DNase, os Requerentes levantaram a hipótese de que as estruturas miméticas de EPS conteriam Z-DNA. As estruturas de EPS foram formadas como na **FIG**. **4 e FIG**. 7 por 16 h com gDNA. A imunofluorescência CLSM foi conduzida sondando com anticorpos anti-Z-DNA, que confirmaram a presença de Z-DNA (observe a cor branca; **FIG**. **8A**). Para determinar se as proteínas DNABII influenciam o equilíbrio de B-Z, os requerentes usaram dicroísmo circular (CD). As misturas de HU e substrato de DNA poli (dGdC) exibem inversão dos picos de elipticidade de B-DNA sozinho (250 e 280 nm) (Jang *et al.* (2015) Sci Rep. 5:9943), semelhante a um espectro de Z-DNA característico (**FIG**. **8B**).

EPS em biofilmes bacterianos contém Z-DNA e poliaminas

[0174] Para caracterizar ainda mais a associação de Z-DNA e poliaminas,

os Requerentes realizaram imunofluorescência em biofilmes de 40 h. Biofilmes dos patógenos bacterianos indicados foram fotografados por CLSM após sondagem com anti-DNABII e anti-espermidina, ou anticorpos anti-Z-DNA; enquanto o Z-DNA foi detectado no biofilme EPS de cada um dos patógenos bacterianos (**FIG**. **9**), havia claramente uma hierarquia entre as espécies (UPEC = *Staphylococcus epidermidis* < *K. pneumoniae* <NTHI). Em todos os casos, houve extensa colocalização entre DNABII (HU) e espermidina (observe a cor branca), bem como uma correspondência com a abundância de Z-DNA. Os Requerentes examinaram ainda os biofilmes NTHI e UPEC em vários estágios de formação de biofilme (24, 40 e 90 h) e observaram que a espermidina e o Z-DNA aumentaram concomitantemente dentro do EPS do biofilme com a idade do biofilme (**FIG**. **10**). Esses dados sugerem que o Z-DNA e a espermidina são de fato parte integrante do biofilme EPS e provavelmente contribuem para sua estrutura e estado de resistência à DNase.

HU deficiente em NTHI não consegue formar biofilmes nativos, incorporar poliaminas ou induzir uma mudança de B- para Z-DNA

[0175] Uma vez que as poliaminas colocalizam com HU dentro do NTHI biofilme EPS *in vitro* (**FIG**. **7A e FIG**. **9**) e *in vivo* (**FIG**. **7B**), os Requerentes avaliaram o papel de HU na incorporação de poliaminas e Z-DNA dentro do biofilme EPS NTHI. NTHI deficiente em HU *(hupA nulo*; DHU) foi comparado com biofilmes WT NTHI para a presença de poliaminas e Z-DNA por imunofluorescência. A falta de HU resultou em redução significativa em poliaminas e Z-DNA dentro do biofilme EPS em comparação com WT (**FIG**. **11**), o que sugere que HU é necessário para a presença de poliaminas e Z-DNA dentro do biofilme EPS NTHI.

III. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICO

[0176] São fornecidos aqui métodos para tratar um biofilme em um sujeito, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente

ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Em um aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em outro aspecto, o agente é fornecido na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um sujeito compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Em um aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em outro aspecto, o agente é fornecido na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em outro aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um sujeito compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de dois ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto adicional, os métodos para o tratamento de um biofilme em um sujeito compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que

interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em ainda um aspecto adicional, os métodos para tratar um biofilme em um sujeito compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou alternativamente dez ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme.

[0177] Esta divulgação também se refere a métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, em que o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos, e em outro aspecto, o agente é administrado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito

suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou, alternativamente, consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos, e em outro aspecto, o agente é administrado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em outro aspecto, os métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou, alternativamente, consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de dois ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto adicional, os métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou, alternativamente, consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em ainda um aspecto adicional, os métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo ou

alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou alternativamente dez ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme.

[0178] Esta divulgação se refere ainda a métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Em outro aspecto, os métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme

em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de dois ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo. Em um aspecto, os agentes são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto adicional, métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo que, em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em ainda um aspecto adicional, métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou alternativamente dez ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo que, em um aspecto, são administrados na ausência de uma

DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme.

[0179] Para qualquer um dos métodos descritos acima, a poliamina pode ser selecionada do grupo de: putrescina, espermina, cadaverina, 1,3-diaminopropano ou espermidina. Em uma modalidade, para os métodos descritos acima, o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme é um tRNA. Em outra modalidade, o agente é um inibidor da síntese de poliamina ou um agente que inibe a ligação da poliamina ao DNA. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclo-hexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis[guanil-hidrazona] (MGBG), 1-amino-oxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina, diciclo-hexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos ou um sal dos mesmos. Em um aspecto, os derivados desses compostos mantêm a mesma razão de massa para carga. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente que depleta cátions do biofilme, opcionalmente, uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, um azacrown ou uma cripta. Em uma quarta modalidade, o agente que depleta cátions do biofilme é selecionado do grupo de: sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, P11 fosfocelulose, sulfato de heparina ou um derivado ou análogo do mesmo. Em um aspecto, um derivado ou análogo do agente que depleta cátions dos biofilmes é uma resina que tem uma carga líquida negativa. Em uma quinta modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em uma sexta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou

ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. Em uma sétima modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma oitava modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto, os derivados dos compostos retêm a capacidade de intercalar entre bases de DNA. Em um aspecto, o agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo. Em um aspecto, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga líquida negativa. Em outro aspecto, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga neutra.

[0180] Também são fornecidos neste documento métodos para tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente em, ou ainda consistindo em administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente em, ou

ainda consistindo em administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local são aqui divulgados que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente em, ou ainda consistindo em administrar uma quantidade eficaz de dois ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local são aqui divulgados que, em um aspecto, são administrados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em outro aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente em, ou ainda consistindo em administrar uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local são aqui divulgados. Em um outro aspecto, os métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou

alternativamente dez ou mais agentes que interferem na conversão de B -DNA para Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local são divulgados neste documento, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em uma modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma quarta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto, os derivados dos compostos retêm a capacidade de intercalar entre bases de DNA. O agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo.

[0181] Métodos para o tratamento de um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo do mesmo e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo também são

fornecidos aqui, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. O fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em um ou mais de: uma caixa A, uma caixa B e/ou uma caixa AB, um fragmento C-terminal ou um fragmento N-terminal. Em uma modalidade específica, o fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir no domínio Caixa B que é capaz de se ligar ao DNA. Em um aspecto, o método para tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF) e/ou TB, compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Esta divulgação também se refere a métodos para tratar uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente recebendo ou tendo recebido a quimioterapia compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um

equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, o método compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto adicional, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Ainda em um aspecto adicional, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. Em uma modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em um aspecto particular, os derivados dos compostos retêm a capacidade de intercalar entre bases de DNA.

[0182] Esta divulgação se refere ainda a métodos para o tratamento de uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia compreendendo ou alternativamente

consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo do mesmo e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. O fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em um ou mais de: uma caixa A, uma caixa B e/ou uma caixa AB, um fragmento C-terminal ou um fragmento N-terminal. Em uma modalidade específica, o fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir no domínio Caixa B que é capaz de se ligar ao DNA. Métodos para o tratamento de uma infecção produtora de biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente recebendo ou tendo recebido a quimioterapia compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo também são fornecidos aqui, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez.

[0183] Os métodos descritos acima podem compreender ainda, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir

adicionalmente em administrar ao sujeito de uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos compreendem ainda, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano, que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração do agente. Em um aspecto particulado, a DNAse administrada é Pulmozyme. Em outro aspecto, o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende, ou, alternativamente, consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU, ou fragmentos de cada um dos mesmos. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida negativa. Numa segunda modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga neutra. Em uma terceira modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva.

[0184] Descritos neste documento são métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação

de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendem ou, alternativamente, consistem essencialmente em, ou ainda consistem ainda em um contato do biofilme com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em outro aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendem ou, alternativamente, consistem essencialmente em, ou ainda consistem ainda em um contato do biofilme com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em um aspecto adicional, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendem ou, alternativamente, consistem essencialmente em, ou ainda consistem ainda em um contato do biofilme com uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado,

a DNAse é Pulmozyme. Ainda em um aspecto adicional, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendem, ou alternativamente consistem essencialmente em, ou ainda consistem adicionalmente em contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou alternativamente dez ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. O contato pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[0185] Esta divulgação também se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de agente que depleta cátions que, em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em um aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme podem compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste

essencialmente ou ainda consiste em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que depleta os cátions, que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0186] Em um outro aspecto, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, podem compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de dois ou mais agentes que depletam cátions que, em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0187] Em um aspecto adicional, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme podem compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de três ou mais agentes que depletam os cátions, que em um aspecto, são contatados na ausência de

uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em ainda um aspecto adicional, os métodos para inibir a estabilidade de um biofilme podem compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina para o DNA no biofilme, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de quatro ou mais, ou alternativamente cinco ou mais, ou alternativamente seis ou mais, ou alternativamente sete ou mais, ou alternativamente oito ou mais, ou alternativamente nove ou mais, ou alternativamente dez ou mais agentes que depletam cátions. Em uma modalidade, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local que em um aspecto, são contatados na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em uma segunda modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. Em uma terceira modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina,

daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina, ou um derivado dos mesmos. Em uma quinta modalidade, o agente compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em cloroquina ou um derivado do mesmo. Em um aspecto particular, os derivados dos compostos retêm a capacidade de intercalar entre bases de DNA. O agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo.

[0188] Ainda descritos neste documento são métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, que em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0189] Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez. O fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir em um ou mais de: uma caixa A, uma caixa AB, uma caixa B, fragmento C-terminal e/ou um fragmento N-terminal. Em uma modalidade específica, o fragmento biologicamente ativo de HMGB1 pode compreender, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir no

domínio Caixa B que é capaz de se ligar ao DNA. Esta divulgação também se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em contatar o biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos, em que o contato compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em revestir uma superfície com uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivados dos mesmos, que em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em um aspecto, o anticorpo policlonal ou monoclonal anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo reconhece o DNA da forma B sobre o DNA da forma Z em pelo menos 10 vezes em afinidade/avidez.

[0190] Os métodos descritos acima podem compreender ainda, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir adicionalmente em contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano que em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em um aspecto, o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende, ou, alternativamente, consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU, ou fragmentos de cada um dos mesmos, que em um aspecto, é contatado na ausência de uma DNAse. Em um aspecto

adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga negativa líquida que, em um aspecto, é contatada na ausência de uma DNAse. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em uma segunda modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga neutra que, em um aspecto, é contatada na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em uma terceira modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0191] São fornecidos aqui métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo contatar o biofilme com um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme que, em um aspecto, é contatado na ausência de um DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é contatada de acordo com o método. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é contatada subsequentemente ao contato com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. O contato pode ser *in vitro* ou *in vivo*.

[0192] Também são fornecidos métodos para tratar um biofilme em um

sujeito, compreendendo administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0193] São fornecidos adicionalmente métodos para prevenir a formação de um biofilme em um sujeito suscetível ao desenvolvimento de um biofilme, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0194] Ainda são fornecidos métodos para tratar uma infecção causada por uma bactéria que produz um biofilme em um sujeito em necessidade do mesmo, o método compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0195] Em um aspecto, em que o agente é um inibidor da síntese de

poliamina ou um agente que inibe a ligação da poliamina ao DNA. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Exemplos não limitativos de poliamina incluem: putrescina, espermina, cadaverina, 1,3-diaminopropano ou espermidina. Em outro aspecto, o agente compreende um análogo de poliamina, difluorometilornitina, trans-4-metilciclo-hexilamina, sardomozida (Boc Sciences), metilglioxal-bis[guanil-hidrazona] (metil-GAG), 1-amino-oxi-3-aminopropano (AKos Consulting & Solutions), oxaliplatina, cisplatina, diciclo-hexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos ou um sal dos mesmos (todos os agentes deste parágrafo estão comercialmente disponíveis na Millipore Sigma, a menos que indicado de outra forma). Em um aspecto, os derivados desses compostos mantêm a mesma razão de massa para carga.

[0196] Em um aspecto adicional, o agente compreende um agente que depleta cátions do biofilme, opcionalmente, uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, um azacrown ou uma cripta (vários compostos representativos de cada classe de agente disponível em Millipore Sigma). Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Exemplos não limitativos de uma resina de troca catiônica incluem sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, P11 fosfocelulose, sulfato de heparina ou resinas contendo um derivado ou análogo do mesmo. Em uma modalidade, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga líquida negativa. Em uma modalidade, o agente que depleta cátions do biofilme tem uma carga neutra.

[0197] Em uma modalidade, são fornecidos aqui métodos para inibir a estabilidade de um biofilme, compreendendo contatar o biofilme *in vitro* com um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e o contato compreende o revestimento de uma superfície com o

agente que depleta cátions que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em outro aspecto, o agente não é uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme.

[0198] Em um aspecto dos métodos acima, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Exemplos de tais incluem um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto adicional, o agente compreende um agente do grupo de: riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, (Dervan *et al.* (1978) 100(6):1968-1970) daunorrubicina, TMPyP4, um benzo quaternário alcaloide[*c*]fenantridina, (Rajecky *et al.* (2015); L*e et al.* (2004) 69(8):2768-2772) quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado do mesmo (todos os agentes deste aspecto adicional estão comercialmente disponíveis na Millipore Sigma, a menos que indicado de outra forma). O agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo.

[0199] Além disso, são fornecidos métodos pra tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z- DNA no biofilme ou em seu ambiente local que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Exemplos de tais incluem um anticorpo anti-B-DNA ou

fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto adicional, o agente compreende um agente do grupo de: riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos. Em um aspecto, o método é realizado na ausência de uma DNAse e, em um aspecto, o tratamento de CF é realizado na ausência de uma DNAse. O agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo.

[0200] Em outro aspecto, são fornecidos aqui métodos para tratar uma infecção que produz biofilme incidente à administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente recebendo ou tendo recebido a quimioterapia, o método compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA a Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local que, em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Exemplos de tais incluem um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo. Em um aspecto adicional, o agente compreende um agente do grupo de: riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcaloide benzo[*c*]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos. O agente não é uma proteína HGMB1 ou um fragmento do mesmo.

[0201] Os métodos mencionados acima podem compreender ainda contatar o biofilme (quando *in vitro*) ou a administração ao sujeito de uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano que em um aspecto, é administrado na ausência de uma DNAse, enquanto em outro aspecto, a DNAse é administrada. Em outro aspecto, o agente não é uma

proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos. Em um aspecto adicional, a DNAse é administrada subsequentemente à administração com o agente. Em um aspecto particulado, a DNAse é Pulmozyme. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida negativa. Em uma modalidade, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida neutra.

[0202] Quando praticados *in vitro*, os métodos são úteis para rastrear ou confirmar agentes com a mesma capacidade, semelhante ou oposta aos polipeptídeos, polinucleotídeos, anticorpos, células hospedeiras, pequenas moléculas e composições aqui divulgadas. Alternativamente, eles podem ser usados para identificar qual agente é mais adequado para tratar uma infecção microbiana ou se o tratamento foi eficaz. Por exemplo, pode-se pesquisar novos agentes ou terapias de combinação tendo duas amostras contendo, por exemplo, o polipeptídeo DNABII e DNA microbiano e o agente a ser testado. A segunda amostra contém o polipeptídeo DNABII e o DNA microbiano e um agente conhecido como ativo, por exemplo, um anticorpo anti-IHF ou uma pequena molécula para servir como controle positivo. Em um aspecto adicional, várias amostras são fornecidas e os agentes são adicionados ao sistema em diluições crescentes para determinar a dose ideal que provavelmente seria eficaz no tratamento de um sujeito no ambiente clínico. Como é evidente para os versados na técnica, um controle negativo contendo o polipeptídeo DNABII e o DNA microbiano pode ser fornecido. Em um aspecto adicional, o polipeptídeo DNABII e o DNA microbiano são marcados de forma detectável, por exemplo, com moléculas luminescentes que emitirão um sinal quando colocadas em contato próximo uma com a outra. As amostras são contidas em condições semelhantes por um período de tempo eficaz para o agente inibir,

competir ou titular a interação entre o polipeptídeo DNABII e o DNA microbiano e, em seguida, a amostra é testada quanto à emissão de sinal das moléculas luminescentes. Se a amostra emitir um sinal, o agente não é eficaz para inibir a ligação.

[0203] Em outro aspecto, o método *in vitro* é praticado em um sistema de lâmina de câmara miniaturizada, em que o isolado microbiano (como uma bactéria) causando uma infecção pode ser isolado do humano/animal e então cultivado para permitir que cresça como um biofilme *in vitro.* O agente (como o anticorpo anti-DNABII ou IHF) ou um teste ou agente potencial é adicionado sozinho ou em combinação com outro agente à cultura com ou sem diluições crescentes do agente potencial ou agente, como um anti-DNABII ou IHF (ou outro anticorpo, molécula pequena, agente, etc.) para encontrar a dose ideal que provavelmente seria eficaz no tratamento daquele paciente quando distribuído ao sujeito onde a infecção existiu. Como é evidente para os versados na técnica, um controle positivo e negativo podem ser realizados simultaneamente.

[0204] Em um aspecto adicional, o método é praticado em uma plataforma de alto rendimento com o agente (tal como anticorpo anti-DNABII ou IHF) e/ou agente potencial (sozinho ou em combinação com outro agente) em uma célula de fluxo. O agente (como o anticorpo anti-DNABII ou IHF) ou biofilme de agente potencial é adicionado sozinho ou em combinação com outro agente à cultura com ou sem diluições crescentes do agente potencial ou agente, como um anti-DNABII ou IHF (ou outro anticorpo, molécula pequena, agente, etc.) para encontrar a dose ideal que provavelmente seria eficaz no tratamento daquele paciente quando distribuído ao sujeito onde a infecção existiu. Isolados de biofilme são sonicados para separar bactérias de biofilme do polipeptídeo DNABII, como IHF ligado ao DNA microbiano. Os complexos polipeptídeo DNABII-DNA são isolados em virtude do anticorpo anti-DNABII ou IHF na

plataforma. O DNA microbiano é então liberado com, por exemplo, uma lavagem com sal e usado para identificar as bactérias do biofilme adicionadas. O DNA liberado é então identificado, por exemplo, por sequenciamento de PCR. Se o DNA não for liberado, o(s) agente(s) executou(aram) ou se ligo(aram) ao DNA microbiano com sucesso. Se o DNA for encontrado na amostra, o agente não interferiu com a ligação do polipeptídeo DNABII ao DNA microbiano. Como é evidente para os versados na técnica, um controle positivo e/ou negativo podem ser realizados simultaneamente.

[0205] Os métodos acima também podem ser usados como um teste de diagnóstico, uma vez que é possível que uma determinada espécie bacteriana responda melhor à reversão de seu biofilme por um agente mais do que outro, este sistema de ensaio de alto rendimento rápido pode permitir que um versado na técnica ensaie um painel de possíveis agentes anti-DNABII ou semelhantes a IHF para identificar os mais eficazes do grupo.

[0206] A vantagem desses métodos é que a maioria dos laboratórios de microbiologia clínica em hospitais já estão equipados para realizar esses tipos de ensaios (ou seja, determinação de MIC, valores de MBC) usando bactérias que estão crescendo em cultura líquida (ou planctonicamente). Como é evidente para os versados na técnica, as bactérias geralmente não crescem de forma planctônica quando estão causando doenças. Em vez disso, eles estão crescendo como um biofilme estável e esses biofilmes são significativamente mais resistentes ao tratamento com antibióticos, anticorpos ou outras terapêuticas. Esta resistência é a razão pela qual a maioria dos valores de MIC/MBC falham em prever com precisão a eficácia *in vivo*. Assim, ao determinar qual “dose” de agente poderia reverter um biofilme bacteriano *in vitro* (conforme descrito acima), o ensaio pré-clínico dos candidatos seria um preditor mais confiável da eficácia clínica, mesmo como uma aplicação de medicina personalizada.

[0207] Além do ambiente clínico, os métodos podem ser usados para identificar o micróbio que causa a infecção e/ou confirmar agentes eficazes em um ambiente industrial. Assim, os agentes podem ser usados para tratar, inibir ou titular um biofilme em um ambiente industrial.

[0208] Em um aspecto adicional dos métodos acima, um antibiótico ou antimicrobiano conhecido por inibir o crescimento da infecção subjacente é adicionado sequencialmente ou simultaneamente, para determinar se a infecção pode ser inibida. Também é possível adicionar o agente ao DNA microbiano ou polipeptídeo DNABII antes de adicionar o complexo ausente para o ensaio de inibição do biofilme.

[0209] Quando praticado *in vivo* em animais não humanos, como uma chinchila, o método fornece uma triagem pré-clínica para identificar agentes que podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes para romper biofilmes.

[0210] Em outro aspecto, é fornecido aqui um método de inibir, prevenir ou romper um biofilme em um sujeito, administrando ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente, inibindo, prevenindo ou rompendo o biofilme microbiano. Exemplos não limitativos de tais sujeitos incluem mamíferos, por exemplo, animais de estimação e pacientes humanos.

[0211] Os agentes e composições aqui divulgados podem ser administrados concomitantemente ou sequencialmente com outros agentes antimicrobianos e/ou antígenos de superfície. Em um aspecto particular, a administração é localmente no local da infecção por injeção direta ou por inalação, por exemplo. Outros exemplos não limitativos de administração incluem um ou mais métodos compreendendo transdermicamente, uretralmente, sublingualmente, retalmente, vaginalmente, ocularmente, subcutâneo, intramuscularmente, intraperitonealmente, intranasalmente, por inalação ou oralmente.

[0212] Infecções microbianas e doenças que podem ser tratadas pelos métodos aqui divulgados incluem infecção pelos organismos *Streptococcus agalactiae, Neisseria meningitidis, Treponemes, denticola, pallidum, Burkholderia* cepaciaou *Burkholderia pseudomallei*. Em um aspecto, a infecção microbiana é uma ou mais de *Haemophilus influenzae* (não tipável), *Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, Mycobacterium tuberculosis*. Essas infecções microbianas podem estar presentes nas vias aéreas superiores, médias e inferiores (otite, sinusite, bronquite, mas também exacerbações de doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), tosse crônica, complicações e/ou causa primária de fibrose cística (CF) e pneumonia adquirida na comunidade (CAP). Assim, praticando os métodos *in vivo* aqui divulgados, essas doenças e complicações dessas infecções também podem ser prevenidas ou tratadas.

[0213] As infecções também podem ocorrer na cavidade oral (*cárie, periodontite*) e causadas por *Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomvctemcomitans*. As infecções também podem ser localizadas na pele (abscessos, infecções por 'staph', impetigo, infecção secundária de queimaduras, doença de Lyme) e causadas por *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa* e *Borrelia burdorferi*. As infecções do trato urinário (UTI) também podem ser tratadas e são normalmente causadas por *Escherichia coli*. As infecções do trato gastrointestinal (GI) (diarreia, cólera, cálculos biliares, úlceras gástricas) são normalmente causadas por *Salmonella enterica sorovar, Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori*. As infecções do trato genital incluem e são normalmente causadas por *Neisseria gonorrhoeae*. As infecções podem ser da bexiga ou de um dispositivo interno causadas por *Enterococcus faecalis*. Infecções associadas a dispositivos protéticos implantados, como próteses artificiais de quadril ou joelho, ou implantes dentários, ou dispositivos médicos, como bombas, cateteres, stents ou sistemas de monitoramento,

normalmente causadas por uma variedade de bactérias, podem ser tratadas pelos métodos aqui divulgados. Esses dispositivos podem ser revestidos ou conjugados a um agente conforme descrito neste documento. Assim, praticando os métodos *in vivo* aqui divulgados, essas doenças e complicações dessas infecções também podem ser prevenidas ou tratadas.

[0214] As infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* também podem ser tratadas pelos métodos aqui divulgados e é a principal causa de septicemia bacteriana em recém-nascidos. As infecções causadas por *Neisseria meningitidis,* que podem causar meningite, também podem ser tratadas.

[0215] Assim, as vias de administração aplicáveis aos métodos aqui divulgados incluem intranasal, intramuscular, uretral, intratraqueal, subcutânea, intradérmica, transdérmica, aplicação tópica, intravenosa, retal, nasal, oral, inalação e outras vias de administração enteral e parenteral. As vias de administração podem ser combinadas, se desejado, ou ajustadas dependendo do agente e/ou do efeito desejado. Um agente ativo pode ser administrado em dose única ou em doses múltiplas. As modalidades desses métodos e rotas adequadas para distribuição incluem rotas sistêmicas ou localizadas. Em geral, as vias de administração adequadas para os métodos aqui divulgados incluem, mas sem limitação, injeção direta, via enteral, parenteral ou inalatória.

[0216] As vias parenterais de administração além da administração por inalação incluem, mas sem limitação, via tópica, transdérmica, subcutânea, intramuscular, intraorbital, intracapsular, intraespinhal, intraesternal e intravenosa, ou seja, qualquer via de administração que não seja através do canal alimentar. A administração parenteral pode ser conduzida para efetuar a distribuição sistêmica ou local do agente inibidor. Quando a distribuição sistêmica é desejada, a administração envolve tipicamente a administração tópica ou mucosa invasiva ou

absorvida sistemicamente de preparações farmacêuticas.

[0217] Os agentes divulgados neste documento também podem ser distribuídos ao sujeito por administração enteral. As vias de administração enteral incluem, mas sem limitação, administração oral e retal (por exemplo, usando um supositório).

[0218] Os métodos de administração do ativo através da pele ou mucosa incluem, mas sem limitação, aplicação tópica de uma preparação farmacêutica adequada, transmissão transcutânea, transmissão transdérmica, injeção e administração epidérmica. Para transmissão transdérmica, promotores de absorção ou iontoforese são métodos adequados. A transmissão iontoforética pode ser realizada usando "emplastros" disponíveis comercialmente que distribuem seu produto continuamente por meio de pulsos elétricos através da pele intacta por períodos de vários dias ou mais.

[0219] Em várias modalidades dos métodos aqui divulgados, o agente é administrado por inalação, injeção ou por via oral em uma base contínua, diária, pelo menos uma vez por dia (QD), e em várias modalidades dois (BID), três (TID), ou mesmo quatro vezes ao dia. Normalmente, a dose diária terapeuticamente eficaz pode ser pelo menos cerca de 1 mg, ou pelo menos cerca de 10 mg, ou pelo menos cerca de 100 mg, ou cerca de 200 a cerca de 500 mg, e às vezes, dependendo do composto, até tanto quanto cerca de 1 g a cerca de 2,5 g.

[0220] A dosagem pode ser realizada de acordo com os métodos divulgados neste documento usando cápsulas, comprimidos, suspensão oral, suspensão para injeção intramuscular, suspensão para infusão intravenosa, get ou creme para aplicação tópica ou suspensão para injeção intra-articular.

[0221] A dosagem, toxicidade e eficácia terapêutica das composições aqui

descritas podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinar o LD50 (a dose letal para 50% da população) e o ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão LD50/ED50. Em certas modalidades, as composições exibem altos índices terapêuticos. Enquanto compostos que apresentam efeitos colaterais tóxicos podem ser usados, deve-se tomar cuidado para projetar um sistema de distribuição que almeje tais compostos ao local do tecido afetado a fim de minimizar possíveis danos às células não infectadas e, assim, reduzir os efeitos colaterais.

[0222] Os dados obtidos de ensaios da cultura de células e estudos em animais podem ser utilizados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem de tais compostos encontra-se (em certas modalidades, dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e a via de administração utilizada. Para qualquer composto utilizado no método, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentração no plasma circulante que inclua a IC50 (isto é, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição meio-máxima) conforme determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar com maior precisão as doses úteis em seres humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho.

[0223] Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz de uma composição suficiente para atingir um efeito terapêutico ou profilático varia de cerca de 0,000001 mg por quilograma de peso corporal por administração a cerca de 10.000 mg por quilograma de peso corporal por

administração. Adequadamente, os intervalos de dosagem são de cerca de 0,0001 mg por quilograma de peso corporal por administração a cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal por administração. A administração pode ser fornecida como uma dose inicial, seguida por uma ou mais doses de "reforço". As doses de reforço podem ser fornecidas um dia, dois dias, três dias, uma semana, duas semanas, três semanas, um, dois, três, seis ou doze meses após uma dose inicial. Em algumas modalidades, uma dose de reforço é administrada após uma avaliação da resposta do sujeito às administrações anteriores.

0224 Versados entenderão que certos fatores podem influenciar a dosagem e o tempo necessários para tratar um indivíduo de forma eficaz, incluindo mas não limitado a, gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, estado geral de saúde e/ou idade do indivíduo e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um sujeito com uma quantidade terapeuticamente eficaz das composições terapêuticas aqui descritas pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos.

Anticorpos e Derivados dos mesmos

[0225] Esta divulgação também fornece um anticorpo que se liga e/ou reconhece e se liga especificamente a um DNA B para uso nos métodos aqui divulgados. O anticorpo pode ser qualquer um dos vários anticorpos aqui descritos, não limitativos, exemplos de tais incluem um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humano, um anticorpo estratificado, um diacorpo, um anticorpo humanizado, um derivado de anticorpo, um anticorpo humanizado recombinante, ou um derivado ou fragmento de cada um dos mesmos. Em um aspecto, o fragmento compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste na CDR do anticorpo. Em um aspecto, o anticorpo é marcado de forma detectável ou compreende ainda um marcador detectável conjugado a ele. Também é

fornecida uma linhagem celular de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal aqui divulgado. As composições compreendendo ou, alternativamente, consistindo essencialmente em ou ainda mais, consistindo em uma ou mais das modalidades acima são fornecidas adicionalmente neste documento. Além disso, são fornecidos polinucleotídeos que codificam a sequência de aminoácidos dos anticorpos e fragmentos, bem como métodos para produzir de forma recombinante ou sintetizar quimicamente os polipeptídeos de anticorpos e fragmentos dos mesmos. Os polipeptídeos de anticorpo podem ser produzidos em uma célula eucariótica ou procariótica, ou por outros métodos conhecidos na técnica e aqui descritos.

[0226] As variações desta metodologia incluem modificação de adjuvantes, rotas e local de administração, volumes de injeção por local e o número de locais por animal para produção ideal e tratamento humano do animal. Por exemplo, os adjuvantes normalmente são usados para melhorar ou intensificar uma resposta imune aos antígenos. A maioria dos adjuvantes fornece um depósito de antígeno no local da injeção, que permite a liberação de antígeno em drenagem dos linfonodos. Outros adjuvantes incluem tensoativos que promovem a concentração de moléculas de antígeno de proteína em uma grande área de superfície e moléculas imunoestimulatórias. Exemplos não limitativos de adjuvantes para geração de anticorpos policlonais incluem adjuvantes de Freund, sistema de adjuvante Ribi e Titermax. Os anticorpos policlonais podem ser gerados usando métodos conhecidos na técnica, alguns dos quais são descritos na Pat. U.S. 7.279.559; 7.119.179; 7.060.800; 6.709.659; 6.656.746; 6.322.788; 5.686.073; e 5.670.153.

[0227] Os anticorpos monoclonais podem ser gerados usando técnicas convencionais de hibridoma conhecidas na técnica e bem descritas na literatura. Por exemplo, um hibridoma é produzido pela fusão de uma linhagem celular imortal adequada (por exemplo, uma linhagem celular

de mieloma, tal como, mas não limitada a, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, P3X63Ag8,653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U397, MIA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 313, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, CHO, PerC.6, YB2/O) ou semelhantes, ou heteromielomas, produtos de fusão dos mesmos, ou qualquer célula ou célula de fusão derivada da mesma, ou qualquer outra linhagem celular adequada, conforme conhecido na técnica (ver, aqueles nos seguintes endereços da web, por exemplo, atcc.org, lifetech.com, acessado pela última vez em 26 de novembro de 2007), com células produtoras de anticorpos, tais como, mas sem limitação, baço isolado ou clonado, sangue periférico, linfa, amígdala ou outra célula imune ou células B contendo células, ou quaisquer outras células que expressam constante ou variável da cadeia pesada ou leve ou sequências de estrutura ou CDR, seja como ácido nucleico endógeno ou heterólogo, como recombinante ou endógeno, viral, bacteriana, algal, procariótica, anfíbio, inseto, reptiliano, peixe, mamífero, roedor, equino, ovino, cabra, ovelha, primata, eucariótico, DNA genômico, cDNA, rDNA, DNA ou RNA mitocondrial, DNA ou RNA do cloroplasto, hnRNA, mRNA, tRNA, fita simples, dupla ou tripla, hibridada e semelhantes ou qualquer combinação dos mesmos. As células produtoras de anticorpos também podem ser obtidas a partir do sangue periférico ou, em modalidades particulares, do baço ou nódulos linfáticos de humanos ou outros animais adequados que foram imunizados com o antígeno de interesse e, em seguida, rastreados para a atividade de interesse. Qualquer outra célula hospedeira adequada também pode ser usada para expressar ácido nucleico heterólogo ou endógeno que codifica um anticorpo, fragmento especificado ou variante do mesmo, da presente divulgação. As células fundidas (hibridomas) ou células recombinantes podem ser isoladas usando condições de cultura seletivas ou outros métodos conhecidos adequados e clonadas por diluição limitativa ou seleção de células ou outros métodos conhecidos.

[0228] Outros métodos adequados de produção ou isolamento de anticorpos com a especificidade necessária podem ser usados, incluindo, mas sem limitação, métodos que selecionam o anticorpo recombinante de uma biblioteca de peptídeo ou proteína (por exemplo, mas não limitado a, um bacteriófago, ribossomo, oligonucleotídeo, cDNA, ou semelhante, biblioteca de exibição; por exemplo, como disponível em vários fornecedores comerciais, tais como MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.), BioInvent (Lund, Suécia), Affitech (Oslo, Noruega) usando métodos conhecidos na técnica. Métodos conhecidos na técnica são descritos na literatura de patentes, alguns dos quais incluem Pat. U.S. 4.704.692; 5.723.323; 5.763.192; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; e 5.976.862. Métodos alternativos dependem da imunização de animais transgênicos (por exemplo, camundongos SCID, Nguyen *et al.* (1977) Microbiol. Immunol. 41:901-907 (1997); Sandhu *et al.* (1996) Crit, Rev. Biotechnol. 16:95-118; Eren *et al.* (1998) Mumma 93:154-161 que são capazes de produzir um repertório de anticorpos humanos, como conhecido na técnica e/ou como aqui descrito. Tais técnicas incluem, mas sem limitação, exibição de ribossomo Wanes *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-4942; Hanes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14130-14135); tecnologias de produção de anticorpos de célula única (por exemplo, método de anticorpo de linfócitos selecionados (“SLAM”) (Pat. U.S. 5.627.052; Wen *et al.* (1987) J. Immunol 17:887-892; Babcook *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843-7848); microgotículas de gel e citometria de fluxo (Powell *et al.* (1990) Biotechnol. 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass.); Gray *et al.* (1995) J. Imm. Meth. 182:155-163; and Kenny *et al.* (1995) Bio. Technol. 13:787-790); seleção de células B (Steenbakkers *et al.* (1994) Molec. Biol. Reports 19:125-134).

[0229] Derivados de anticorpos da presente divulgação também podem ser preparados pela distribuição de um polinucleotídeo que codifica um anticorpo divulgado neste documento a um hospedeiro adequado, de modo a fornecer animais transgênicos ou mamíferos, como cabras, vacas,

cavalos, ovelhas e semelhantes, que produzem tais anticorpos em seu leite. Estes métodos são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, nas Pat. U.S. 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; e 5.304.489.

[0230] O termo “derivado de anticorpo” inclui modificação pós-tradução para a sequência polipeptídica linear do anticorpo ou fragmento. Por exemplo, Pat. U.S. 6.602.684 B1 descreve um método para a geração de formas modificadas de glicol de anticorpos, incluindo moléculas de anticorpos inteiros, fragmentos de anticorpos ou proteínas de fusão que incluem uma região equivalente à região Fc de uma imunoglobulina, tendo toxicidade celular mediada por Fe aumentada, e glicoproteínas assim geradas.

[0231] Os anticorpos divulgados neste documento também incluem derivados que são modificados pela ligação covalente de qualquer tipo de molécula ao anticorpo de modo que a ligação covalente não impeça o anticorpo de gerar uma resposta anti-idiotípica. Derivados de anticorpos incluem, mas sem limitação, anticorpos que foram modificados por glicosilação, acetilação, peguilação, fosforilação, amidação, derivatização por grupos de proteção/bloqueio conhecidos, clivagem proteolítica, ligação a um ligando celular ou outra proteína, etc. Além disso, os derivados podem conter um ou mais aminoácidos não clássicos.

[0232] Derivados de anticorpos também podem ser preparados através da distribuição de um polinucleotídeo divulgado neste documento para fornecer plantas transgênicas e células vegetais cultivadas (por exemplo, mas sem limitação tabaco, milho e lentilha d’água) que produzem tais anticorpos, partes específicas ou variantes nas partes da planta ou em células cultivadas a partir das mesmas. Por exemplo, Cramer *et al.* (1999) Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 e referências aí citadas, descrevem a produção de folhas de tabaco transgênicas que expressam grandes quantidades de proteínas recombinantes, por exemplo, usando

um promotor induzível. O milho transgênico tem sido usado para expressar proteínas de mamíferos em níveis de produção comercial, com atividades biológicas equivalentes àquelas produzidas em outros sistemas recombinantes ou purificadas de fontes naturais. Ver, por exemplo, Hood *et al.* (1999) Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 e referências aí citadas. Os derivados de anticorpos também foram produzidos em grandes quantidades a partir de sementes de plantas transgênicas, incluindo fragmentos de anticorpos, como anticorpos de cadeia única (scFvs), incluindo sementes de tabaco e tubérculos de batata. Ver, por exemplo, Conrad *et al.* (1998) Plant Mol. Biol. 38:101-109 e referências aí citadas. Assim, os anticorpos também podem ser produzidos usando plantas transgênicas, de acordo com métodos conhecidos.

[0233] Derivados de anticorpos também podem ser produzidos, por exemplo, adicionando sequências exógenas para modificar a imunogenicidade ou reduzir, aumentar ou modificar a ligação, afinidade, taxa de ativação, taxa de desativação, avidez, especificidade, meia-vida ou qualquer outra característica adequada. Geralmente, parte ou todas as sequências CDR não humanas ou humanas são mantidas enquanto as sequências não humanas das regiões variáveis e constantes são substituídas por aminoácidos humanos ou outros ou regiões variáveis ou constantes de outros isotipos.

[0234] Em geral, os resíduos de CDR estão direta e substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno. A humanização ou engenharia de anticorpos pode ser realizada usando qualquer método conhecido, tal como, mas não limitado a, aqueles descritos nas Pat. U.S. 5.723.323; 5.976.862; 5.824.514; 5.817.483; 5.814.476; 5.763.192; 5.723.323; 5.766.886; 5.714.352; 6.204.023; 6.180.370; 5.693.762; 5.530.101; 5.585.089; 5.225.539; e 4.816.567.

[0235] Os anticorpos quiméricos, humanizados ou primatizados da

presente divulgação podem ser preparados com base na sequência de um anticorpo monoclonal de referência preparado usando técnicas de biologia molecular padrão. O DNA que codifica as imunoglobulinas de cadeia pesada e leve pode ser obtido a partir do hibridoma de interesse e projetado para conter sequências de imunoglobulina não de referência (por exemplo, humana) usando técnicas de biologia molecular padrão. Por exemplo, para criar um anticorpo quimérico, as regiões variáveis murinas podem ser ligadas a regiões constantes humanas usando métodos conhecidos na técnica (Pat. U.S. 4.816.567). Para criar um anticorpo humanizado, as regiões CDR murinas podem ser inseridas em uma estrutura humana usando métodos conhecidos na técnica (Pat. U.S. 5.225.539 e Pat. U.S. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; e 6.180.370). Da mesma forma, para criar um anticorpo primatizado, as regiões CDR murinas podem ser inseridas em uma estrutura de primata usando métodos conhecidos na técnica (WO 93/02108 e WO 99/55369).

[0236] As técnicas para produzir anticorpos parcialmente ou totalmente humanos são conhecidas na técnica e qualquer uma dessas técnicas pode ser usada. De acordo com uma modalidade, sequências de anticorpos totalmente humanos são feitas em um camundongo transgênico que foi projetado para expressar genes de anticorpos da cadeia pesada e leve humana. Têm sido feitas várias cepas desses camundongos transgênicos que podem produzir diferentes classes de anticorpos. As células B de camundongos transgênicos que estão produzindo um anticorpo desejável podem ser fundidas para fazer linhagens de células de hibridoma para a produção contínua do anticorpo desejado. (Veja, por exemplo, Russel *et al.* (2000) Infection and Immunity April 2000:1820-1826; Gallo *et al.* (2000) European J. of Immun. 30:534-540; Green (1999) J. of Immun. Methods 231:11-23; Yang *et al.* (1999A) J. of Leukocyte Biology 66:401-410; Yang (1999B) Cancer Research 59(6):1236-1243; Jakobovits (1998) Advanced Drug Reviews 31:33-42; Green and Jakobovits (1998) J. Exp. Med. 188(3):483-495; Jakobovits

(1998) Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614; Tsuda *et al.* (1997) Genomics 42:413-421; Sherman-Gold (1997) Genetic Engineering News 17(14); Mendez *et al.* (1997) Nature Genetics 15:146-156; Jakobovits (1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology, The Integrated Immune System Vol. IV, 194.1-194.7; Jakobovits (1995) Current Opinion in Biotechnology 6:561-566; Mendez *et al.* (1995) Genomics 26:294-307; Jakobovits (1994) Current Biology 4(8):761-763; Arbones *et al.* (1994) Immunity 1(4):247-260; Jakobovits (1993) Nature 362(6417):255-258; Jakobovits *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(6):2551-2555; e Pat. U.S. 6.075.181.)

[0237] Os anticorpos aqui divulgados também podem ser modificados para criar anticorpos quiméricos. Os anticorpos quiméricos são aqueles em que os vários domínios das cadeias pesada e leve dos anticorpos são codificados por DNA de mais de uma espécie. Ver, por exemplo Pat. U.S. 4.816.567.

[0238] Alternativamente, os anticorpos aqui divulgados também podem ser modificados para criar anticorpos estratificados. Anticorpos estratificados são aqueles em que os resíduos de aminoácidos externos do anticorpo de uma espécie são judiciosamente substituídos ou "estratificados" pelos de uma segunda espécie, de modo que os anticorpos da primeira espécie não sejam imunogênicos na segunda espécie, reduzindo assim a imunogenicidade do anticorpo. Uma vez que a antigenicidade de uma proteína é principalmente dependente da natureza de sua superfície, a imunogenicidade de um anticorpo pode ser reduzida substituindo os resíduos expostos que diferem daqueles normalmente encontrados em anticorpos de outras espécies de mamíferos. Esta substituição criteriosa dos resíduos externos deve ter pouco ou nenhum efeito nos domínios internos ou nos contatos interdomínios. Assim, as propriedades de ligação do ligando não devem ser afetadas como consequência de alterações que são limitadas aos

resíduos de estrutura da região variável. O processo é referido como "estratificação", uma vez que apenas a superfície externa ou pele do anticorpo é alterada, os resíduos de suporte permanecem inalterados.

[0239] O procedimento para "estratificação" faz uso dos dados de sequência disponíveis para domínios variáveis de anticorpos humanos compilados por Kabat *et al.* (1987) Sequences of Proteins of Immunological interest, 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, atualizações para esta base de dados e outras bases de dados acessíveis dos Estados Unidos e estrangeiras (ambos ácidos nucleicos e proteínas). Exemplos não limitativos dos métodos usados para gerar anticorpos estratificados incluem EP 519596; Pat. U.S. 6.797.492; e descrito em Padlan *et al.* (1991) Mol. Immunol. 28(4-5):489-498.

[0240] O termo "derivado de anticorpo" também inclui "diacorpos" que são pequenos fragmentos de anticorpos com dois locais de ligação ao antígeno, em que os fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (VH) conectado a um domínio variável da cadeia leve (VL) na mesma cadeia de polipeptídeo. (Ver, por exemplo, EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448.) Ao usar um ligante que é muito curto para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação ao antígeno. (Ver também, Pat. U.S. 6.632.926 de Chen *et al.*, que divulga variantes de anticorpos que têm um ou mais aminoácidos inseridos em uma região hipervariável do anticorpo parental e uma afinidade de ligação para um antígeno alvo que é pelo menos cerca de duas vezes mais forte do que a afinidade de ligação do anticorpo parental ao antígeno).

[0241] O termo "derivado de anticorpo" inclui ainda moléculas de anticorpos engenheirados, fragmentos e domínios únicos, como scFv, dAbs, nanocorpos, minicorpos, Unibodies, and Affibodies & Hudson

(2005) Nature Biotech 23(9):1126-36; Publicação do Pedido Pat. U.S. 2006/0211088; Publicação de Pedido Internacional PCT WO 2007/059782; Pat. U.S. 5.831.012).

[0242] O termo “derivado de anticorpo” inclui ainda “anticorpos lineares”. O procedimento para preparar anticorpos lineares é conhecido na técnica e descrito em Zapata *et al.* (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062. Resumidamente, estes anticorpos compreendem um par de segmentos Ed em tandem (V_H-C_H1-VH-C_H1) que formam um par de regiões de ligação ao antígeno. Os anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos.

[0243] Os anticorpos aqui divulgados podem ser recuperados e purificados a partir de culturas de células recombinantes por métodos conhecidos, incluindo, mas sem limitação, purificação de proteína A, sulfato de amônio ou precipitação com etanol, extração de ácido, cromatografia de troca aniônica ou catiônica, cromatografia de fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade, cromatografia de hidroxilapatita e cromatografia de lectina. A cromatografia líquida de alto desempenho (“HPLC”) também pode ser usada para purificação.

[0244] Os anticorpos da presente divulgação incluem produtos naturalmente purificados, produtos de procedimentos químicos sintéticos e produtos produzidos por técnicas recombinantes a partir de um hospedeiro eucariótico, incluindo, por exemplo, levedura, planta superior, células de inseto e de mamífero ou, alternativamente, de um hospedeiro procariótico como descrito acima. Vários sistemas de produção de anticorpos são descritos em Birch & Radner (2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 671-685.

[0245] Se um anticorpo sendo testado se liga à proteína ou polipeptídeo, então o anticorpo sendo testado e os anticorpos fornecidos por esta

divulgação são equivalentes. Também é possível determinar, sem experimentação indevida, se um anticorpo tem a mesma especificidade que o anticorpo divulgado neste documento, determinando se o anticorpo sendo testado evita que um anticorpo divulgado neste documento se ligue à proteína ou polipeptídeo com o qual o anticorpo é normalmente reativo. Se o anticorpo sendo testado competir com o anticorpo divulgado neste documento como mostrado por uma diminuição na ligação pelo anticorpo monoclonal divulgado neste documento, então é provável que os dois anticorpos se liguem ao mesmo epítopo ou a um epítopo intimamente relacionado. Alternativamente, pode-se pré-incubar o anticorpo divulgado neste documento com uma proteína com a qual é normalmente reativo e determinar se o anticorpo sendo testado é inibido em sua capacidade de se ligar ao antígeno. Se o anticorpo testado for inibido, então, com toda a probabilidade, ele terá a mesma, ou uma especificidade epitópica intimamente relacionada, que o anticorpo aqui divulgado.

[0246] O termo “anticorpo” também se destina a incluir anticorpos de todos os isotipos e subclasses de imunoglobulina. Isotipos particulares de um anticorpo monoclonal podem ser preparados diretamente selecionando de uma fusão inicial, ou preparados secundariamente, a partir de um hibridoma parental que secreta um anticorpo monoclonal de isotipo diferente usando a técnica de seleção de irmãos para isolar variantes de troca de classe usando o procedimento descrito em Steplewski *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8653 or Spira *et al.* (1984) J. Immunol. Methods 74:307. Alternativamente, podem ser utilizadas técnicas de DNA recombinante.

[0247] O isolamento de outros anticorpos monoclonais com a especificidade dos anticorpos monoclonais aqui descritos também pode ser realizado por um versado na técnica pela produção de anticorpos anti-idiotípicos. Herlyn *et al.* (1986) Science 232:100. Um anticorpo anti-idiotípico é um anticorpo que reconhece determinantes únicos presentes

no anticorpo monoclonal de interesse.

[0248] Em alguns aspectos aqui divulgados, é útil marcar o anticorpo de forma detectável ou terapêutica. Os marcadores adequados são descritos supra. Os métodos para conjugar anticorpos com estes agentes são conhecidos na técnica. Apenas para fins de ilustração, os anticorpos podem ser marcados com uma parte detectável, como um átomo radioativo, um cromóforo, um fluoróforo ou semelhante. Esses anticorpos marcados podem ser usados para técnicas de diagnóstico, *in vivo* ou em uma amostra de teste isolada.

[0249] O acoplamento de anticorpos a haptenos de baixo peso molecular pode aumentar a sensibilidade do anticorpo em um ensaio. Os haptenos podem então ser detectados especificamente por meio de uma segunda reação. Por exemplo, é comum usar haptenos como a biotina, que reage com avidina, ou dinitrofenol, piridoxal e fluoresceína, que podem reagir com anticorpos anti-hapteno específicos. Ver, Harlow and Lane (1988) supra.

[0250] A região variável dos anticorpos da presente divulgação pode ser modificada por mutação de resíduos de aminoácidos dentro das regiões VH e/ou VL CDR 1, CDR 2 e/ou CDR 3 para melhorar uma ou mais propriedades de ligação (por exemplo, afinidade) do anticorpo. As mutações podem ser introduzidas por mutagênese dirigida ao sítio ou mutagênese mediada por PCR e o efeito na ligação do anticorpo, ou outra propriedade funcional de interesse, pode ser avaliada em ensaios *in vitro* ou *in vivo* apropriados. Em certas modalidades, modificações conservativas são introduzidas e normalmente não mais do que um, dois, três, quatro ou cinco resíduos dentro de uma região CDR são alterados. As mutações podem ser substituições, adições ou deleções de aminoácidos.

[0251] Modificações de estrutura podem ser feitas aos anticorpos para

diminuir a imunogenicidade, por exemplo, por “retromutação” de um ou mais resíduos de estrutura para a sequência da linhagem germinativa correspondente.

[0252] Além disso, os anticorpos divulgados neste documento podem ser projetados para incluir modificações na região Fc para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, tais como meia-vida sérica, fixação de complemento, ligação ao receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno. Essas modificações incluem, mas sem limitação, alterações do número de resíduos de cisteína na região de dobradiça para facilitar a montagem das cadeias leve e pesada ou para aumentar ou diminuir a estabilidade do anticorpo (Pat. U.S. 5.677.425) e mutações de aminoácidos na região de dobradiça Fc para diminuir a meia-vida biológica do anticorpo (Pat. U.S. 6.165.745).

[0253] Além disso, os anticorpos aqui divulgados podem ser modificados quimicamente. A glicosilação de um anticorpo pode ser alterada, por exemplo, modificando um ou mais sítios de glicosilação na sequência do anticorpo para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno (Pat. U.S. 5.714.350 e 6.350.861). Alternativamente, para aumentar a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, um anticorpo hipofucosilado com quantidades reduzidas de resíduos de fucosil ou um anticorpo com estruturas GlcNac bissectantes aumentadas pode ser obtido expressando o anticorpo em uma célula hospedeira com mecanismo de glicosilação alterado (Shields, R.L. *et al.* (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana *et al.* (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

[0254] Os anticorpos divulgados neste documento podem ser peguilados para aumentar a meia-vida biológica pela reação do anticorpo ou fragmento do mesmo com polietileno glicol (PEG) ou um éster reativo ou derivado aldeído de PEG, sob condições em que um ou mais grupos PEG se ligam ao anticorpo ou fragmento de anticorpo. A peguilação do anticorpo pode ser realizada por uma reação de acilação ou uma reação

de alquilação com uma molécula de PEG reativa (ou um polímero solúvel em água reativo análogo). Como utilizado neste documento, o termo "polietileno glicol" destina-se a abranger qualquer uma das formas de PEG que foram utilizadas para derivatizar outras proteínas, tais como mono (C1-C10) alcoxi- ou ariloxi-polietileno glicol ou polietileno glicol-maleimida. O anticorpo a ser peguilado pode ser um anticorpo aglicosilado. Os métodos para peguilar proteínas são conhecidos na técnica e podem ser aplicados aos anticorpos aqui divulgados (EP 0154316 e EP 0401384).

[0255] Além disso, os anticorpos podem ser modificados quimicamente pela conjugação ou fusão da região de ligação ao antígeno do anticorpo à proteína do soro, como a albumina do soro humano, para aumentar a meia-vida da molécula resultante. Tal abordagem é, por exemplo, descrita em EP 0322094 e EP 0486525.

[0256] Os anticorpos ou fragmentos dos mesmos da presente divulgação podem ser conjugados a um agente de diagnóstico e usados para diagnóstico, por exemplo, para monitorar o desenvolvimento ou progressão de uma doença e determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. Exemplos de agentes de diagnóstico incluem enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, metais emissores de pósitrons usando várias tomografias de emissão de pósitrons e íons metálicos paramagnéticos não radioativos. A substância detectável pode ser acoplada ou conjugada diretamente ao anticorpo ou fragmento do mesmo, ou indiretamente, através de um ligante usando técnicas conhecidas na técnica. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, beta-galactosidase ou acetilcolinesterase. Exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina. Exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona,

fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansil ou ficoeritrina. Um exemplo de um material luminescente inclui o luminol. Exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina. Exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I, ^{131}I, Índio-111, Lutécio-171, Bismuto-212, Bismuto-213, Astatina-211, Cobre-62, Cobre-64, Cobre-67, Ítrio-90, Iodo-125, Iodo-131, Fósforo-32, Fósforo-33, Escândio-47, Prata-111, Gálio-67, Praseodímio-142, Samário-153, Térbio-161, Disprósio- 166, Holmium-166, Rênio-186, Rênio-188, Rênio-189, Chumbo-212, Rádio-223, Actínio-225, Ferro-59, Selênio-75, Arsênio-77, Estrôncio-89, Molibdênio-99, Ródio-1105, Paládio-109, Praseodímio-143, Promécio-149, Erbium-169, Iridium-194, Ouro-198, Ouro-199 e Chumbo-211. Os anticorpos monoclonais podem ser conjugados indiretamente com íons radiometais por meio do uso de agentes quelantes bifuncionais que estão covalentemente ligados aos anticorpos. Os agentes quelantes podem ser ligados por meio de amidades (Meares *et al.* (1984) Anal. Biochem. 142:68-78); grupos sulfidrais (Koyama (1994) Chem. Abstr. 120:217-262) de resíduos de aminoácidos e grupos de carboidratos (Rodwell *et al.* (1986) PNAS USA 83:2632-2636; Quadri *et al.* (1993) Nucl. Med. Biol. 20:559-570).

[0257] Além disso, os anticorpos ou fragmentos dos mesmos da presente divulgação podem ser conjugados a um agente terapêutico. Os agentes terapêuticos adequados incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, di-hidroxi antracina diona, mitoxanitrona, dionidrocina, mitoxanitrona, desidrocinotrina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-desidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puromicina, antimetabólitos (como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil, decarbazina, hidroxiureia, asparaginase, gencitabina, cladribina),

agentes alquilantes (tais como mecloretamina, tioepa, cloramucil, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatina e outros derivados de platina, como carboplatina), antibióticos (como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorrubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), toxina diftérica e moléculas relacionadas (como a cadeia A de difteria e fragmentos ativos dos mesmos e moléculas híbridas), toxina de rícino (como rícino A ou uma toxina de cadeia A de rícino desglicosilada), toxina da cólera, uma toxina semelhante a Shiga (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), Toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetânica, inibidor de protease Bowman-Birk de soja, *Pseudomonas* exotoxina, alorina, saporina, modecina, gelanina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas *Phytolacca americana*(PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrietocina, fenomicina, toxinas enomicina e toxinas mistas.

[0258] Moléculas conjugadas adicionais adequadas incluem ribonuclease (RNase), DNase I, um ácido nucleico antissentindo, uma molécula de RNA inibitória, como uma molécula de siRNA, um ácido nucleico imunoestimulatório, aptâmeros, ribozimas, moléculas formadoras de triplex e sequências guia externas. Aptâmeros são pequenos ácidos nucleicos que variam de 15-50 bases de comprimento que se dobram em estruturas secundárias e terciárias definidas, como laços de haste ou quartetos G, e podem ligar pequenas moléculas, como ATP (Pat. U.S. 5.631.146) e teofilina (Pat. U.S. 5.580.737), bem como moléculas grandes, como a transcriptase reversa (Pat. U.S. 5.786.462) e trombina (Pat. U.S. 5.543.293). Ribozimas são moléculas de ácido nucléico que são capazes de catalisar uma reação química, tanto

intramolecular quanto intermolecularmente. Ribozimas normalmente clivam substratos de ácido nucleico através de reconhecimento e ligação do substrato alvo com clivagem subsequente. As moléculas de ácido nucleico com função de formação de triplex podem interagir com o ácido nucleico de fita dupla ou de fita simples formando um triplex, no qual três fitas de DNA formam um complexo dependente do par de bases de Watson-Crick e Hoogsteen. As moléculas triplex podem ligar regiões alvo com alta afinidade e especificidade.

[0259] As moléculas de ácido nucleico funcional podem agir como efetores, inibidores, moduladores e estimuladores de uma atividade específica possuída por uma molécula alvo ou as moléculas de ácido nucleico funcional podem possuir uma atividade independente de novo de quaisquer outras moléculas.

[0260] Os agentes terapêuticos podem ser ligados ao anticorpo direta ou indiretamente, usando qualquer um de um grande número de métodos disponíveis. Por exemplo, um agente pode ser ligado na região de dobradiça do componente de anticorpo reduzido via formação de ligação dissulfeto, usando reticulantes, como N-succinil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ou através de uma fração de carboidrato na região Fc do anticorpo (Yu *et al.* 1994 Int. J. Cancer 56: 244; Upeslacis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in Monoclonal antibodies: principles and applications, Birch *et al.* (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in Monoclonal antibodies: Production, engineering and clinical application, Ritter *et al.* (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995)).

[0261] As técnicas para conjugar agentes terapêuticos a anticorpos são bem conhecidas (Amon *et al.* "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy; Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc.

1985); Hellstrom *et al.* "Antibodies For Drug Delivery," in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.); Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.* "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates," (1982) Immunol. Rev. 62:119-58).

[0262] Os anticorpos aqui divulgados ou suas regiões de ligação ao antígeno podem ser ligados a outra molécula funcional, como outro anticorpo ou ligando para um receptor para gerar uma molécula bi-específica ou multiespecífica que se liga a pelo menos dois ou mais sítios de ligação diferentes ou moléculas alvo. A ligação do anticorpo a uma ou mais outras moléculas de ligação, como outro anticorpo, fragmento de anticorpo, peptídeo ou mimético de ligação, pode ser feita, por exemplo, por acoplamento químico, fusão genética ou associação não covalente. Moléculas multiespecíficas podem incluir ainda uma terceira especificidade de ligação, além do primeiro e segundo epítopos alvo.

[0263] Moléculas biespecíficas e multiespecíficas podem ser preparadas usando métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, cada unidade de ligação da molécula específica de hi pode ser gerada separadamente e, em seguida, conjugada entre si. Quando as moléculas de ligação são proteínas ou peptídeos, pode ser utilizada uma variedade de agentes de acoplamento ou reticulação para conjugação covalente. Exemplos de agentes de reticulação incluem proteína A, carbodi-imida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5′-ditiobis(ácido 2-nitroberizóico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N- succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) e sulfosuccinimidil 4-(N-

maleimidometil)ciclo-haxano-I-carboxilato (sulfo-SMCC) (Karpovsky *et al.* (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Quando as moléculas de ligação são anticorpos, elas podem ser conjugadas via ligação sulfidril das regiões de dobradiça do C-terminal das duas cadeias pesadas.

[0264] Os anticorpos ou fragmentos dos mesmos da presente divulgação podem ser ligados a uma fração que é tóxica para uma célula à qual o anticorpo está ligado para formar anticorpos de “depleção”.

[0265] Os anticorpos divulgados neste documento também podem ser ligados a suportes sólidos, que são particularmente úteis para imunoensaios ou purificação do antígeno alvo. Esses suportes sólidos incluem, mas sem limitação, vidro, celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinil ou polipropileno.

[0266] Os anticorpos também podem ser ligados a muitos transportadores diferentes. Assim, esta divulgação também fornece composições contendo os anticorpos e outra substância, ativa ou inerte. Exemplos de transportadores bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, náilon, amilase, celulose natural e modificada, poliacrilamida, agarose e magnetita. A natureza do transportador pode ser solúvel ou insolúvel para os fins aqui divulgados. Os versados na técnica conhecerão outros transportadores adequados para a ligação de anticorpos monoclonais, ou serão capazes de averiguar tal, usando experimentação de rotina.

[0267] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo é um anticorpo de comprimento total.

[0268] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

[0269] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste

documento, o anticorpo é quimérico ou humanizado.

[0270] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo é selecionado do grupo que consiste em Fab, F(ab)'2, Fab', scF_v, e F_v.

[0271] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo compreende um domínio Fc. Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo é um animal não humano, tal como um anticorpo de rato, ovelha, bovino, canino, felino ou coelho. Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo é um anticorpo humano ou humanizado ou não é imunogênico em um humano.

[0272] Em alguns dos aspectos dos anticorpos fornecidos neste documento, o anticorpo compreende uma região de estrutura de anticorpo humano.

[0273] Em outros aspectos, um ou mais resíduos de aminoácidos em um CDR dos anticorpos fornecidos neste documento são substituídos por outro aminoácido. A substituição pode ser "conservativa" no sentido de ser uma substituição dentro da mesma família de aminoácidos. Os aminoácidos de ocorrência natural podem ser divididos nas seguintes quatro famílias e as substituições conservativas ocorrerão dentro dessas famílias.

[0274] 1) Aminoácidos com cadeias laterais básicas: lisina, arginina, histidina.

[0275] 2) Aminoácidos com cadeias laterais acídicas: ácido aspártico, ácido glutâmico

[0276] 3) Aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas: asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina.

[0277] 4) Aminoácidos com cadeias laterais não polares: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano, cisteína.

[0278] Em outro aspecto, um ou mais resíduos de aminoácidos são adicionados ou deletados de uma ou mais CDRs de um anticorpo. Tais adições ou deleções ocorrem nos terminais N ou C da CDR ou em uma posição dentro da CDR.

[0279] Ao variar a sequência de aminoácidos das CDRs de um anticorpo por adição, deleção ou substituição de aminoácidos, vários efeitos, tais como afinidade de ligação aumentada para o antígeno alvo podem ser obtidos.

[0280] Deve ser tido em consideração que os anticorpos da presente divulgação compreendendo tais sequências CDR variadas ainda se ligam a uma proteína DNABII com especificidade e perfis de sensibilidade semelhantes aos dos anticorpos divulgados. Isso pode ser testado por meio de ensaios de ligação.

[0281] Em um aspecto adicional, os anticorpos são caracterizados por serem imunodominantes e imunoprotetores, conforme determinado usando ensaios e telas apropriados.

Análise Funcional com Anticorpos

[0282] Os anticorpos divulgados neste documento podem ser usados para purificar os polipeptídeos divulgados neste documento e para identificar polipeptídeos e/ou polinucleotídeos equivalentes biológicos. Eles também podem ser usados para identificar agentes que modificam a função dos polipeptídeos aqui divulgados. Estes anticorpos incluem antissoros policlonais, anticorpos monoclonais e vários reagentes derivados destas preparações que são familiares aos praticados na técnica e descritos acima.

[0283] Os anticorpos que neutralizam as atividades de proteínas codificadas por genes identificados também podem ser usados *in vivo* e *in vitro* para demonstrar a função, adicionando tais anticorpos neutralizantes em sistemas de teste *in vivo* e *in vitro* . Eles também são úteis como agentes farmacêuticos para modular a atividade dos polipeptídeos aqui divulgados.

[0284] Várias preparações de anticorpos também podem ser usadas em métodos analíticos, como ensaios ELISA ou Western blots para demonstrar a expressão de proteínas codificadas pelos genes identificados por células de teste *in vitro* ou *in vivo*. Fragmentos de tais proteínas gerados pela degradação da protease durante o metabolismo também podem ser identificados usando antissoros policlonais apropriados com amostras derivadas de amostras experimentais.

[0285] Os anticorpos aqui divulgados podem ser usados para vacinação ou para reforçar a vacinação, sozinhos ou em combinação com peptídeos ou vacinas baseadas em proteínas ou vacinas baseadas em células dendríticas.

Composições

[0286] Esta divulgação fornece ainda uma composição compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente em um, dois ou mais, três ou mais de: um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, um agente que depleta cátions do biofilme, um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local, um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano . Em um aspecto, a composição não compreende, consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em uma proteína HMB1, fragmento ou um equivalente do mesmo. Em outro aspecto, compreende, consiste essencialmente ou ainda consiste

adicionalmente em, uma DNAse. Em um aspecto adicional, não compreende, consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em uma DNAse. Em uma modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local. Em uma segunda modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em um agente que depleta cátions do biofilme, um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou no seu local ambiente e um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA. Em uma terceira modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local e um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA. Em uma quarta modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente, um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA. Em uma quinta modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste em um agente, um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano. Em uma sexta modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste adicionalmente em um agente, um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, um agente que depleta cátions do biofilme e um agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA. Em uma sétima modalidade, a composição compreende ou alternativamente consiste essencialmente ou ainda consiste

adicionalmente em um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, um agente que depleta cátions do biofilme e um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local.

[0287] As composições desta divulgação podem compreender ainda, ou alternativamente consistir essencialmente em, ou ainda consistir adicionalmente em um transportador farmaceuticamente aceitável.

[0288] Em um aspecto, o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme compreende um ou mais de: um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclo-hexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis[guanil-hidrazona] (MGBG), 1-amino-oxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina e/ou diciclo-hexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos, ou um sal dos mesmos. Em outro aspecto, o agente que depleta cátions do biofilme compreende um ou mais de: uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, um azacrown ou um criptanda, sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, fosfocelulose P11 e/ou heparina sulfato, ou um derivado ou análogo do mesmo. Em ainda outro aspecto, o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou em seu ambiente local compreende um ou mais de: proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos, um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, e/ou cloroquina, ou um derivado de qualquer um dos mesmos. Em um aspecto particular, o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais de: um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU, ou fragmentos de cada um dos mesmos.

[0289] As composições são fornecidas posteriormente. As composições compreendem um transportador e um ou mais de um polipeptídeo isolado aqui divulgado, um polinucleotídeo isolado aqui divulgado, um

vetor aqui divulgado, uma célula hospedeira isolada aqui divulgada, uma pequena molécula ou um anticorpo divulgado neste documento. Os transportadores podem ser um ou mais de um suporte sólido ou um transportador farmaceuticamente aceitável. As composições podem compreender ainda um adjuvante ou outros componentes adequados para administração como vacinas. Em um aspecto, as composições são formuladas com um ou mais excipientes, diluentes, transportadores e/ou adjuvantes farmaceuticamente aceitáveis. Além disso, as modalidades das composições da presente divulgação incluem um ou mais de um polipeptídeo isolado divulgado neste documento, um polinucleotídeo isolado divulgado neste documento, um vetor divulgado neste documento, uma molécula pequena, uma célula hospedeira isolada divulgada neste documento ou um anticorpo da divulgação, formulado com uma ou mais substâncias farmaceuticamente aceitáveis.

[0290] Para preparações orais, qualquer um ou mais de um polipeptídeo isolado ou recombinante como aqui descrito, um polinucleotídeo isolado ou recombinante como aqui descrito, um vetor como aqui descrito, uma célula hospedeira isolada como aqui descrito, uma pequena molécula ou um anticorpo como aqui descrito pode ser usado sozinho ou em formulações farmacêuticas aqui divulgadas compreendendo, ou consistindo essencialmente em, o composto em combinação com aditivos apropriados para fazer comprimidos, pós, grânulos ou cápsulas, por exemplo, com aditivos convencionais, tais como lactose, manitol, milho amido ou amido de batata; com aglutinantes, tais como celulose cristalina, derivados de celulose, goma arábica, amido de milho ou gelatinas; com desintegrantes, tais como amido de milho, amido de batata ou carboximetilcelulose de sódio; com lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio; e se desejado, com diluentes, agentes tamponantes, agentes umectantes, conservantes e agentes aromatizantes. Agentes de ligação farmaceuticamente compatíveis, e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os

comprimidos, pílulas, cápsulas, trociscos e semelhantes podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes ou compostos de natureza semelhante: um ligante, tal como celulose microcristalina, goma adragante ou gelatina; um excipiente, tal como amido ou lactose, um agente desintegrante, tal como ácido álgico, Primogel ou amido de milho; um lubrificante, tal como estearato de magnésio ou Estirotes; um deslizante, tal como dióxido de silício coloidal; um agente edulcorante, tal como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante, tal como hortelã-pimenta, salicilato de metil ou aromatizante de laranja.

[0291] Formulações farmacêuticas e formas de dosagem unitária adequadas para administração oral são particularmente úteis no tratamento de condições crônicas, infecções e terapias em que o paciente autoadministra a droga. Em um aspecto, a formulação é específica para administração pediátrica.

[0292] A divulgação fornece formulações farmacêuticas em que um ou mais de um polipeptídeo isolado divulgado neste documento, um polinucleotídeo isolado divulgado neste documento, um vetor divulgado neste documento, uma célula hospedeira isolada divulgada neste documento ou um anticorpo divulgado neste documento podem ser formulados em preparações para injeção de acordo com a divulgação, dissolvendo-os, suspendendo-os ou emulsionando-os em um solvente aquoso ou não aquoso, como óleos vegetais ou outros semelhantes, glicerídeos de ácido alifático sintético, ésteres de ácidos alifáticos superiores ou propileno glicol; e se desejado, com aditivos convencionais, tais como solubilizantes, agentes isotônicos, agentes de suspensão, agentes emulsionantes, estabilizantes e conservantes ou outros agentes antimicrobianos. Um exemplo não limitativo de tal é um agente antimicrobiano, como outros componentes da vacina, como antígenos de superfície, por exemplo, uma OMP P5, OMP 26, OMP P2 ou proteína Pilin Tipo IV (ver Jurcisek and Bakaletz (2007) J. of Bacteriology 189(10):3868-

3875 and Murphy, T F, Bakaletz, L O and Smeesters, P R (2009) The Pediatric Infectious Disease Journal, 28:S121-S126) e agentes antibacterianos. Para administração intravenosa, os transportadores adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, uma composição para administração parenteral deve ser estéril e deve ser fluida até o ponto em que exista uma fácil utilização da seringa.

[0293] As formulações de aerossol fornecidas pela divulgação podem ser administradas por inalação e podem ser baseadas em propulsor ou não. Por exemplo, modalidades das formulações farmacêuticas divulgadas neste documento compreendem um composto divulgado neste documento formulado em propelentes pressurizados aceitáveis, como diclorodifluorometano, propano, nitrogênio e semelhantes. Para administração por inalação, os compostos podem ser distribuídos na forma de um jato de aerossol de um recipiente ou distribuidor pressurizado que contém um propulsor adequado, por exemplo, um gás, tal como dióxido de carbono ou um nebulizador. Um exemplo não limitativo de um não propelente é uma bomba de spray que é ejetada de um recipiente fechado por meio de força mecânica (ou seja, empurrando um pistão com um dedo ou por compressão do recipiente, como por uma força compressiva aplicada à parede do recipiente ou uma força elástica exercida pela própria parede, por exemplo, por uma bexiga elástica).

[0294] Os supositórios divulgados neste documento podem ser preparados pela mistura de um composto divulgado neste documento com qualquer uma de uma variedade de bases, tais como bases emulsificantes ou bases solúveis em água. As modalidades desta formulação farmacêutica de um composto aqui divulgado podem ser administradas por via retal por meio de um supositório. O supositório pode incluir veículos como manteiga de cacau, carboceras e polietileno

glicóis, que derretem à temperatura corporal, mas são solidificados à temperatura ambiente.

[0295] As formas de dosagem unitária para administração oral ou retal, como xaropes, elixires e suspensões, podem ser fornecidas em que cada unidade de dosagem, por exemplo, colher de chá, colher de sopa, comprimido ou supositório, contém uma quantidade predeterminada da composição contendo um ou mais compostos divulgados neste documento. Da mesma forma, as formas de dosagem unitária para injeção ou administração intravenosa podem compreender um composto aqui divulgado em uma composição como uma solução em água estéril, solução salina normal ou outro transportador farmaceuticamente aceitável.

[0296] As modalidades das formulações farmacêuticas divulgadas neste documento incluem aquelas em que um ou mais de um polipeptídeo isolado divulgado neste documento, um polinucleotídeo isolado divulgado neste documento, um vetor divulgado neste documento, uma pequena molécula para uso na divulgação, uma célula hospedeira isolada divulgada neste documento, ou um anticorpo divulgado neste documento é formulado em uma composição injetável. As formulações farmacêuticas injetáveis aqui divulgadas são preparadas como soluções ou suspensões líquidas; ou como formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção. A preparação também pode ser emulsificada ou o ingrediente ativo encapsulado em veículos de lipossoma de acordo com outras modalidades das formulações farmacêuticas divulgadas neste documento.

[0297] Em uma modalidade, um ou mais de um polipeptídeo isolado divulgado neste documento, um polinucleotídeo isolado divulgado neste documento, um vetor divulgado neste documento, uma célula hospedeira isolada divulgada neste documento ou um anticorpo divulgado neste documento é formulado para distribuição por um sistema de distribuição

contínua. O termo “sistema de distribuição contínua” é usado indistintamente aqui com “sistema de distribuição controlada” e abrange dispositivos de distribuição contínua (por exemplo, controlada) (por exemplo, bombas) em combinação com cateteres, dispositivos de injeção e semelhantes, uma grande variedade dos quais são conhecidos na técnica.

[0298] Bombas de infusão mecânicas ou eletromecânicas também podem ser adequadas para uso com a presente divulgação. Exemplos de tais dispositivos incluem aqueles descritos em, por exemplo, Pat. U.S. 4.692.147; 4.360.019; 4.487.603; 4.360.019; 4.725.852; 5.820.589; 5.643.207; 6.198.966; e semelhantes. Em geral, a distribuição de um composto divulgado neste documento pode ser realizada usando qualquer um de uma variedade de sistemas de bomba recarregáveis. As bombas fornecem uma liberação consistente e controlada ao longo do tempo. Em algumas modalidades, um composto divulgado neste documento está em uma formulação líquida em um reservatório impermeável a drogas e é administrado de forma contínua ao indivíduo.

[0299] Em uma modalidade, o sistema de distribuição de drogas é um dispositivo pelo menos parcialmente implantável. O dispositivo implantável pode ser implantado em qualquer local de implantação adequado usando métodos e dispositivos bem conhecidos na técnica. Um local de implantação é um local dentro do corpo de um sujeito no qual um dispositivo de distribuição de droga é introduzido e posicionado. Os locais de implantação incluem, mas não estão necessariamente limitados a, um local subdérmico, subcutâneo, intramuscular ou outro local adequado dentro do corpo de um sujeito. Os locais de implantação subcutânea são usados em algumas modalidades por causa da conveniência na implantação e remoção do dispositivo de distribuição de drogas.

[0300] Dispositivos de liberação de drogas adequados para uso na

divulgação podem ser baseados em qualquer um de uma variedade de modos de operação. Por exemplo, o dispositivo de liberação de droga pode ser baseado em um sistema difusivo, um sistema convectivo ou um sistema erodível (por exemplo, um sistema baseado em erosão). Por exemplo, o dispositivo de liberação de droga pode ser uma bomba eletroquímica, bomba osmótica, bomba eletro-osmótica, bomba de pressão de vapor ou matriz de ruptura osmótica, por exemplo, onde a droga é incorporada a um polímero e o polímero fornece a liberação de formulação de droga concomitante com degradação de um material polimérico impregnado com droga (por exemplo, um material polimérico impregnado com droga biodegradável). Em outras modalidades, o dispositivo de liberação de droga é baseado em um sistema de eletrodifusão, uma bomba eletrolítica, uma bomba efervescente, uma bomba piezoelétrica, um sistema hidrolítico, etc.

[0301] Dispositivos de liberação de drogas com base em uma bomba de infusão mecânica ou eletromecânica também podem ser adequados para uso com a presente divulgação. Exemplos de tais dispositivos incluem aqueles descritos em, por exemplo, Pat. U.S. 4.692.147; 4.360.019; 4.487.603; 4.360.019; 4.725.852; e semelhantes. Em geral, um método de tratamento em questão pode ser realizado usando qualquer um de uma variedade de sistemas de bomba recarregáveis e não trocáveis. Bombas e outros sistemas convectivos podem ser utilizados devido à sua liberação geralmente mais consistente e controlada ao longo do tempo. As bombas osmóticas são usadas em algumas modalidades devido às suas vantagens combinadas de liberação controlada mais consistente e tamanho relativamente pequeno (ver, por exemplo, Publicação de Pedido Internacional PCT WO 97/27840 e Pat. U.S. 5.985.305 e 5.728.396). Dispositivos acionados osmoticamente exemplificativos adequados para uso na divulgação incluem, mas não estão necessariamente limitados a, aqueles descritos na Pat. U.S. 3.760.984; 3.845.770; 3.916.899; 3.923.426; 3.987.790; 3.995.631; 3.916.899; 4.016.880; 4.036.228;

4.111.202; 4.111.203; 4.203.440; 4.203.442; 4.210.139; 4.327.725; 4.627.850; 4.865.845; 5.057.318; 5.059.423; 5.112.614; 5.137.727; 5.234.692; 5.234.693; 5.728.396; e semelhantes. Um outro dispositivo exemplificativo que pode ser adaptado para a presente divulgação é a bomba de infusão sincronizada (Medtronic).

[0302] Em algumas modalidades, o dispositivo de distribuição de drogas é um dispositivo implantável. O dispositivo de distribuição de droga pode ser implantado em qualquer local de implantação adequado usando métodos e dispositivos bem conhecidos na técnica. Conforme observado neste documento, um local de implantação é um local dentro do corpo de um sujeito no qual um dispositivo de distribuição de droga é introduzido e posicionado. Os locais de implantação incluem, mas não estão necessariamente limitados a, um local subdérmico, subcutâneo, intramuscular ou outro local adequado dentro do corpo de um sujeito.

[0303] Os veículos de excipiente adequados para um composto divulgado neste documento são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e combinações dos mesmos. Além disso, se desejado, o veículo pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares, tais como agentes umectantes ou emulsionantes ou agentes tamponantes de pH. Os métodos de preparação de tais formas de dosagem são conhecidos, ou serão evidentes após consideração desta divulgação, para aqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 17th edition, 1985. A composição ou formulação a ser administrada irá, em qualquer caso, conter uma quantidade do composto adequada para atingir o estado desejado no sujeito a ser tratado.

[0304] As composições da presente divulgação incluem aquelas que compreendem uma matriz de liberação sustentada ou de liberação controlada. Além disso, as modalidades da presente divulgação podem ser usadas em conjunto com outros tratamentos que usam formulações

de liberação sustentada. Como utilizado neste documento, uma matriz de liberação sustentada é uma matriz feita de materiais, geralmente polímeros, que são degradáveis por hidrólise enzimática ou à base de ácido ou por dissolução. Uma vez inserida no corpo, a matriz é influenciada por enzimas e fluidos corporais. Uma matriz de liberação sustentada desejavelmente é escolhida de materiais biocompatíveis, tais como lipossomas, polilactídeos (ácido polilático), poliglicolídeo (polímero de ácido glicólico), co-glicolídeo de polilactídeo (copolímeros de ácido lático e ácido glicólico), polianidridos, poli(orto)ésteres, polipeptídeos, ácido hialurônico, colágeno, sulfato de condroitina, ácidos carboxíclicos, ácidos graxos, fosfolipídeos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, poliaminoácidos, aminoácidos tais como fenilatanina, tirosina, isoleucina, polinucleotídeos, polivinilpropileno, polivinilpirrolidona e silicone. Matrizes biodegradáveis ilustrativas incluem uma matriz de polilactídeo, uma matriz de poliglicolídeo e uma matriz de polilactídeo co-glicolídeo (copolímeros de ácido lático e ácido glicólico).

[0305] Em outra modalidade, o agente (bem como as composições de combinação) é administrado em um sistema de liberação controlada. Por exemplo, um composto aqui divulgado pode ser administrado usando infusão intravenosa, uma bomba osmótica implantável, um adesivo transdérmico, lipossomas ou outros modos de administração. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada (Sefton (1987) CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald *et al.* (1980) Surgery 88:507; Saudek *et al.* (1989) N. Engl. J. Med. 321:574). Em outra modalidade, materiais poliméricos são usados. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada é colocado nas proximidades do alvo terapêutico, isto é, o fígado, exigindo assim apenas uma fração da dose sistêmica. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada é colocado na proximidade do alvo terapêutico, exigindo, assim, apenas uma fração do sistêmico. Outros sistemas de liberação controlada são discutidos na revisão por Langer, (1990) Science 249:1527-1533.

[0306] Em outra modalidade, as composições da presente divulgação (bem como composições de combinação separadamente ou juntas) incluem aquelas formadas por impregnação de um agente de inibição aqui descrito em materiais absortivos, tais como suturas, bandagens e gaze, ou revestidos na superfície de materiais em fase sólida, como grampos cirúrgicos, zíperes e cateteres para administrar as composições. Outros sistemas de distribuição deste tipo serão prontamente evidentes para os versados na técnica em vista da presente divulgação.

[0307] A presente divulgação fornece métodos e composições para a administração de um ou mais de um agente a um hospedeiro (por exemplo, um humano) para o tratamento de uma infecção microbiana. Em várias modalidades, esses métodos divulgados neste documento abrangem quase qualquer método disponível e rota adequada para a distribuição de drogas, incluindo métodos *in vivo* e *ex vivo* bem como vias de administração sistêmicas e localizadas.

Ensaios de Triagem

[0308] A presente divulgação fornece métodos para a triagem de agentes equivalentes, tais como anticorpos monoclonais equivalentes para um anticorpo policlonal conforme descrito neste documento e vários agentes que modulam a atividade dos agentes ativos e composições farmacêuticas divulgadas neste documento ou a função de um polipeptídeo ou produto peptídico codificado pelo polinucleotídeo divulgado neste documento. Para os fins desta divulgação, um “agente” se destina a incluir, mas não está limitado a um composto biológico ou químico, como uma molécula orgânica ou inorgânica simples ou complexa, um peptídeo, uma proteína (por exemplo, anticorpo), um polinucleotídeo antissentido) ou uma ribozima. Uma vasta gama de compostos pode ser sintetizada, por exemplo, polímeros, tais como polipeptídeos e polinucleotídeos e compostos orgânicos sintéticos com base em várias estruturas centrais, e estes também estão incluídos no termo “agente”. Além disso, várias

fontes naturais podem fornecer compostos para triagem, como extratos de plantas ou animais e semelhantes. Deve ser entendido, embora nem sempre explicitamente declarado, que o agente é usado sozinho ou em combinação com outro agente, tendo a mesma ou diferente atividade biológica dos agentes identificados pela pesquisa inventiva.

[0309] Como é evidente para um versado na técnica, células adequadas podem ser cultivadas em placas de microtitulação e vários agentes podem ser testados ao mesmo tempo, observando alterações genotípicas, alterações fenotípicas ou uma redução no título microbiano.

[0310] Quando o agente é uma composição diferente de DNA ou RNA, como uma pequena molécula, conforme descrito acima, o agente pode ser adicionado diretamente à cultura de células ou adicionado ao meio de cultura para adição. Como é evidente para os versados na técnica, uma montagem “eficaz” deve ser adicionada, a qual pode ser determinada empiricamente,

[0311] Quando o agente é um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, o agente pode ser contatado ou incubado com o antígeno alvo e o anticorpo policlonal conforme descrito neste documento sob condições para realizar um ELISA competitivo. Esses métodos são conhecidos do versado na técnica.

[0312] Os ensaios também podem ser realizados em um sujeito. Quando o sujeito é um animal, como um rato, chinchila, camundongo ou símio, o método fornece um sistema de modelo animal conveniente que pode ser usado antes do teste clínico de um agente em um paciente humano. Neste sistema, um agente candidato é uma droga potencial se os sintomas da doença ou infecção microbiana forem reduzidos ou eliminados, cada um em comparação com o animal não tratado com a mesma infecção. Também pode ser útil ter um grupo de controle negativo separado de células ou animais saudáveis e não tratados, o que fornece uma base de

comparação.

[0313] Os agentes e composições podem ser usados na fabricação de medicamentos e para o tratamento de humanos e outros animais por administração de acordo com procedimentos convencionais, como um ingrediente ativo em composições farmacêuticas.

Terapia de Combinação

[0314] As composições e métodos relacionados da presente divulgação podem ser usados em combinação com a administração de outras terapias. Estes incluem, mas sem limitação, a administração de enzimas DNase, antibióticos, antimicrobianos ou outros anticorpos. Em um aspecto, o agente é administrado na ausência de uma enzima DNase.

[0315] Em outras modalidades, os métodos e composições podem ser combinados com antibióticos e/ou antimicrobianos. Os antimicrobianos são substâncias que matam ou inibem o crescimento de micro-organismos, como bactérias, fungos ou protozoários. Embora os biofilmes sejam geralmente resistentes às ações dos antibióticos, as composições e os métodos descritos neste documento podem ser usados para sensibilizar a infecção envolvendo um biofilme aos métodos terapêuticos tradicionais para o tratamento de infecções. Em outras modalidades, o uso de antibióticos ou antimicrobianos em combinação com métodos e composições aqui descritos permitem a redução da quantidade eficaz do agente antimicrobiano e/ou redutor de biofilme. Alguns exemplos não limitativos de antimicrobianos e antibióticos úteis em combinação com métodos da divulgação atual incluem amoxicilina, amoxicilina-clavulanato, cefdinir, azitromicina e sulfametoxazol-trimetoprima. A dose terapeuticamente eficaz do antimicrobiano e/ou antibiótico em combinação com o agente de redução de biofilme pode ser facilmente determinada por métodos tradicionais. Em algumas modalidades, a dose do agente antimicrobiano em combinação com o agente redutor de

biofilme é a dose eficaz média que se mostrou eficaz em outras infecções bacterianas, por exemplo, infecções bacterianas em que a etiologia da infecção não inclui um biofilme. Em outras modalidades, a dose é 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5, 3,0 ou 5 vezes a dose eficaz média. O antibiótico ou antimicrobiano pode ser adicionado antes, simultaneamente ou após a adição do anticorpo anti-DNABII.

[0316] Em outras modalidades, os métodos e composições podem ser combinados com anticorpos que tratam a infecção bacteriana. Um exemplo de um anticorpo útil em combinação com os métodos e composições aqui descritos é um anticorpo dirigido contra uma proteína da membrana externa não relacionada (isto é, OMP P5). O tratamento com este anticorpo sozinho não reduz o volume de um biofilme *in vitro*. A terapia combinada com este anticorpo e um agente redutor de biofilme resulta em um efeito maior do que aquele que poderia ser alcançado por qualquer um dos reagentes usados isoladamente na mesma concentração. Outros anticorpos que podem produzir um efeito sinérgico quando combinados com um agente redutor de biofilme ou métodos para reduzir um biofilme incluem preparações anti-rsPilA anti-OMP26, anti-OMP P2 e anti-OMP completo.

[0317] As composições e métodos descritos aqui podem ser usados para sensibilizar a infecção bacteriana envolvendo um biofilme para modalidades terapêuticas comuns eficazes no tratamento de infecções bacterianas sem um biofilme, mas são ineficazes no tratamento de infecções bacterianas envolvendo um biofilme. Em outras modalidades, as composições e métodos aqui descritos podem ser usados em combinação com modalidades terapêuticas que são eficazes no tratamento de infecções bacterianas envolvendo um biofilme, mas a combinação de tal terapia adicional e agente redutor de biofilme ou

método produz um efeito sinérgico de modo que a dose eficaz do agente redutor de biofilme ou do agente terapêutico adicional pode ser reduzida. Em outros casos, a combinação de tal terapia adicional e agente ou método de redução de biofilme produz um efeito sinérgico de modo que o tratamento é intensificado. Uma intensificação do tratamento pode ser evidenciado por um menor período de tempo necessário para tratar a infecção.

[0318] O tratamento terapêutico adicional pode ser adicionado antes, simultaneamente ou subsequentemente aos métodos ou composições usados para reduzir o biofilme e pode estar contido na mesma formação ou como uma formulação separada.

Kits

[0319] São fornecidos aqui kits compreendendo ou alternativamente consistindo essencialmente ou ainda consistindo adicionalmente na composição aqui divulgada e nas instruções de uso. Em um aspecto, as instruções de uso fornecem instruções para conduzir qualquer um dos métodos aqui divulgados. Em um aspecto, um ou mais, dois ou mais ou três ou mais dos agentes para uso nos métodos divulgados são embalados de forma independente ou juntos no kit.

[0320] Kits contendo os agentes e as instruções necessárias para realizar os métodos *in vitro* e *in vivo*, conforme descrito neste documento, também são reivindicados. Por conseguinte, a divulgação fornece kits para realizar esses métodos que podem incluir conforme divulgado neste documento, bem como instruções para realizar os métodos divulgados neste documento, como coleta de tecido e/ou realização da triagem e/ou análise dos resultados e/ou administração de uma quantidade eficaz de um agente conforme definido neste documento. Estes podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros agentes antimicrobianos adequados.

[0321] Os exemplos a seguir têm como objetivo ilustrar, e não limitar as modalidades aqui divulgadas.

Experimento N.º 1

[0322] As poliaminas são pequenos policátions alifáticos ubíquos produzidos e utilizados por quase todos os organismos vivos. Michael *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(29):14896-903; D'Agostino *et al.* (2005) FEBS J. 272(15):3777-87. Derivados de aminoácidos, eles desempenham papéis em uma variedade de funções celulares centrais para o crescimento e a proliferação, incluindo a transcrição, tradução, regulação da transcrição, autofagia e resistência ao estresse. Miller-Fleming *et al.* (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. Existem múltiplas vias para a síntese de poliamina, e sua presença no repertório metabólico varia entre as espécies. Michael *et al.* (2016) Biochem J. 473(15):2315-29. Devido à natureza inespecífica de suas interações mediadas por eletrostática, a síntese de poliamina é rigidamente regulada por meio de uma combinação de transcrição, tradução e mecanismos de degradação de proteínas. Miller-Fleming *et al.* (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406.

[0323] Existem cinco moléculas de poliamina primárias produzidas por organismos vivos; espermina, espermidina, putrescina, cadaverina e 1,3-diaminopropano. Miller-Fleming *et al.* (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. Tipos adicionais de poliaminas são produzidos de uma maneira mais específica para a espécie. Cada poliamina tem atributos ligeiramente diferentes, devido às diferenças de comprimento e número de grupos de aminas que ditam o caráter catiônico e a distribuição de cargas. Michael *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(29):14896-903. Esta variação permite algum nível de especificidade na atividade de poliamina, bem como direciona a montagem de agregados de poliamina. D'Agostino *et al.* (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; D'Agostino *et al.* (2006) IUBMB Life 58(2):75-82.

[0324] A função da poliamina depende da concentração, conforme evidenciado pelos vários estados de doença que estão correlacionados com a desregulação das concentrações de poliamina. Miller-Fleming *et al.* (2015) J Mol Biol 427(21):3389-406. Os processos metabólicos gerais podem ser interrompidos devido a níveis alterados de poliaminas, e processos específicos podem ser alterados por mudanças específicas ou gerais nos níveis de poliaminas. Por exemplo, concentrações específicas de poliamina podem mediar resultados diferentes para a produção de biofilme microbiano. Em várias espécies, foi demonstrado que os níveis intracelulares de poliamina regulam a biogênese do biofilme e que essa regulação é provavelmente devido à detecção intracelular de poliaminas específicas. Karatan *et al.* (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7; McGinnis *et al.* (2009) FEMS Microbiol Lett. 299(2):166-74; Wortham *et al.* (2010) Environ Microbiol. 12(7):2034-47. Quais poliaminas medeiam esses fenótipos podem ser espécies específicas. Em cepas mutantes sem a capacidade de produzir uma poliamina específica, a adição exógena daquela poliamina que é incapaz de ser sintetizada restaurou a formação de biofilme, enquanto a adição de outras poliaminas não. Além disso, a literatura está repleta de exemplos de formação de biofilme bacteriano sendo inibida por concentrações endógenas ou altas de poliaminas específicas exógenas e seus derivados, enquanto outras poliaminas não têm efeito. Karatan *et al.* (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7; Goytia *et al.* (2013) FEMS Microbiol Lett. 343(1):64-9; Cardile *et al.* (2017) Adv Exp Med Biol. 973:53-70; Wang *et al.* (2016) J Bacteriol. 198(19):2682-91; Qu *et al.* (2016) Microbiologyopen. 5(3):402-12; Konai *et al.* (2015) Bioconjug Chem. 26(12):2442-53; Si *et al.* (2015) Appl Microbiol Biotechnol. 99(24):10861-70; Dewangan *et al.* (2014) Antimicrob Agents Chemother. 58(9):5435-47; Ding *et al.* (2014) Appl Environ Microbiol. 80(4):1498-506; Planet *et al.* (2013) MBio. 4(6):e00889-13. No entanto, as mesmas poliaminas que inibem uma espécie podem não inibir a biogênese do biofilme e podem até ser necessárias para a produção de biofilme em outras espécies bacterianas. Karatan *et al.* (2013) Biotechnol Lett.

35(11):1715-7; McGinnis *et al.* (2009) FEMS Microbiol Lett. 299(2):166-74; Wortham *et al.* (2010) Environ Microbiol. 12(7):2034-47; Wang *et al.* (2016) J Bacteriol. 198(19):2682-91; Hobley *et al.* (2017) J Biol Chem. 292(29):12041-53; Ou *et al.* (2017) Mol Med Rep. 15(1):21-20; Nesse *et al.* (2015) Appl Environ Microbiol. 81(6):2226-32; Ramon-Perez *et al.* (2015) Microb Pathog. 79:8-16; Hobley *et al.* (2014) Cell. 156(4):844-54; Sakamoto *et al.* (2012) Int J Biochem Cell Biol. 44(11):1877-86; Burrell *et al.* (2010) J Biol Chem. 285(50):39224-38; Lee *et al.* (2009) J Biol Chem. 284(15):9899-907; Patel *et al.* (2006) J Bacteriol. 188(7):2355-63. Além disso, embora o papel das poliaminas no desenvolvimento do biofilme fúngico seja menos bem definido, os mutantes de *Candida albicans* na síntese de poliamina são deficientes para a produção de biofilme e o tratamento de *C. albicans* com inibidores da síntese de poliamina afeta negativamente o crescimento do biofilme. Chen *et al.* (2014) Mol Biosyst. 10(1):74-85; Liao *et al.* (2015) Int J Antimicrob Agents. 46(1):45-52.

[0325] Uma fonte potencial de estabilização de eDNA é a presença de poliaminas na matriz do biofilme. Foi observado que poliaminas modulam a estrutura do DNA (Pasini *et al.* (2014) Amino Acids. 46 (3):595-603) e proteger o DNA de agentes modificadores externos ou condições perigosas. D'Agostino *et al.* (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; Baeza *et al.* (1991) Orig Life Evol Biosph. 21(4):225-42; Nayvelt *et al.* (2010) Biomacromolecules. 11(1):97-105. O papel das poliaminas na estabilização da cromatina intracelular foi bem documentado. Pasini *et al.* (2014) Amino Acids. 46(3):595-603. Aqui, os Requerentes levantaram a hipótese de que as poliaminas extracelulares estabilizam a estrutura de eDNA de biofilmes bacterianos e mostram que a alteração do ter de poliamina e a capacidade das poliaminas de ligar eDNA na matriz de biofilme extracelularmente como um meio de interromper as comunidades de biofilme bacteriano. Os Requerentes observaram que a inibição da síntese ou antagonismo de poliaminas interrompeu biofilmes

bacterianos estabelecidos e que a suplementação de bactérias depletadas de poliamina restaurou a estrutura do eDNA.

As poliaminas estão presentes na matriz extracelular de biofilmes bacterianos

[0326] Para determinar se as poliaminas estavam presentes na matriz do biofilme, como um patógeno humano modelo, os Requerentes cultivaram biofilmes de *Haemopilus influenzae* não tipificáveis (NTHi) *in vitro* e realizaram imunofluorescência com anticorpos direcionados à putrescina, espermina ou espermidina. A localização da poliamina dentro da matriz extracelular do biofilme foi visualizada usando microscopia confocal de varredura a laser (CLSM; **FIG**. **12**). Todas as três poliaminas foram detectadas por microscopia de imunofluorescência em todo o biofilme.

A inibição da síntese de poliamina ou antagonismo de poliamina interrompe os biofilmes bacterianos

[0327] A diciclo-hexilamina inibe a espermidina sintase por meio de um mecanismo de inibição competitivo, ou seja, por meio da ligação ao mesmo local da proteína que o substrato da putrescina. Os requerentes, portanto, levantaram a hipótese de que a diciclo-hexilamina inibiria o desenvolvimento de biofilme NTHi. Em primeiro lugar, os requerentes confirmaram que a diciclo-hexilamina não afetou o crescimento de NTHi até 10 mM (**FIG**. **13**). No entanto, a adição de 50 μM de diciclo-hexilamina inibiu significativamente a formação de biofilme NTHi, conforme avaliado pela análise COMSTAT, reduzindo a espessura do biofilme e a biomassa em aproximadamente 40% enquanto aumenta a rugosidade do biofilme (**FIG**. **14**). A microscopia de imunofluorescência subsequente para a presença de espermidina nos biofilmes NTHi residuais tratados com diciclo-hexilamina revelou uma diminuição estatisticamente significativa correspondente na espermidina presente na matriz do biofilme (**FIG**. **15**).

A diciclo-hexilamina também reduziu a quantidade e a complexidade das estruturas de suporte de eDNA produzidas durante a formação inicial do biofilme (**FIG**. **16**). A adição exógena de 1 mM de espermidina aos biofilmes NTHi tratados com diciclo-hexilamina restaurou a espessura, biomassa e rugosidade normais do biofilme (**FIG**. **14**), indicando que a diciclo-hexilamina estava funcionando como um inibidor competitivo de qualquer espermidina sintase e/ou espermidina exógena na matriz extracelular do biofilme. Esses dados revelam que, por meio da inibição da síntese de poliamina ou da ligação antagônica aos sítios de ligação da poliamina, os compostos direcionados às poliaminas extracelulares que se ligam ao eDNA na matriz do biofilme têm potencial para prevenção da biogênese do biofilme e rompimento de biofilmes estabelecidos.

Experimento N.º 2

[0328] Estima-se que a patogênese de > 80% de todas as doenças infecciosas bacterianas incluem um estado de biofilme necessário na patogênese do curso da doença, de acordo com os Centros de Controle e Prevenção de Doenças. Biofilmes são compostos de células bacterianas anexadas a superfícies abióticas e bióticas que progrediram em uma população estruturada que está embutida em uma substância polimérica extracelular (EPS) que inclui ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, biopolímeros (Davies (2003) Nat Rev Drug Discov. 2(2):114-22), e cátions divalentes (Cavaliere *et al.*, (2014) Microbiology Open. 3(4):557-567). A EPS atua como uma barreira protetora contra ambientes hostis e agentes antimicrobianos, como antibióticos e efetores imunes do hospedeiro (Devaraj *et al.*, (2013), supra. Os componentes estruturais e arquitetônicos cruciais da matriz do biofilme são o DNA extracelular (eDNA) e a família DNABII de proteínas de ligação ao DNA (IHF e HU). As proteínas DNABII se ligam com alta afinidade ao eDNA, o que permite a estabilização do biofilme. Os anticorpos direcionados ao DNABII induzem o colapso do biofilme com a liberação da bactéria residente *in vitro* and in

*vivo (*Novotny *et al.* (2016) *EBioMedicine*. (10):33-44); and Goodman *et al.* (2011) *Mucosal Immunology*. 4 (6): 625-637. Embora o tratamento com DNase possa evitar que as espécies bacterianas formem um biofilme, ele tem pouco ou nenhum efeito sobre os biofilmes pré-existentes (Flemming and Wingender, (2010) *Nature Reviews Microbiology*. 8:623-633. Cátions divalentes carregados positivamente (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}e Ca^{2+}) mediam a reticulação intermolecular entre moléculas de DNA carregadas negativamente adjacentes. Essa interação estabiliza a estrutura do DNA e as subsequentes interações DNA-proteína (Gueroult *et al.* (2012) *PLOS ONE*. (7)-7-e41704; and Tan and Chen, (2006) *Biophysical Journal*. (90): 1175-1190; Hackl *et al.* (2005) *International Journal of Biological Macromolecules* 35:175-191. Além disso, a remoção de cátions Mg^{2+} de biofilmes aumenta a suscetibilidade de *Haemophilus influenzae* não tipável (NTHi) ao tratamento com antibióticos (Cavaliere *et al.* (2014) *Microbiology Open*. 3(4):557-567. Finalmente, as poliaminas (aminas biogênicas policatiônicas curtas) também são importantes para a formação de biofilme por várias espécies bacterianas (Patel *et al.* (2006) *Journal of Bacteriology*. 2355-2363; and Hobley *et al.*, (2017) *Journal of Biological Chemistry. 292(29): 12041-12053*. Imagens de imunofluorescência CLSM (IF) de biofilmes formados por muitas bactérias patogênicas quando sondadas quanto à presença de espermidina indicam que as poliaminas são parte da EPS de biofilmes bacterianos e, além disso, que colocalizam com a proteína DNABII HU (**FIG**. **17A**). A inibição da via de biossíntese da espermidina em NTHI pelo inibidor da enzima diciclo-hexilamina (DCHA) resulta em uma diminuição geral nos níveis de espermidina conforme medido por IF e uma diminuição significativa na espessura média do biofilme, indicando assim que as poliaminas são críticas para a estabilidade dos biofilmes (**FIG**. **17B e FIG**. **17C**).

[0329] A capacidade dos microrganismos de formar biofilmes é altamente problemática e onipresente entre uma ampla gama de indústrias. Por

exemplo, infecções associadas a dispositivos adquiridos em hospitais de válvulas cardíacas mecânicas, cateteres urinários e cateteres venosos são o resultado de contaminação bacteriana na forma de um biofilme (Donlan, (2001) Emerging Infectious Diseases. 7(2):277-281. O controle da formação de biofilme em instalações agrícolas e de processamento de alimentos também é importante para a prevenção de doenças e extensa perda de alimentos. Chmielewski and Frank (2006) Compr Rev Food Sci F 2:22–32. As estações de tratamento de águas residuais também desenvolvem problemas mediados por biofilme, como bioincrustação, o acúmulo de EPS e micro-organismos que impedem a filtração por membrana adequada, o que leva à contaminação da água (Wood *et al.*, (2016) PNAS. E2802-E2811).

[0330] O revestimento de superfícies e/ou tratamento de biofilmes com resinas de troca catiônica (sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose ou heparina sepharose) utiliza as propriedades da química da resina carregada negativamente para direcionar componentes carregados positivamente da EPS (ou seja, poliaminas, cátions metálicos divalentes e proteínas DNABII). Isso resulta em interrupção e prevenção do biofilme em superfícies bióticas e abióticas. Aqui, os Requerentes demonstram que as resinas de troca catiônica P11 fosfocelulose e heparina sepharose previnem a formação de biofilme e são capazes de interromper biofilmes pré-formados.

As resinas de troca catiônica têm um efeito negativo nos biofilmes pré-formados e na formação de biofilmes por Haemophilus influenzae não tipável (NTHI).

[0331] Os Requerentes questionaram se resinas com carga negativa incapazes de penetrar em biofilmes poderiam atuar para titular moléculas de carga positiva (ou seja, poliaminas, cátions de metal divalente e proteínas DNABII) que são universalmente necessárias para a formação de biofilme bacteriano. Duas resinas foram escolhidas, por

exemplo, fosfocelulose (P11) e heparina sepharose, ambas trocadores de cátions usados para cromatografia de troca iônica, mas também usados para purificação por afinidade de proteínas DNABII (Nash *et al.* (1987) *Journal of Bacteriology*. 4124-4127; and Vorgias and Wilson, (1991) *Escherichia coli. Protein Expression and Purifcation*. 2(5-6):317-20).

[0332] Para determinar a atividade antibiofilme de resinas de troca catiônica em biofilmes pré-formados (ou seja, capacidade de interromper um biofilme existente), o crescimento de NTHI foi iniciado e mantido por 24 horas, depois tratado por 16 horas com 0 (Controle de sBHI), 0,1, 1 ou 5% (p/v) de fosfocelulose P11 (**FIG**. **18A**). Para determinar a atividade antibiofilme de resinas de troca catiônica para prevenir a formação de biofilme, o crescimento de NTHI foi iniciado e mantido na presença de 0 (controle de sBHI), 0,1, 1 e 5% p/v de fosfocelulose P11 (**FIG**. **18B**) ou 5% (p/v) de heparina sepharose (**FIG**. **19**). Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados em microscopia confocal de varredura (CSLM) e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Conforme indicado na **FIG**. **18**, a fosfocelulose P11 teve um efeito negativo sobre os biofilmes pré-formados (foi capaz de interromper) e a formação de biofilme (foi capaz de prevenir), o que foi revelado pela diminuição da espessura média e da biomassa. A heparina sepharose também teve um efeito negativo na formação de biofilme, onde uma diminuição na espessura média e biomassa foi observada (**FIG**. **18**). Esses dados sugerem que as resinas de troca catiônica podem interromper e prevenir a formação de biofilme *in vitro*.

DNABII (HU) restaurou parcialmente os biofilmes NTHi pré-formados depletados de cátions.

[0333] Para determinar se a remoção das proteínas DNABII foi em parte responsável pela interrupção e prevenção do biofilme observada, o crescimento de NTHI foi iniciado e mantido na presença de 0 (controle de

sBHI) ou 1% de fosfocelulose P11 (p/v) por 24 horas com a adição exógena de proteína HU a 1 ou 5ug/mL por 16 horas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Como mostrado na **FIG**. **19**, HU pode compensar parcialmente o efeito negativo da fosfocelulose *in vitro.* Esses dados sugerem que HU é alvo da resina de troca catiônica.

Metais divalentes restauram parcialmente os biofilmes NTHI pré-formados depletados de cátions.

[0334] Para determinar se Mg^{2+} pode restaurar biofilmes depletados de cátions, o crescimento de NTHI foi iniciado e mantido na presença de 0 (controle de sBHI) ou 1% de fosfocelulose P11 (p/v) por 24 horas com adição exógena de $MgCl_2$ (0-10 mM) por 16h. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Como mostrado na **FIG**. **20**, $MgCl_2$ pode compensar parcialmente o efeito disruptivo da fosfocelulose*in vitro.* Esses dados sugerem que a fosfocelulose P11 depleta os metais divalentes da matriz do biofilme.

A espermidina restaura parcialmente biofilmes NTHI pré-formados depletados de cátions

[0335] Para determinar se a espermidina pode restaurar biofilmes depletados de cátions, o crescimento de NTHI foi iniciado e mantido na presença de 0 (controle de sBHI) ou 1% de fosfocelulose P11 (p/v) por 24 horas com adição exógena de espermidina (0-5 mM) por 16h. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Como mostrado na **FIG**. **21**, a espermidina pode compensar parcialmente o efeito negativo da

fosfocelulose *in vitro.* Estes dados sugerem que a fosfocelulose P11 depleta as poliaminas da matriz do biofilme.

Os efeitos de depleção de cátions da fosfocelulose P11 não requerem contato direto com o biofilme

[0336] Para determinar se a diminuição na formação de biofilme era dependente do contato celular direto, o crescimento de NTHI foi iniciado na câmara basal de um sistema de placa transwell que continha um tamanho de poro de 0,4 µm dentro da membrana que separa as câmaras apical e basolateral. Isso permite a difusão de pequenas moléculas, por exemplo, proteínas (DNABII), poliaminas e cátions de metal divalente entre as duas câmaras, mas não de células bacterianas. A câmara apical continha 0 (controle de sBHI), 0,5, 1 ou 1,5% (p/v) de fosfocelulose P11 na semeadura e mantida por 16 horas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Conforme indicado na **FIG**. **22**, a diminuição dependente da dose na espessura média do biofilme e na biomassa é independente do contato direto com a resina de troca catiônica.

A adição exógena de espermidina compensa os efeitos de depleção de cátions da fosfocelulose P11 no sistema transwell

[0337] Para determinar se as poliaminas (espermidina) são esgotadas pela fosfocelulose P11 sem contato direto no sistema transwell, o crescimento de NTHi foi iniciado na câmara basolateral contendo 0, 100, 500 ou 1000 µM de espermidina, enquanto 0 (controle de sBHI) ou 1,5% de (p/v) fosfocelulose P11 foi adicionado à câmara apical e mantido durante 16 horas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Conforme indicado na **FIG**. **23**, a espermidina sozinha pode restaurar biofilmes

depletados de cátions de uma maneira dependente da dose.

A espermidina e o DNABII agem sinergicamente para restaurar biofilmes depletados de cátions de fosfocelulose P11 mediada sem contato

[0338] Biofilmes depletados de cátions de fosfocelulose P11 podem ser restaurados pela adição exógena de HU (**FIG**. **20**) e espermidina (**FIG**. **22 e FIG**. **24)**de uma maneira dependente da dose. Como mostrado na **FIG**. **17A**, a imunofluorescência CSLM indica que a espermidina e o DNABII (HU) também colocalizam nos biofilmes formados por múltiplas espécies bacterianas patogênicas. Desse modo, os Requerentes queriam determinar se HU e espermidina agem sinergicamente *in vitro.* O crescimento de NTHi foi iniciado na câmara basolateral do sistema transwell contendo 100 μM de espermidina ou 500 nM de HU, ou uma combinação de ambos os componentes. Enquanto, 0 ou 1,5% de fosfocelulose P11 foi adicionado à câmara apical e mantido por 16 horas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. Conforme indicado na **FIG**. **25**, a combinação de concentrações ideais de espermidina e HU restaura biofilmes depletados de cátions de maneira sinérgica, em comparação com o biofilme de controle de sBHI.

Superfícies abióticas revestidas com resina de troca catiônica evitam a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose

[0339] Lâminas de câmara de vidro foram revestidas com soluções de 0, 0,1, 1 ou 5% de fosfocelulose P11 e 5% de heparina sepharose (p/v). O crescimento de NTHI foi iniciado e mantido por 40 horas em lâminas revestidas. Os biofilmes foram lavados com solução salina e corados com LIVE/DEAD®, visualizados com CSLM e analisados pelo COMSTAT para determinação da espessura média e biomassa. **FIG**. **26** indica que tanto a fosfocelulose P11 quanto a heparina sepharose evitam a formação de

biofilme de uma maneira dependente da dose. Esses dados sugerem que o revestimento de superfícies com resina de troca catiônica pode prevenir a fixação bacteriana e a subsequente formação de biofilme *in vitro*.

Experimento N.º 3

[0340] Biofilmes consistem em comunidades de micro-organismos exclusivamente de bactérias, exclusivamente de leveduras ou ambos. Para patógenos bacterianos, os antibióticos são a primeira linha de tratamento. Bactérias residentes em um biofilme contribuem significativamente para a patogênese de aproximadamente 80% de todas as infecções bacterianas e é conhecido por contribuir para a natureza crônica e recorrente de doenças infecciosas. Além disso, as bactérias residentes em um biofilme são até 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos do que suas contrapartes de vida livre. Essa resistência se deve principalmente a uma matriz extracelular que protege os micro-organismos residentes de um ambiente hostil. A natureza crônica e recorrente das infecções bacterianas mediadas por biofilme exige o uso excessivo de antibióticos que, por sua vez, levou ao surgimento global de múltiplas bactérias resistentes a antibióticos. Este fenótipo crescente de resistência aos antibióticos resulta em falha da terapia antibiótica. Além disso, o principal efeito colateral dos antibióticos é que eles afetam negativamente a microbiota comensal, o que pode deixar o hospedeiro com vários efeitos colaterais, bem como suscetibilidade a infecções secundárias. Anteriormente, os Requerentes identificaram o DNA e a família de proteínas DNABII como alvos universais em todas as matrizes de biofilme bacteriano estudadas até o momento. Os Requerentes mostraram que as proteínas DNABII podem ser removidas com anticorpos terapêuticos, resultando no colapso estrutural do biofilme e liberação da bactéria residente. Em contraste, os biofilmes de levedura não expressam proteínas DNABII, mas ainda contêm DNA extracelular (eDNA), que também faz parte de sua matriz. Esta nova abordagem é uma

melhoria em relação às tecnologias terapêuticas atuais, na medida em que não depende de compostos com atividades bactericidas, que aplicam pressão sobre as bactérias para desenvolver mecanismos de resistência, mas visa a própria estrutura da matriz extracelular do biofilme, resultando assim na ruptura do biofilme e liberação de bactérias residentes em um estado vulnerável e acessível. Todos os biofilmes, independentemente das bactérias ou leveduras constituintes, criam estruturas dependentes de DNA, mas em vez dessas estruturas existentes como B-DNA (a forma canônica que predomina intracelularmente), o eDNA estrutural mais importante presente em uma matriz de biofilme existe como Z-DNA. É importante ressaltar que o Z-DNA é mais rígido, tornando-o um melhor material estrutural, e o Z-DNA é completamente resistente a nucleases, enzimas que degradam o B-DNA. Portanto, o alvo de quaisquer terapias potenciais é um elemento estrutural da matriz do biofilme não reconhecido anteriormente que, quando alterado (isto é, feito a transição de volta para B-DNA) ou interrompido, potencializaria a eficácia das terapias atuais. É importante notar que as proteínas que se ligam ao Z-DNA também estabilizam o Z-DNA. Visto que o Z-DNA é um constituinte natural dos biofilmes, os anticorpos que se ligam ao Z-DNA irão facilitar o crescimento do biofilme. Por outro lado, as moléculas que se ligam ao DNA B estabilizam o DNA B e impedem a conversão de B-DNA em Z-DNA e, portanto, evitam os biofilmes. É importante ressaltar que os estados de doença que induzem naturalmente a formação de anticorpos dirigidos contra Z-DNA irão facilitar a formação de biofilme, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF). Assim, as infecções crônicas que se desenvolvem em pacientes com SLE são, em parte, o resultado dos anticorpos Z-DNA derivados de SLE. Além disso, alguns agentes quimioterápicos que danificam o DNA, por exemplo, quimioterapias à base de platina, também mudam o DNA para a forma Z. Portanto, esses agentes contribuem para estabilizar ou facilitar o crescimento do biofilme. Direcionar a terapêutica que interrompe o Z-DNA é uma nova

abordagem terapêutica para SLE e/ou fibrose cística (CF) e exacerbações quimioterápicas de infecções crônicas.

[0341] Biofilmes são uma coleção de micro-organismos agregados ou aderidos a uma superfície que exibe a arquitetura e o comportamento da comunidade (sinalização intracomunitária, transporte, divisão de trabalho, etc.). Essa arquitetura de comunidade é em parte diferenciada por uma matriz extracelular autofabricada que protege os micro-organismos residentes contra condições perigosas, que em um hospedeiro inclui o sistema imunológico e os antimicrobianos. Os biofilmes são responsáveis por uma parte significativa de doenças, tanto em animais como em plantas, bem como industrialmente, por exemplo, em incrustação de equipamentos industriais e, como tal, são o foco de intensos esforços de pesquisa devido à sua importância em ambientes médicos, agrícolas e industriais . Visick *et al.* (2016) J Bacteriol. 198(19):2553-63; Hoiby *et al.* (2017) APMIS. 125(4):272-5. A erradicação ou o tratamento de biofilmes patogênicos é particularmente difícil de realizar devido a vários fatores, incluindo a produção da matriz extracelular protetora. Hoiby *et al.* (2017) APMIS. 125(4):272-5. A matriz do biofilme é variavelmente composta de polissacarídeos, proteínas e, DNA extracelular (eDNA). O eDNA de biofilmes bacterianos é universal e essencial para a estabilidade e funções de proteção da matriz extracelular. Okshevsky *et al.* (2015) Crit Rev Microbiol. 41(3):341-52; Wilton *et al.* (2015) Antimicrob Agents Chemother. 60(1):544-53. O enfraquecimento da estrutura do eDNA do biofilme, por meio da degradação do DNA ou da remoção das proteínas de ligação ao DNA que estabilizam a estrutura, resulta no colapso catastrófico do biofilme e na liberação da bactéria residente em um estado mais vulnerável. Brandstetter *et al.* (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123(11):2626-32; Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Freire *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74; Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny *et al.*

(2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny *et al.* (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Baelo *et al.* (2015) J Control Release. 209:150-8; Brown *et al.* (2015) Front Microbiol. 6:699; Frederiksen *et al.* (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4; Martins *et al.* (2012) Mycoses. 55(1):80-5; Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37.

[0342] Com base no papel central do eDNA na integridade do biofilme, o tratamento com nuclease carrega um potencial terapêutico óbvio. Na verdade, muitas bactérias utilizam nucleases secretadas endógenas para modular a estrutura do biofilme e mediar a dispersão dos biofilmes. Cho *et al.* (2015) Infect Immun. 83(3):950-7; Kiedrowski *et al.* (2011) PLoS One. 6(11):e26714; Liu *et al.* (2017) Front Cell Infect Microbiol. 7:97; Steichen *et al.* (2011) Infect Immun. 79(4):1504-11. No entanto, as nucleases exógenas normalmente mostram apenas atividade eficaz de prevenção de biofilme quando administradas no momento do início da formação de biofilme, com biofilmes estabelecidos exigindo altas concentrações de nuclease para observar qualquer ruptura modesta do biofilme. Hall-Stoodley *et al.* (2008) BMC Microbiol. 8:173; Izano *et al.* (2009) Microb Pathog. 46(4):207-13; Kaplan *et al.* (2012) J Antibiot (Tokyo). 65(2):73-7; Tetz *et al.* (2010) DNA Cell Biol. 29(8):399-405. Em pacientes com fibrose cística, onde as infecções pulmonares crônicas são a principal fonte de morbidade e mortalidade, as nucleases terapêuticas são usadas principalmente como agentes mucolíticos direcionados para obstruções criadas por eDNA derivado do hospedeiro, em vez do eDNA produzido por bactérias para formar uma comunidade de biofilme, e estes nucleases (ou seja, Pulmozyme) só foram observadas para alterar as comunidades microbianas quando administradas muito cedo na vida antes do estabelecimento de infecções crônicas. Frederiksen *et al.* (2006) Acta Paediatr. 95(9):1070-4. Por que o eDNA do biofilme bacteriano se torna resistente à degradação da nuclease permanece uma questão em aberto.

[0343] Existem várias hipóteses de por que o eDNA do biofilme bacteriano é insuficientemente degradado por nucleases exógenas. Entre essas hipóteses está a possibilidade de que as bactérias alterem ativamente a estrutura do eDNA para uma forma insensível a nucleases. Um desses elementos estruturais de DNA que é resistente à nuclease é o Z-DNA, uma forma helicoidal para a esquerda alternativa. O Z-DNA só foi descrito sob condições específicas *in vitro* e condições intracelulares limitadas *in vivo*, embora haja evidências para um papel do Z-DNA na fisiologia celular normal, particularmente com a identificação de proteínas de ligação ao Z-DNA que regulam vários processos intracelulares. Wang *et al.* (2007) Front Biosci. 12:4424-38; Barraud *et al.* (2012) Curr Top Microbiol Immunol. 353:35-60. A fim de deslocar o equilíbrio do B-DNA canônico para a forma Z-DNA, fatores adicionais são necessários (Choi *et al.* (2011) Chem Soc Rev. 40(12):5893-909; Yang, *et al.* (2012) Curr Med Chem. 2012; 19(4):557-68), incluindo superenrolamento negativo da dupla hélice, altas concentrações catiônicas para neutralizar a repulsão da estrutura fosfato-desoxirribose carregada negativamente e interações da proteína de ligação Z-DNA para estabilizar a estrutura. Cátions metálicos e poliaminas policatiônicas são ambos capazes de induzir a formação de Z-DNA (D'Agostino *et al.* (2006) IUBMB Life. 58(2):75-82; Balasundaram *et al.* (1991) Mol Cell Biochem. 100(2):129-40), particularmente em tratos poli (dG-dC). Thomas *et al.* (1991) J Biol Chem. 266(10):6137-41. Por outro lado, a transição de Z-DNA de volta para B-DNA é catalisada por agentes intercalantes (Kim *et al.* (1993) Biopolymers. 33(11):1677-86; Mirau *et al.* (1983) Nucleic Acids Res. 11(6):1931-41) e, potencialmente, a proteína da cromatina eucariótica, HMGB1. Waga *et al.* (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153(1):334-9.

[0344] A matriz do biofilme é estabilizada por proteínas da cromatina bacteriana da família DNABII. Essas proteínas ocupam estruturas dobradas de DNA no andaime de eDNA, e sua remoção resulta no colapso

do biofilme e na liberação de bactérias residentes. Brandstetter *et al.* (2013) Nasopore. Laryngoscope. 123(11):2626-32; Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35; Freire *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(1):74-88; Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Novotny *et al.* (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny *et al.* (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Rocco *et al.* (2017) Mol Oral Microbiol. 32(2):118-30; Novotny *et al.* (2013) PLoS One. 8(6):e67629; Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37. Adicionalmente, foi observado que poliaminas modulam a estrutura do DNA (Pasini *et al.* (2014) Amino Acids. 46(3):595-603) e o protege de agentes de modificação externos. Baeza *et al.* (1991) Orig Life Evol Biosph. 21(4):225-42; D'Agostino *et al.* (2005) FEBS J. 272(15):3777-87; Nayvelt *et al.* (2010) Biomacromolecules. 11(1):97-105. Aqui, os Requerentes mostram que as poliaminas extracelulares em colaboração com as proteínas DNABII induzem a estrutura do Z-DNA no eDNA dentro dos biofilmes bacterianos e estabelecem se a reversão do Z-DNA para o B-DNA prejudicaria a estrutura do biofilme bacteriano para torná-lo suscetível à terapêutica convencional ou, em e por si mesmo, rompe biofilmes.

Biofilmes bacterianos tornam-se resistentes à interrupção da nuclease conforme o Z-DNA se acumula

[0345] Haemophilus influenzae *não tipificável* (NTHi) é uma causa comum de infecções agudas e crônicas do trato respiratório, e a doença causada por este organismo depende da formação de biofilme para sua cronicidade. Duell *et al.* (2016) FEBS Lett. 590(21):3840-53. Da mesma forma, *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) é o principal agente etiológico de infecções do trato urinário e também depende da produção de biofilme para sua capacidade de causar cistite crônica. Blango *et al.* (2010) Antimicrob Agents Chemother. 54(5):1855-63. Biofilmes NTHi e UPEC cultivados *in vitro* na ausência ou presença de nucleases

mostraram comprometimento significativo para a biogênese do biofilme quando nucleases estavam presentes (**FIG**. **27**). Em contraste, o tratamento de biofilmes pré-estabelecidos com essas nucleases não diminuiu a espessura do biofilme ou biomassa, indicando que a resistência do eDNA na matriz do biofilme às nucleases é estabelecida à medida que o biofilme amadurece.

[0346] Os Requerentes usaram um anticorpo direcionado contra Z-DNA para sondar biofilmes NTHi e UPEC *in vitro* conforme eles se desenvolviam. A coloração do anticorpo e a microscopia de imunofluorescência revelaram que o Z-DNA se acumula na base da matriz do biofilme conforme o biofilme amadurece (**FIG**. **28**), correspondendo ao aumento da resistência à nuclease em biofilmes maduros. O principal patógeno fúngico *Candida albicans* também apresentou Z-DNA em sua matriz extracelular de biofilme (**FIG**. **29**). Além disso, o acúmulo de Z-DNA é central para o processo de construção de biofilme, pois o tratamento de biofilmes nascentes com anticorpos que se ligam especificamente (e, portanto, estabilizam) a biogênese de biofilme NTHi estimulada por Z-DNA, enquanto os anticorpos direcionados para B-DNA não (**FIG**. **30**). O Z-DNA provavelmente confere resistência à degradação da nuclease à matriz extracelular do biofilme, o que é demonstrado pelo exame do conteúdo e das formas de eDNA do DNA presente em biofilmes tratados com nucleases. O tratamento com nuclease reduz grandemente a visualização de B-DNA na matriz extracelular do biofilme NTHi, enquanto a presença de Z-DNA se torna mais aparente (**FIG**. **31**).

Poliaminas e proteínas DNABII cooperam para estabilizar estruturas Z-DNA na matriz de biofilme

[0347] Um substrato de oligonucleotídeo composto de poli (dG-dC) é conhecido por ser propenso a formar Z-DNA (ou seja, devido a altas concentrações de NaCl ou presença de poliaminas) e, como tal, é

protegido da degradação por nucleases (**FIG**. **32**) . Consequentemente, os Requerentes também observaram que as poliaminas induzem a formação de Z-DNA deste substrato por meio de medição espectrofotométrica da razão de absorbância $\lambda_{295}/\lambda_{260}$ (dados não mostrados). Além da estabilização de eDNA mediada por poliamina, os Requerentes já demonstraram a importância das proteínas da cromatina bacteriana DNABII no reforço da estrutura do biofilme. Agora, os Requerentes procuraram determinar se as poliaminas e as proteínas DNABII funcionam juntas para estabilizar o andaime de eDNA. Usando um anticorpo direcionado a duas poliaminas relacionadas, espermidina e espermina, e anticorpos que reconhecem as duas proteínas da família DNABII, IHF e HU, os Requerentes primeiro visualizaram a distribuição de poliaminas e proteínas DNABII na matriz de biofilme por microscopia de imunofluorescência. Os Requerentes descobriram que as proteínas DNABII (principalmente HU) colocalizadas com poliaminas dentro da matriz extracelular do biofilme NTHi (**FIG**. **33**). Além disso, a microscopia de imunofluorescência de biofilmes formados por uma cepa NTHi projetada para ser incapaz de expressar HU e sondada com o anticorpo específico de poliamina demonstrou que HU é necessária para distribuição normal de poliamina no biofilme (**FIG**. **33**).

[0348] Uma vez que as proteínas NTHi DNABII desempenham um papel central na integridade da matriz do biofilme. Brockson *et al.* (2014) Mol Microbiol. 93(6):1246-58; Novotny *et al.* (2017) Clin Vaccine Immunol. 24(6); Novotny *et al.* (2016) EBioMedicine. 10:33-44; Goodman *et al.* (2011) Mucosal Immunol. 4(6):625-37, os Requerentes postularam que podem contribuir para a resistência à nuclease de DNA. Na verdade, NTHi HU foi capaz de conferir resistência à nuclease a um substrato poli (dG-dC) *in vitro* e de mudar um substrato poli (dGdC) para a forma Z-DNA (**FIG**. **34**) Jang *et al.* (2015) Sci Rep. 5:9943. Devido à observação da colocalização de NTHi HU e poliaminas na matriz do biofilme, os Requerentes testaram se eles exibiam sinergia em sua capacidade de

inibir a degradação da nuclease. Em concentrações de poliaminas e HU que não protegeram o substrato poli (dG-dC) por conta própria, a combinação dos dois demonstrou capacidade sinérgica para conferir resistência à nuclease (**FIG**. **35**). A colocalização de poliaminas e proteínas DNABII e, portanto, o fenótipo resistente à nuclease resultante, também foi observada em biofilmes formados *in vivo* no ouvido médio durante otite média experimental devido a NTHI (**FIG**. **35**). Além disso, os níveis de incorporação de DNABII e poliamina na matriz extracelular do biofilme variam entre as espécies e estão correlacionados com o nível de detecção de Z-DNA por imunofluorescência (**FIG**. **36**). Juntos, esses resultados sugerem que as proteínas DNABII bacterianas e as poliaminas endógenas interagem para manter a matriz do biofilme bacteriano, potencialmente por meio da conversão e estabilização dos elementos estruturais do Z-DNA dentro do andaime eDNA dos biofilmes.

A reversão de Z-DNA para B-DNA restaura a sensibilidade da nuclease

[0349] A fim de tirar proveito das novas descobertas dos Requerentes de que o Z-DNA se acumula ao longo do tempo em biofilmes bacterianos e que isso pode explicar por que os biofilmes maduros são resistentes à interrupção da nuclease, os Requerentes procuraram testar se as moléculas são capazes de alterar o equilíbrio do Z-DNA para B-DNA pode modular biofilmes. Foi relatado que a proteína de cromatina eucariótica HMGB1 converte Z-DNA em B-DNA Waga *et al.* (1988) Biochem Biophys Res Commun. 153(1):334-9. Como tal, a microscopia de imunofluorescência de biofilmes NTHi tratados com HMGB1 revelou teor diminuído de Z-DNA (**FIG**. **37**). As proteínas DNABII foram liberadas do biofilme por tratamento com HMGB1 (**FIG**. **38**), desestabilizando a estrutura do eDNA, permitindo que o Z-DNA revertesse para B-DNA na ausência de estabilização do Z-DNA mediada por DNABII e resultando em interrupção significativa do biofilme. Consequentemente, o tratamento de otite média aguda induzida por NTHI na orelha média de chinchila com

HMGB1 ou uma variante não inflamatória de HMGB1 resultou na resolução eficiente de biofilmes aderentes (**FIG**. **39**). HMGB1 também foi eficaz em interromper biofilmes formados *in vitro* por *Burkholderia cenocepacia*, um patógeno oportunista mortal associado a infecções de biofilme pulmonar de fibrose cística, enquanto a administração profilática de HMGB1 evitou a formação de biofilme agregado de *B. cenocepacia* nos pulmões de camundongos (**FIG**. **40**). A adição de HMGB1 ao substrato poli (dG-dC) na presença de concentrações protetoras de poliaminas restaurou a sensibilidade à nuclease (**FIG**. **41**).

[0350] Esses dados combinados demonstram que a conversão de uma parte do DNA em conformação Z por poliaminas e proteínas DNABII não só cria a base para o material estrutural na matriz extracelular de biofilmes, mas explica sua resistência a nucleases convencionais para interromper biofilmes maduros. Cho *et al.* (2015) Infect Immun. 83(3):950-7. Juntos, esses dados indicam, portanto, que métodos e substâncias que podem converter Z-DNA em B-DNA ou eDNA de biofilme na configuração Z-DNA em B-DNA (por exemplo, removendo ou inibindo proteínas ou poliaminas DNABII) podem restaurar a sensibilidade à nuclease, potencialmente permitindo o desenvolvimento de agentes que podem potencializar a atividade de nucleases contra biofilmes recalcitrantes maduros *in vivo*. Isso também mostra que os biofilmes microbianos podem ser identificados por seu teor de Z-DNA, tornando a quantificação de Z-DNA um biomarcador potencialmente útil para o diagnóstico de infecção por biofilme.

Experimento N.º 4

[0351] Este experimento fornece um modelo porcino para testes pré-clínicos de drogas, agentes e métodos para tratar a fibrose cística. Veja Stoltz *et al.* (2010) Science Translational Medicine 2(29):29-31. A fibrose cística é uma doença autossômica recessiva devido a mutações em um gene que codifica o canal aniônico regulador da condutância

transmembranar de CF (denominado CFTR). Neste modelo, porcos que foram criados especificamente para transportar um defeito nos genes chamados "CFTR" e chamados porcos com CF desenvolvem espontaneamente características marcantes da doença pulmonar de CF que inclui infecção das vias aéreas inferiores por várias espécies bacterianas. Os porcos são imunizados com os agentes, tais como polipeptídeos ou outros agentes imunogênicos, induzindo assim a formação de anticorpos que irão erradicar os biofilmes bacterianos dos pulmões. Este experimento é semelhante à distribuição de anticorpos para IHF para erradicar biofilmes residentes nas orelhas médias de chinchilas após a imunização ativa, conforme mostrado no Experimento N.º 1. Os anticorpos anti-IHF (ou outro agente) podem ser administrados aos pulmões desses porcos por nebulização para avaliar a melhora dos sinais de doença e patologias associadas.

Experimento N.º 5

Identificar genes de síntese de poliamina UPEC que contribuem para a formação de TEDS.

[0352] Usando a coleção *E. coli* Keio de mutantes únicos, Baba *et al.* (2006) Mol Syst Biol. 2:2006 0008, as mutações são movidas pela transdução de fago P1 de genes de *speA* (arginina descarboxilase necessária para converter arginina no precursor de putrescina, agmatina), *speC* (ornitina descarboxilase necessária para converter ornitina em putrescina), *speD* (adenosilmetionina descarboxilase necessária para converter S-adenosilmetionina no doador de propilamina para a atividade SpeE), e *speE*(aminopropiltransferase necessária para converter putrescina em espermidina e espermidina em espermina), Tabor *et al.* (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99, na cepa UPEC UTI89, primeiro isoladamente, depois em combinação. Devido a várias vias capazes de produzir poliaminas, essas mutações podem ser combinadas para observar fenótipos de biofilme (por exemplo, SpeA e SpeD são as

enzimas iniciais em duas vias separadas de biossíntese de putrescina; uma mutação dupla em *speA* e *speD* é necessária para anular a síntese de putrescina). As mutações são confirmadas por PCR para inserção na localização cromossômica correta. A cepa UPEC é estabelecida no ensaio de andaime de eDNA *in vitro* dos Requerentes e no ensaio de formação de biofilme em tempos definidos (8, 24, 48 h) e na presença ou ausência de uma poliamina adicionada (espermidina, espermina ou putrescina) em concentrações fisiológicas (0, 0,1, 0,5, 1 e 5 mM). Tabor *et al.* (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99. Esses ensaios são realizados em um meio rico (LB) e um meio quimicamente definido (CDM; M9), pois há provavelmente poliaminas residuais em meio rico. A estrutura inicial do eDNA é avaliada por microscopia de imunofluorescência com sondagem para dsDNA, proteínas DNABII e poliaminas (anti-espermidina, anti-putrescina, anti-cadaverina) e a complexidade das estruturas é quantificada pelo plugin de análise FracLac no ImageJ. Karperien *et al.* (1999-2013) FracLac for ImageJ. A formação de biofilme é avaliada por CLSM de biofilmes corados LIVE/DEAD® e a espessura média, biomassa e rugosidade do biofilme são quantificados por análise COMSTAT. Estrutura de eDNA em biofilmes sondados para dsDNA, proteínas DNABII e poliaminas são avaliadas por imunofluorescência CLSM. Anticorpos anti-HU direcionados contra um epítopo conservado são usados, permitindo o reconhecimento abrangente de HU em gêneros para detecção de DNABII, uma vez que todas as eubactérias têm HU, e a depleção de HU resulta universalmente em comprometimento do biofilme. **A FIG**. **46** mostra imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos naive ou anti-HU (cinza) e anti-espermidina (Spd, cinza claro), a colocalização é branca.

Identificar os genes de exportação de poliamina UPEC que contribuem para a formação dos TEDS

[0353] Usando a Coleção Keio, mutações de genes *potE* (antiportador

putrescina-ornitina), Kashiwagi *et al.* (1992) Proc Natl Acad Sci U S A. 89(10):4529-33, *cadB* (antiportador cadaverina-lisina), Soksawatmaekhin *et al.* (2004) Mol Microbiol. 51(5):1401-12, *mdtJ* and *mdtI* (exportador de múltiplas drogas que é importante para a exportação de espermidina), Higashi *et al.* (2008) J Bacteriol. 190(3):872-8, e *sapB*, *sapC*, *sapD*, e *sapF* (que codifica o transportador ABC que é importante para a exportação de putrescina) Sugiyama *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(51):26343-51 são movidas para UPEC UTI89, primeiro individualmente e depois em combinação (para superar a redundância das atividades de exportador). Mutações que apresentam fenótipos de biofilme deficientes podem ser combinadas. UPEC é estabelecido no andaime de eDNA dos Requerentes e ensaios de formação de biofilme em tempos definidos e na presença ou ausência de uma poliamina adicionada (espermidina, espermina, putrescina).

[0354] O papel das poliaminas no TEDS e no desenvolvimento do biofilme é determinado ao mostrar que as poliaminas funcionam em conjunto com o eDNA e as proteínas DNABII para criar o TEDS. **FIGS**. **42A - 42D** mostram que proteínas DNABII e poliaminas são necessárias para resgatar a prevenção de biofilme mediada por trocador de cátions (P11). Embora a **FIG**. **44** mostre que as proteínas DNABII, poliaminas e eDNA (B- e Z-DNA) se acumulam continuamente dentro do EPS de biofilmes NTHI ao longo do tempo. Além disso, como mostrado na **FIG**. **46**, DNABII, poliaminas, componentes Z-DNA e B-DNA estão todos presentes no EPS de múltiplos biofilmes bacterianos.

[0355] Os Requerentes também encontraram na **FIG**. **47A-B** que poliaminas, componentes Z-DNA e B-DNA estão todos presentes em seções da orelha média de chinchila infectada com biofilmes NTHI. Além disso, os Requerentes mostraram que a adição de RNase A estimulou a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose, provavelmente pela liberação de poliaminas, um catalisador crítico para

a conversão extracelular de B-DNA em Z-DNA (**FIG**. **52 A**) e que a adição de tRNA (mas não GMP) interrompeu biofilmes NTHI iniciais de uma maneira dependente da dose, provavelmente por sequestro de poliaminas do biofilme EPS (**FIG**. **52 B**).

Quantificar poliaminas em meio condicionado.

[0356] O meio condicionado é coletado de biofilmes bacterianos para determinar as concentrações de poliaminas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina). A liberação de poliamina é quantificada para 8 patógenos formadores de biofilme recalcitrantes, doravante referidos como as 8 cepas padrão; isolados clínicos dos patógenos ES*KAPE, NTHI e UPEC (*Indica o uso de *S. epidermidis* como um *Staphylococcus* patogênico representativo Sabate *et al.* (2017) Front Microbiol. 8:1401, dado que *S. aureus* produz a proteína A de ligação ao anticorpo que pode confundir os ensaios de imunofluorescência; quando tratável, esta análise é aplicada a *S. aureus*) e variantes mutantes que mostram estrutura EPS de biofilme alterada para correlacionar fenótipos de biofilme com concentrações extracelulares de poliamina. Os biofilmes são cultivados em meio rico e CDM, e os meios condicionados são coletados em vários momentos (0, 4, 8, 16 e 24 h). Meio condicionado livre de células (filtração) e amostras de meio são congelados em N_2 líquido para armazenamento. A análise é conduzida pelo OARDC Metabolite Analysis Cluster via LC-MS/MS. Hakkinen *et al.* (2013) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 941:81-9; Liu *et al.* (2013) Anal Chim Acta. 791:36-45; Xu *et al.* (2016) Molecules. 21(8).

Estabelecer o papel dos níveis de estado estacionário de poliaminas no TEDS.

[0357] Após determinar quais poliaminas estão presentes ao longo do desenvolvimento do biofilme *in vitro*, testes são conduzidos para distinguir se essas poliaminas afetam a estrutura do eDNA. Os

Requerentes identificaram uma série de nucleases que evitam a formação de biofilme (semelhante ou melhor do que Pulmozyme®) quando adicionado na semeadura, mas têm sensibilidades variáveis à espermidina (**Tabela 1**). Empregando a estrutura de eDNA e os ensaios de formação de biofilme ao longo do tempo, os Requerentes utilizam essas enzimas como sondas qualitativas para concentrações de poliamina e para distinguir entre a inibição da atividade de nuclease mediada por poliamina ou a inibição da atividade de nuclease mediada por estrutura de eDNA (ou seja, conversão para uma forma resistente à nuclease, como Z-DNA). Em cada caso, os biofilmes são cultivados por tempos específicos (0, 4, 8, 16 e 24 h) antes do tratamento com nucleases e incubados até um tempo final de 40 h. Como um controle para a atividade de nuclease no ambiente de biofilme, a atividade de nuclease contra um substrato de plasmídeo incubado em meio condicionado dos biofilmes (0, 4, 8, 16 e 24 h) é determinada, para a qual os Requerentes teriam determinado os constituintes de poliamina e as respectivas concentrações. A interrupção do biofilme para as **8 cepas padrão** são avaliadas e analisadas conforme descrito anteriormente. Na **FIG**. **35 A-D**, os Requerentes mostram que as proteínas DNABII sinergizam com poliaminas para induzir resistência à DNase.

Table 1. Nucleases that prevent biofilm formation and their spermidine sensitivities

Enzyme	XhoI	DNase*	PstI	SapI	T4 Pol	NucB	Bal31
Spd inhibition#	50μM	300μM	500μM	10mM	10mM	>10mM	>10mM

*Pulmozyme; #Spermidine was titrated from 10μM-10mM to determine the concentration where each nuclease was reduced to <10% activity on genomic DNA.

Testar a robustez das proporções dos níveis de estado estacionário de DNA, DNABII e poliaminas em biofilmes bacterianos.

[0358] Embora os Requerentes tenham mostrado que eDNA, proteínas DNABII e poliaminas são essenciais para manter os TEDS de biofilmes, as proporções de cada componente que interage para maximizar

produtivamente a formação de biofilme podem ser determinadas. Quando as bactérias formam biofilmes, um equilíbrio de bactérias planctônicas/biofilme é alcançado. Na verdade, os Requerentes mostraram anteriormente que as proteínas DNABII são limitativas para biofilmes UPEC (Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35), e que concentrações crescentes de proteínas DNABII conduzem as bactérias planctônicas para o estado de biofilme de uma maneira dependente da dose. Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35. UPEC que é deficiente em HU produz um biofilme menor, mas é mais responsivo ao DNABII exógeno ao conduzir bactérias planctônicas para o estado de biofilme. Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35. Ao mesmo tempo, os biofilmes UPEC que estão esgotados de eDNA (com DNase) não aumentam mais a biomassa do biofilme após a adição de DNABII exógeno. Em contraste, qualquer tentativa de adicionar proteínas DNABII exógenas ou DNA impacta negativamente os biofilmes NTHI (dados não mostrados). Os Requerentes levantam a hipótese de que quando a EPS do biofilme é deficiente em DNA, proteína DNABII e poliaminas, de modo que esses 3 componentes estão presentes de forma subideal em relação um ao outro, as bactérias são preferencialmente particionadas no estado planctônico. Da mesma forma, semelhante ao UPEC, a suplementação do(s) componente(s) limitativo(s) em sua proporção ideal deve melhorar a partição das bactérias no estado de biofilme. Em contraste, quando todos os três componentes estão em proporções adequadas, como os Requerentes acreditam no NTHI, a suplementação de qualquer um desses componentes pode interromper a proporção adequada e ter um impacto negativo na formação de biofilme. Aqui, a proteína DNABII exógena para biofilmes UPEC nativos é titulada e a proporção de biofilme e bactérias planctônicas é medida. Uma vez que os biofilmes estão saturados com proteínas DNABII exógenas, as poliaminas e o DNA cromossômico são variados para dividir ainda mais as bactérias no estado de biofilme.

[0359] Cada uma das poliaminas predominantes (ou combinações das

mesmas) identificadas são testadas e por concentrações variáveis até 10 vezes menor e maior a partir das concentrações medidas no ambiente extracelular quando biofilmes são cultivados em CDM. Os Requerentes levantam a hipótese de que, se DNA, poliaminas e proteínas DNABII forem adicionadas em suas proporções adequadas, isso levaria as bactérias planctônicas aos biofilmes. Portanto, WT UPEC e NTHI e suas cepas isogênicas deficientes em HU (apesar da presença restante de IHF, as cepas deficientes em HU ainda têm um fenótipo deficiente em biofilme) também são testadas para a proporção ideal de HU, DNA e poliaminas. Os efeitos das adições combinatórias de componentes de biofilme por meio do ensaio de formação de biofilme *in vitro* são avaliados por meio da determinação da proporção relativa de bactérias presentes na fase planctônica versus a fase de biofilme por diluição em placas. Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35. Os Requerentes mostram na **FIG**. **42A-D** que a adição de P11 evita a formação de biofilme de uma maneira dependente da dose. Espermidina exógena e HU *juntos* restauram o desenvolvimento do biofilme, mas não sozinhos, o que sugere que a atividade antibiofilme de P11 é o resultado da titulação de componentes estruturais (poliaminas, proteínas DNABII) longe do biofilme EPS sem contato direto.

Determinar se existem poliaminas preferidas no TEDS

[0360] Como mostrado acima, biofilmes em uma câmara fisicamente separada podem ser interrompidos pelo trocador de cátions P11. É importante ressaltar que tanto as poliaminas quanto as proteínas DNABII devem ser adicionadas de volta à câmara de biofilme para neutralizar essa ruptura, enquanto cada componente por si só é ineficaz. Como a espermina e a espermidina modulam a estrutura do DNA de maneira mais eficaz do que a putrescina ou a cadaverina (Kabir *et al.* (2013) PLoS One. 8(7):e70510), as poliaminas isoladamente e em combinação são testadas em várias concentrações conforme descrito acima para

determinar se poliaminas específicas são necessárias para facilitar a produção de TEDS. HU é adicionado em concentrações definidas (como descrito acima, bem como 5 vezes inferior e superior) ao longo desta experiência. Este experimento é realizado com as 8 cepas padrão conforme descrito acima, quantificando os efeitos das várias poliaminas na formação de biofilme usando o ensaio de biofilme *in vitro* descrito acima.

Resultados e alternativas

[0361] Uma abordagem genética pode ser aplicada para estudar a formação de TEDS, examinando a contribuição das deficiências na síntese de poliamina UPEC e genes de exportação nos níveis de estado estacionário de poliaminas extracelulares. As mutações simples e combinações que produzem fenótipos de biofilme deficientes são identificadas e complementadas com poliaminas exógenas. A escolha de UPEC como sistema modelo é baseada em sua importância clínica (Subashchandrabose *et al.* (2015) Microbiol Spectr. 3(4)), a caracterização publicada do EPS dependente de eDNA-DNABII (Devaraj *et al.* (2015) Mol Microbiol. 96(6):1119-35), e o extenso conhecimento publicado das vias da poliamina de *E. coli* (Tabor *et al.* (1985) Microbiol Rev. 49(1):81-99), embora sem exame de um fenótipo de biofilme (análises genéticas menos abrangentes de fenótipos de biofilme em outras bactérias amplamente focadas em papéis intracelulares de poliaminas). Di Martino *et al.* (2013) Int J Med Microbiol. 303(8):484-91; Karatan *et al.* (2013) Biotechnol Lett. 35(11):1715-7. Quais poliaminas estão presentes e em quais combinações durante o desenvolvimento do biofilme, bem como patógenos formadores de biofilme clinicamente importantes, são determinadas. As poliaminas que contribuem *naturalmente* para o desenvolvimento do biofilme são reveladas. É determinado se as poliaminas constituintes estão simplesmente se ligando ou se ligando e alterando a estrutura do eDNA usando nucleases que evitam a formação

de biofilme, mas são inibidas em vários graus por poliaminas. Se as poliaminas não estiverem afetando a estrutura do DNA, então haveria uma hierarquia de interrupção do biofilme relacionada às sensibilidades dessas nucleases (**Tabela 1**) às poliaminas à medida que as poliaminas se acumulam com o tempo. Se uma nova estrutura de DNA resistente à nuclease for formada, haverá uma idade de maturidade do biofilme, onde nenhuma nuclease funciona, apesar das concentrações permissivas de poliaminas. A expressão de genes de biossíntese por qRT-PCR e de níveis de estado estacionário de poliaminas e proteínas DNABII por análise Western de biofilmes não tratados e aqueles que têm o fenótipo de biofilme mais forte (maior quantidade de bactérias particionadas no estado de biofilme) é examinada. Por último, as poliaminas endógenas são substituídas por combinações específicas de poliaminas para testar a robustez das poliaminas no TEDS para determinar se todas as poliaminas são igualmente eficazes no desenvolvimento de biofilme.

Determinar o papel do Z-DNA no desenvolvimento da estrutura tripartida dependente de eDNA.

[0362] À medida que os biofilmes amadurecem, o eDNA dentro do biofilme EPS torna-se resistente à DNase. O Z-DNA é conhecido por ser resistente à DNase e se acumula no TEDS conforme os biofilmes amadurecem.

[0363] Outros patógenos isoladamente, em biofilmes mistos definidos e em amostras humanas são examinados para determinar em que grau o Z-DNA é universal entre os biofilmes bacterianos.

Revelar a abundância de Z-DNA em biofilmes de espécies únicas e determinar se Z-DNA colocaliza com poliaminas e/ou proteínas DNABII

[0364] 11 patógenos formadores de biofilme são examinados {um padrão 8 e mais 3 [*M. catarrhalis* (copatógeno comum em OM), *Porphyromonas*

gingivalis (patógeno periodontal) e *Streptococcus gordonii* (patógeno oportunista oral)], que biofilmes de duas espécies abaixo podem ser usados e imunofluorescência usando um anticorpo anti-Z-DNA conforme cada biofilme envelhece (0, 4, 16, 24, 48 e 96 h) podem ser realizados. As amostras são sondadas com anticorpos específicos de Z-DNA e comparadas com um controle negativo de anticorpo naïve e um anticorpo específico de B-DNA para identificar rigorosamente a presença de Z-DNA. Experimentos paralelos são realizados com anti-poliamina enriquecido com IgG e antissoros anti-DNABII, e seus respectivos controles de IgG naïve, para determinar se todos os três componentes colocalizam dentro do biofilme EPS. Os biofilmes são contrastados com uma coloração de membrana bacteriana externa, como FM4-64, marcação de anticorpos detectados com anticorpos secundários altamente adsorvidos de uma fonte comum e imageados por CLSM. O grau de colocalização é quantificado usando o plugin de análise Coloc 2 no ImageJ. Para examinar se a prevalência de Z-DNA se correlaciona com a partição de bactérias para o estado de biofilme, a razão de bactérias planctônicas/biofilme é quantificada para cada espécie, conforme descrito neste documento.

Determinar a abundância de Z-DNA em biofilmes de espécies duplas e determinar se Z-DNA colocaliza com poliaminas e/ou proteínas DNABII

[0365] Biofilmes de espécies duplas são examinados para determinar como o teor, a distribuição e a interação de Z-DNA com poliaminas e proteínas DNABII muda com a idade do biofilme no contexto de um ambiente polimicrobiano. Combinações polimicrobianas que ocorrem em doenças e com as quais os Requerentes têm experiência *in vitro* incluem NTHI + *M. catarrhalis* (representante de biofilmes polimicrobianos de OM), *P. gingivalis* + *S. gordonii* (representante de biofilmes periodontais polimicrobianos) 29 e NTHI + *P. aeruginosa* (representante de CF polimicrobiana e biofilmes de OM supurativos crônicos). Culturas de

biofilme polimicrobiano são inoculadas conforme orientação da observação clínica; por exemplo, o biofilme NTHI é estabelecido antes da inoculação de *P. aeruginosa,* uma vez que *P. aeruginosa* é comumente um invasor secundário em locais de infecção por NTHI. Os biofilmes polimicrobianos resultantes são analisados quanto ao teor de Z-DNA, bem como quanto à presença de poliamina e proteína DNABII no biofilme EPS por imunofluorescência, conforme descrito anteriormente.

Estabelecer a extensão do Z-DNA em biofilmes de espécies duplas e se o Z-DNA se colocaliza com poliaminas e/ou proteínas DNABII quando um parceiro é incapaz de contribuir com eDNA, poliaminas e HU.

[0366] A cepa NTHI deficiente em HU forma um biofilme semelhante a uma esteira que é desprovido de poliaminas e eDNA. Esta cepa emparelhada com patógenos coinfectantes comuns, *P. aeruginosa* e *M. catarrhalis,* bem como WT NTHI (carregando um gene que expressa *gfp* para distingui-lo do mutante HU) são usadas para determinar se eDNA, HU e poliaminas de cada uma das bactérias WT pode complementar a deficiência no mutante NTHI, que inclui a formação de Z-DNA. A formação de biofilme é quantificada por CLSM como acima, e os componentes e estrutura de EPS são analisados por imunofluorescência CLSM. Na **FIG**. **46A**, imagens de imunofluorescência CLSM de biofilmes indicados sondados com anticorpos naive ou anti-HU (cinza) e anti-espermidina (Spd, cinza claro) são mostradas, a colocalização é indicada em branco.

Detecção de Z-DNA em amostras humanas.

[0367] Como os Requerentes fizeram anteriormente para proteínas e poliaminas DNABII (Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9; Idicula *et al.* (2016) Laryngoscope. 126(8):1946-51), Amostras clínicas de doenças associadas ao biofilme humano são examinadas, incluindo efusões recuperadas de crianças com OM (Idicula *et al.* (2016)

Laryngoscope. 126(8):1946-51), expectoração de CF (Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9), e aspirados de adultos com CRS e determinar por microscopia de imunofluorescência se Z-DNA está presente. Os candidatos têm acesso a amostras clínicas mistas de cada um dos itens acima mencionados, para as quais os candidatos têm dados microbiológicos correspondentes. As seções de cada uma (testando um número igual de amostras clínicas de origem masculina e feminina) são sondadas com anticorpos específicos de Z-DNA em concentrações variáveis enquanto compara a imunofluorescência com um controle de anticorpo naïve. Como a detecção de Z-DNA se relaciona espacialmente com poliaminas e proteínas DNABII por imunofluorescência, conforme descrito anteriormente, também é investigado. Na **FIG**. **46 A**, os Requerentes mostram imagens CLSM de imunofluorescência de biofilmes formados por 40 h das bactérias indicadas, sondadas com naive ou anti-B-DNA (cinza escuro) e anticorpos anti-Z-DNA (branco). Um anticorpo monoclonal específico de Z-DNA bem caracterizado (clone Z2258,59,78) foi usado para detectar Z-DNA. Os componentes DNABII, poliaminas, Z-DNA e B-DNA estão todos presentes no EPS de vários biofilmes bacterianos. Z-DNA é parte integrante do EPS de vários biofilmes bacterianos em diferentes níveis de estado estacionário.

Investigar a função do Z-DNA no desenvolvimento do TEDS.

[0368] Aqui os Requerentes determinam em que grau o Z-DNA desempenha um papel estrutural integral no TEDS.

Sondar o TEDS usando nucleases específicas para Z-DNA.

[0369] Com base na literatura e nos dados dos Requerentes, é provável que, enquanto o Z-DNA se acumula dentro de um biofilme envelhecido, o DNA da forma B substancial permanece (dados não mostrados), o que significa que as interfaces B-Z estão presentes em todo o biofilme. Rich e colegas de trabalho criaram uma nuclease específica de Z-DNA fundindo

o domínio de ligação Zα Z-DNA N-terminal da proteína de ligação Z-DNA humana ADAR1 ao domínio F_N catalítico C-terminal da endonuclease de restrição Tipo II FokI (Kim *et al.* (1997) Proc Natl Acad Sci U S A. 94(24):12875-9), onde o domínio de ligação Z-DNA posiciona a nuclease específica de B nas junções B-Z. Uma versão melhorada desta enzima é construída que exibe maior especificidade de Z-DNA por meio da fusão de domínio hADAR1 Za duplo (resíduos 133-209) (Zaa) e produzir, purificar com pureza > 95% e confirmar a atividade de clivagem de Z-DNA por digestão de uma inserção de Z-DNA em um plasmídeo superenrolado (conforme descrito em Shin *et al.* (2016) DNA Res.). Como uma abordagem complementar, a S1 nuclease, uma enzima que exibe hiperatividade nas junções B-Z, é usada. Kim *et al.* (1996) J Biol Chem. 271(16):9340-6. Se o Z-DNA é importante para manter a integridade estrutural do TEDS, o uso dessas nucleases deve interromper o biofilme. Uma vez que essas enzimas requerem Z-DNA para funcionar, elas podem ser uma sonda para Z-DNA ao longo do desenvolvimento do biofilme e servir como meio paralelo para medir a presença de Z-DNA (além da imunofluorescência). A capacidade das nucleases específicas da junção B-Z acima mencionadas de inibir a formação de biofilme ao longo do curso de desenvolvimento (0, 8, 16, 24, 48 e 96 h) é examinada, usando o ensaio de biofilme *in vitro* como descrito anteriormente. é determinado acima se a degradação dos tratos de Z-DNA resulta na partição alterada de biofilme e bactérias planctônicas. A atividade antibiofilme dessas nucleases contra as 8 cepas padrão, bem como qualquer espécie adicional para a qual os Requerentes observam uma prevalência relativa de detecção de Z-DNA, é avaliada.

Determinar se conduzir o DNA para a forma B afeta o TEDS

[0370] O equilíbrio entre B- e Z-DNA pode ser posteriormente conduzido para a forma B com a adição de agentes intercalantes (por exemplo, brometo de etídio, cloroquina, DAPI (Kwakye-Berko *et al.* (1990) Mol

Biochem Parasitol. 39(2):275-8; Shafer *et al.* (1984) Nucleic Acids Res. 12(11):4679-90; Kim *et al.* (1993) Biopolymers. 33(11):1677-86) ou moléculas de ligação ao DNA (por exemplo, netropsina, poliaminas ramificadas). Muramatsu *et al.* (2016) J Chem Phys. 145(23):235103; Zimmer *et al.* (1983) FEBS Lett. 154(1):156-60. Se o Z-DNA é a base para a integridade estrutural do TEDS, então esses agentes deveriam interromper os biofilmes. Para testar esta hipótese, os Requerentes usarão o ensaio de biofilme *in vitro* para avaliar se a adição de catalisadores Z-para-B-DNA impede a formação de biofilme, avaliando a inibição de biofilme por CLSM, mudanças na partição planctônica/biofilme por diluição em placas e mudanças no teor de Z-DNA por microscopia de imunofluorescência. A concentração inibitória mínima (MIC) para cada composto pode ser determinada por diluição da microplaca, então a dependência da dose de ruptura do biofilme e reversão de Z-DNA em concentrações sub-MIC pode ser determinada. Estas moléculas são testadas contra as 8 cepas padrão e as 3 moléculas com a melhor atividade antibiofilme são investigadas posteriormente com quaisquer espécies adicionais para as quais os Requerentes observem uma prevalência relativa de detecção de Z-DNA.

Determinar se conduzir o DNA para a forma Z afeta o TEDS

[0371] O equilíbrio entre B- e Z-DNA pode ser direcionado para Z-DNA, aumentando o nível de policátions (por exemplo, poliaminas) (Jovin *et al.* (1987) Ann Rev Phys Chem. 38:521-60), ao adicionar o domínio Zα recombinante exógeno derivado de um membro da família de proteínas do domínio Zα (proteínas ADAR, proteínas ZBP, proteínas E3 de poxvírus) que conduzem sequências de Z-DNA para Z-DNA (Athanasiadis *et al.* (2012) Semin Cell Dev Biol. 23(3):275-80), ou por metilação do C5 de citosinas em tratos alternados de purina-pirimidina (por exemplo, metiltransferases HhaI, M.SssI e M.CviPI)90. Embora a extensão da formação do biofilme possa não mudar, a cinética da formação do

biofilme e a estrutura geral provavelmente irão. O domínio Zaa recombinante de hADAR1, como descrito acima, apenas sem a fusão da nuclease FokI, é produzido e a atividade de ligação ao Z-DNA da proteína recombinante é confirmada por CD. O domínio Zaa (0, 0,5, 5 ou 50 μM) ou metiltransferase (por exemplo, HhaI em 0, 0,1, 1 ou 10 U/mL e S-adenosilmetionina) é adicionado na semeadura de biofilme e formação de biofilme em 4, 8, 16, 24, 48 e 96 h após a semeadura nas 8 cepas padrão e o NTHI deficiente em HU isogênico (um controle negativo que não contém eDNA significativo em seu biofilme) é avaliado com o ensaio de biofilme *in vitro* usando CLSM, mudanças na partição planctônica/biofilme por diluição em placas e acúmulo de Z-DNA observado por imunofluorescência.

[0372] *Determinar a capacidade do DNABII de se ligar especificamente ao Z-DNA.* Embora os Requerentes tenham mostrado que HU conduz DNA em Z-DNA, análises adicionais são realizadas para determinar se as proteínas DNABII, poliaminas e DNA agem sinergicamente para formar Z-DNA.

Determinar se IHF e HU se ligam ao DNA na presença de Z-DNA induzido por poliamina

[0373] Estudos extensos por Hud e colegas de trabalho (Sarkar *et al.* (2009) Biochemistry. 48(4):667-75; Sarkar *et al.* (2007) Nucleic Acids Res. 35(3):951-61) mostraram que tanto IHF quanto HU se ligam e mudam a estrutura do DNA em fibras grossas na presença de espermidina. É determinado se substratos de DNA definidos [DNA de junção de Holliday, duplexes de 35 bp que contêm a sequência de consenso de IHF (WATCAANNNNTTR onde W é A ou T, N é qualquer nucleotídeo e R é uma purina), uma versão embaralhada da mesma sequência, 35 bp (dGdC) que é propenso a conversão de Z-DNA e 35 bp (dAdT) que não é] na presença ou ausência de poliaminas (0, 0,1, 0,5, 1 e 5 mM dos seguintes: putrescina, espermidina, espermina, cadaverina, ou combinações

determinadas acima) formarão Z-DNA. A conversão de Z-DNA via medição de elipticidade por espectroscopia de CD antecipando a inversão característica em 250 e 280 nm é determinada primeiro. A ligação das proteínas DNABII a cada substrato avaliada por análise do sudoeste (EMSA seguida por análise de imunotransferência com anticorpos anti-Z-DNA e anti-DNABII) é então investigada. Goodman *et al.* (1989) Nature. 341(6239):251-4. Os substratos (0,2 nM) que têm conversão de Z-DNA confirmada por CD são incubados com proteína DNABII 25-500 nM em tampão HEPES 50 mM pH 7,0 durante 30 min à temperatura ambiente. As misturas de reação são resolvidas por eletroforese em um gel de poliacrilamida não desnaturante a 6%. O software ImageQuant é usado para quantificar as intensidades de banda. Constantes de dissociação de equilíbrio (K_d) são medidas. Hung, *et al.* (2011) J Bacteriol. 193(14):3642-52. Como os substratos de DNA são isotopicamente marcados, o meio condicionado livre de células de biofilmes como uma fonte de poliaminas e/ou proteínas DNABII (0, 0,05, 0,1, 0,2 e 0,5 v/v das misturas de reação subsequentes) das mesmas cepas bacterianas mencionadas acima também pode ser testado.

Determinar se IHF e HU se ligam ao Z-DNA

[0374] É determinado se IHF e HU se ligam ao Z-DNA diretamente. É realizado um EMSA com as proteínas DNABII e um substrato de DNA bromado de 35 pb (dGdC) que é um conformador de Z-DNA estável. Herbert *et al.* (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72. Este experimento estende descobertas anteriores uma vez que o substrato de DNA bromado não requer poliaminas para estabilizar o estado Z-DNA. O DNA do substrato é marcado e preparado por incubação com α^{32}P-dGTP, 5-bromo dCTP, dGTP e Klenow, conforme descrito. Herbert *et al.* (1993) Nucleic Acids Res. 21(11):2669-72. A proteína DNABII 25-500 nM é incubada com substrato de DNA marcado com 0,2 nM, e as misturas de reação são resolvidas por eletroforese em um gel de poliacrilamida não

desnaturante de 6%, intensidades de banda quantificadas por software ImageQuant e constantes de dissociação de equilíbrio (K_d) medidas.

Determinar a eficácia dos agentes que direcionam componentes e estruturas EPS na interrupção do biofilme bacteriano

[0375] Embora o eDNA e o DNABII sejam alvos conhecidos para a interrupção do biofilme, aqui os Requerentes se concentram em poliaminas e Z-DNA na presença ou ausência de antimicrobianos convencionais. Os Requerentes levantam a hipótese de que os agentes dirigidos contra os componentes e estruturas TEDS atuarão sinergicamente com os antimicrobianos convencionais.

Determinar se os agentes que direcionam componentes previamente descobertos do andaime EPS eDNA (anticorpos anti-DNABII e nucleases) são sinérgicos com agentes que têm como alvo componentes/estruturas TEDS recém-descobertos (ou seja, poliaminas e Z-DNA)

[0376] Todos os três componentes ou a estrutura do TEDS como uma abordagem para a interrupção do biofilme, sozinhos ou em combinação são direcionados. Os Requerentes levantam a hipótese de que, ao tratar vários alvos dentro do TEDS, os Requerentes podem demonstrar sinergismo e, portanto, maior potencial para eficácia superior do que direcionar apenas um alvo.

Poliaminas de direcionamento, proteínas DNABII e/ou eDNA de forma B

[0377] Usando inibidores da síntese de poliamina bacteriana conhecidos [diciclo-hexilamina (DCHA) (Mattila *et al.* (1984) Biochem J. 223(3):823-30), difluorometilornitina (DFMO) (Muth *et al.* (2014) J Med Chem. 57(2):348-63), metilglioxal-bis(ciclopentilamidino hidrazona) (MGBCP) (Takaji *et al.* (1997) Lett Appl Microbiol. 25(3):177-80)], é testada a capacidade de cada um em interromper biofilmes formados pelas 8 cepas padrão em idades distintas de maturação (0, 8, 24 e 48 h). O MIC para

DCHA, DFMO e MGBCP é determinado para cada patógeno, e uma série de diluição de 100 vezes abaixo do MIC é testada para atividade de interrupção. Cada inibidor é testado individualmente e em combinação com DNase (Pulmozyme®; 0, 0,1, 1 U/ml) ou antissoro enriquecido com IgG dirigido contra HU (0, 150, 300 μg/ml). Os biofilmes são analisados por coloração LIVE/DEAD® e CLSM e parâmetros de biofilme quantificados anteriormente. A eficácia de cada combinação de tratamento em comparação com tratamentos individuais e um controle sem tratamento é avaliada. Além disso, é examinada a partição das CFUs que permanecem no biofilme e planctônicas para determinar se houve morte das bactérias residentes ou simplesmente interrupção do biofilme. As 5 combinações mais eficazes para todos os 8 patógenos em CF (como um exemplo de uma comunidade humana polimicrobiana semelhante a biofilme (Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9)) amostras de 10 pacientes quanto à capacidade de interromper a biomassa de escarro recalcitrante são então testadas. Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9. Resumidamente, as amostras de escarro são tratadas por 24 h e fotografadas. A interrupção das amostras de escarro avaliada pelo aumento da turvação em comparação com os controles não tratados é usada para quantificar a eficácia do tratamento, conforme descrito anteriormente. Gustave *et al.* (2013) J Cyst Fibros. 12(4):384-9.

Direcionamento para Z-DNA, proteínas DNABII e/ou eDNA de forma B.

[0378] É testado o uso dos melhores inibidores/desreguladores de Z-DNA (ou as melhores combinações dos mesmos), conforme determinado, a capacidade de cada um em concentrações sub-MIC, individualmente e em combinação com anticorpos anti-DNABII ou DNase, para interromper biofilmes formados pelo padrão 8 cepas em diferentes idades de maturação. Se as nucleases específicas de Z-DNA utilizadas acima inibem a formação de biofilme, essas nucleases são coadministradas com anticorpos anti-DNABII ou DNase. A atividade de interrupção do biofilme

e as combinações mais eficazes para a atividade de interrupção da expectoração de CF são analisadas.

Direcionamento para poliaminas, Z-DNA, proteínas DNABII e/ou eDNA de forma B

[0379] É testado o usando inibidores da síntese de poliamina e inibidores de Z-DNA, a capacidade de cada um em combinação para interromper biofilmes formados por cada uma das 8 cepas padrão em diferentes idades de maturação (0, 8, 24 e 48 h). O melhor tratamento duplo de inibidor de poliamina e inibidor de Z-DNA com anticorpos anti-DNABII ou DNase também é testado. A interrupção do biofilme para cada combinação de tratamentos é avaliada. As três principais combinações são testadas contra expectoração de CF.

Determinar o sinergismo de tratamentos direcionados contra TEDS e antimicrobianos

[0380] A eficácia do direcionamento de todos os 3 componentes ou estrutura do TEDS para a interrupção do biofilme quando em combinação com antimicrobianos é examinada.

Sinergismo de direcionamento de TEDS com antimicrobianos.

[0381] Usando as combinações de interrupção de biofilme mais eficazes, é determinado se as bactérias do biofilme residente remanescente e suas respectivas bactérias planctônicas podem ser mortas pela coadministração de antimicrobianos. Usando várias concentrações e combinações para anticorpos anti-DNABII, DNase, inibidor de poliamina e conversor de Z-DNA determinado acima, é testada a adição de antibióticos apropriados para interrupção e morte de biofilme contra as 8 cepas padrão. Antibióticos clinicamente indicados para cada patógeno 10 vezes acima e abaixo do MIC são coadministrados (*E. faecium*-0,1, 1, 10 μg/ml de ampicilina (Weinstein *et al.* (2001) J Clin Microbiol.

39(7):2729-31); *S. aureus*-0,025, 0,25, 2,5 μg/ml de clindamicina (LaPlante *et al.* (2008) Antimicrob Agents Chemother. 52(6):2156-62); *S. epidermidis*-0,2, 2, 20 mg/ml de vancomicina (Pinheiro *et al.* (2016) Microb Drug Resist. 22(4):283-93); *K. pneumoniae*- 0,4, 4, 40 μg/ml de ceftazidima/avibactam (Sader, *et al.* (2017) Antimicrob Agents Chemother. 61(9)); *A. baumannii*- 0,3, 3, 30 μg/ml meropenem (Liang *et al.* (2011) J Microbiol Immunol Infect. 44(5):358-63); *P. aeruginosa*- 0,4, 4, 40 μg/ml de colistina (Hindler *et al.* (2013) J Clin Microbiol. 51(6):1678-84); *Enterobacter*- 0,4, 4, 40 μg/ml de cefepima (Rivera *et al.* (2016) Antimicrob Agents Chemother. 60(6):3854-5), NTHI- 0,1/0,05, 1/0,5, 10 μg/ml/5 mg/ml amoxicilina/clavulanatolítio31). A interrupção do biofilme e a partição viável restante para cada combinação de tratamentos é avaliada e as combinações são testadas contra expectoração de CF.

[0382] Com esta melhor compreensão do TEDS universal, os Requerentes vislumbram o potencial para tratar biofilmes como uma abordagem autônoma ou combinar esta abordagem com estratégias que direcionam componentes de biofilme específicos da espécie (por exemplo, polissacarídeos alginato*P. aeruginosa*, Pel e Psl (Gunn *et al.* (2016) J Biol Chem. 291(24):12538-46)) para otimizar a eficácia cirúrgica da ruptura do biofilme contra patógenos específicos.

[0383] Os Requerentes também fornecem um modelo pré-clínico para tuberculose (TB). Ver Ordway *et al.* (2010) Anti. Agents and Chemotherapy 54:1820. O microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* é responsável por uma crescente epidemia global. Os números atuais sugerem que existem aproximadamente 8 milhões de novos casos de TB e cerca de 2,7 milhões de mortes devido à TB anualmente. Além do papel desse micróbio como uma coinfecção de indivíduos com HIV (dos ˜45 milhões de infectados com HIV, as estimativas são de que ˜⅓ também estão coinfectados com *M. tuberculosis*), é particularmente problemático

que os isolados tenham se tornado altamente resistente a múltiplas drogas e nenhuma nova droga para TB foi introduzida em mais de um quarto de século. Neste modelo animal, porquinhos-da-índia SPF são mantidos em uma colônia barreira e infectados por meio de spray aerossol para liberar ~ 20 ufc de bacilos de cepa de *M. tuberculosis* Erdman K01 em seus pulmões. Os animais são sacrificados com determinação da carga bacteriana e recuperação dos tecidos para avaliação histopatológica nos dias 25, 50, 75, 100, 125 e 150 dias pós-desafio. Ao contrário dos camundongos que não desenvolvem os sinais clássicos de TB, as cobaias desafiadas dessa maneira desenvolvem granulomas bem organizados com necrose central, uma marca registrada da doença humana. Além disso, como os humanos, as cobaias desenvolvem linfadenite piogranulomatosa e necrosante grave dos nódulos linfáticos de drenagem como parte do complexo de lesão primária. O uso deste modelo fornece uma triagem pré-clínica para confirmar e identificar estratégias terapêuticas e preventivas para redução e/ou eliminação dos biofilmes de *M. tuberculosis* resultantes que foram observados se formando nos pulmões desses animais após o desafio e acredita-se que contribuem para a patogênese e cronicidade da doença.

Experimento N.º 6

[0384] Vários modelos animais de infecções por biofilme de cateter/dispositivo permanente são conhecidos. Ver Otto (2009) Nature Reviews Microbiology 7:555. Embora seja considerado uma flora cutânea normal, o micróbio *Staphylococcus epidermidis* se tornou o que muitos consideram um patógeno oportunista chave, ocupando o primeiro lugar entre os agentes causadores de infecções nosocomiais. Primeiramente, essa bactéria é responsável pela maioria das infecções que se desenvolvem em dispositivos médicos residentes que são contaminados por esse colonizador de pele comum durante a inserção do dispositivo.

Embora não seja uma ameaça à vida, a dificuldade associada ao tratamento dessas infecções de biofilme, combinada com sua frequência, torna-as um sério problema de saúde pública. Os custos atuais associados ao tratamento de infecções da corrente sanguínea associadas a cateteres vasculares, que são devidas apenas a *S. epidermidis,* chegam a US $ 2 bilhões anualmente nos Estados Unidos. Além de *S. epidermidis, E. faecalis* e *S. aureus* também são contaminações encontradas em dispositivos médicos residentes. Existem vários modelos animais de infecções por *S. epidermidis* associadas a cateter, incluindo coelhos, camundongos, porquinhos-da-índia e ratos, todos usados para estudar os mecanismos moleculares da patogênese e que se prestam a estudos de prevenção e/ou terapêutica. Cateteres de veia jugular de rato têm sido usados para avaliar terapias que interferem na formação de biofilme com *E. faecalis, S. aureus* e *S. epidermidis* . A redução do biofilme é frequentemente medida de três maneiras - (i) sonicar cateter e calcular CFUs, (ii) cortar fatias de cateter ou simplesmente colocar em uma placa e marcar, ou (iii) o biofilme pode ser corado com violeta cristal ou outro corante, eluído e OD medido como um proxy para CFUs.

Experimento N.º 7

[0385] Os métodos descritos neste documento podem ser usados para conferir imunidade passiva a um sujeito não imune. A imunidade passiva contra um determinado antígeno pode ser conferida através da transferência de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que reconhecem ou se ligam especificamente a um determinado antígeno. Os doadores e receptores de anticorpos podem ser seres humanos ou não humanos. Adicionalmente, ou alternativamente, a composição do anticorpo pode compreender um polinucleotídeo isolado ou recombinante que codifica um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que reconhece especificamente ou se liga a um antígeno particular.

[0386] A imunidade passiva pode ser conferida nos casos em que a

administração de composições imunogênicas representa um risco para o sujeito receptor, o sujeito receptor está imunocomprometido ou o sujeito receptor requer imunidade imediata. As composições imunogênicas podem ser preparadas de uma maneira consistente com o modo de administração selecionado. As composições podem compreender anticorpos inteiros, fragmentos de ligação ao antígeno, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos gerados *in vivo*, anticorpos gerados *in vitro*, anticorpos purificados ou parcialmente purificados ou soro completo. A administração pode compreender uma dose única de uma composição de anticorpo ou uma administração inicial seguida por uma ou mais doses de reforço. As doses de reforço podem ser fornecidas um dia, dois dias, três dias, uma semana, duas semanas, três semanas, um, dois, três, seis ou doze meses, ou em qualquer outro momento, após uma dose inicial. Uma dose de reforço pode ser administrada após uma avaliação do título de anticorpos do sujeito.

Equivalentes

[0387] Deve ser entendido que, embora a descrição tenha sido descrita em conjunto com as modalidades acima, a descrição e os exemplos anteriores destinam-se a ilustrar e não limitar o âmbito da divulgação. Outros aspectos, vantagens e modificações dentro do escopo da divulgação serão evidentes para os versados na técnica à qual pertence a divulgação.

[0388] Salvo definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta divulgação pertence. Todas as sequências nucleotídicas aqui fornecidas são apresentadas na direção 5’ para 3’.

[0389] As modalidades ilustrativamente descritas neste documento

podem ser praticadas adequadamente na ausência de qualquer elemento ou quaisquer elementos, limitação ou limitações, não especificamente revelados neste documento. Assim, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo", etc. devem ser lidos de forma abrangente e sem limitação. Além disso, os termos e expressões utilizados neste documento foram usados como termos de descrição e não de limitação, e não há nenhuma intenção no uso de tais termos e expressões em excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas, ou partes delas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis no escopo da divulgação.

[0390] Assim, deve ser entendido que, embora a presente divulgação tenha sido especificamente divulgada por modalidades específicas e características opcionais, a modificação, melhoria e variação das modalidades aqui descritas podem ser utilizadas pelos versados na técnica, e que tais modificações, melhorias e as variações são consideradas dentro do escopo desta divulgação. Os materiais, métodos e exemplos aqui fornecidos são representativos de modalidades particulares, são exemplificativos e não pretendem ser limitações do âmbito da divulgação.

[0391] O escopo da divulgação foi descrito ampla e genericamente neste documento. Cada uma das espécies mais estreitas e grupos subgenéricos que caem dentro da descrição genérica também fazem parte da divulgação. Isto inclui a descrição genérica da descrição com uma ressalva ou limitação negativa, removendo qualquer assunto do gênero, independentemente de estarem ou não o material extirpado é recitado especificamente neste documento.

[0392] Além disso, quando características ou aspectos da divulgação são descritos em termos de grupos Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que as modalidades da divulgação também podem, desse modo, ser descritas em termos de qualquer membro individual ou

subgrupo de membros do grupo Markush.

[0393] Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências aqui mencionadas são expressamente incorporadas por referência na sua totalidade, na mesma medida como se cada uma fosse incorporada por referência individualmente. Em caso de conflito, o presente Relatório Descritivo, incluindo definições, servirá de base para controle.

REFERÊNCIAS

1. Dillon SC, Dorman CJ. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat Rev Microbiol. 2010;8(3):185-95. doi: 10.1038/nrmicro2261. PubMed PMID: 20140026.
2. Dey D, Nagaraja V, Ramakumar S. Structural and evolutionary analyses reveal determinants of DNA binding specificities of nucleoid-associated proteins HU and IHF. Mol Phylogenet Evol. 2017;107:356-66. doi: 10.1016/j.ympev.2016.11.014. PubMed PMID: 27894997.
3. Swinger KK, Rice PA. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. Curr Opin Struct Biol. 2004;14(1):28-35. doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003. PubMed PMID: 15102446.
4. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. J Exp Med. 1944;79(2):137-58. PubMed PMID: 19871359; PMCID: PMC2135445.
5. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.
6. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther. 2008;6(2):201-8. doi: 10.1586/14787210.6.2.201. PubMed PMID: 18380602; PMCID: PMC2712878.
7. Steele L, Fawal H. 4th Decennial International Conference on nosocomial and healthcare-associated infections: a challenge for

change. Am J Infect Control. 2000;28(3):207-10. doi: 10.1067/mic.2000.107275. PubMed PMID: 10840339.

8. Apicella MA. Bacterial otitis media, the chinchilla middle ear, and biofilms. J Infect Dis. 2009;199(6):774-5. PubMed PMID: 19434910.
9. Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. Ann Epidemiol. 2000;10(8):509-15. PubMed PMID: 11118930.
10. Mancl KA, Kirsner RS, Ajdic D. Wound biofilms: lessons learned from oral biofilms. Wound Repair Regen. 2013;21(3):352-62. doi: 10.1111/wrr.12034. PubMed PMID: 23551419; PMCID: PMC3648594.
11. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(3):297-308. doi: 10.1586/eri.13.12. PubMed PMID: 23458769.
12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 1999;37(6):1771-6. PubMed PMID: 10325322; PMCID: PMC84946.
13. Stacy A, McNally L, Darch SE, Brown SP, Whiteley M. The biogeography of polymicrobial infection. Nat Rev Microbiol. 2016;14(2):93-105. doi: 10.1038/nrmicro.2015.8. PubMed PMID: 26714431; PMCID: PMC5116812.
14. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ. The polymicrobial nature of biofilm infection. Clin Microbiol Infect. 2013;19(2):107-12. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.04001.x. PubMed PMID: 22925473.
15. Jurcisek JA, Brockman KL, Novotny LA, Goodman SD, Bakaletz LO. Nontypeable Haemophilus influenzae releases DNA and DNABII proteins via a T4SS-like complex and ComE of the type IV pilus machinery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(32):E6632-E41. doi: 10.1073/pnas.1705508114. PubMed PMID: 28696280;

PMCID: PMC5559034.

16. Sena-Velez M, Redondo C, Graham JH, Cubero J. Presence of Extracellular DNA during Biofilm Formation by Xanthomonas citri subsp. citri Strains with Different Host Range. PLoS One. 2016;11(6):e0156695. doi: 10.1371/journal.pone.0156695. PubMed PMID: 27248687; PMCID: PMC4889101.
17. Wang S, Liu X, Liu H, Zhang L, Guo Y, Yu S, Wozniak DJ, Ma LZ. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in Pseudomonas aeruginosa. Environ Microbiol Rep. 2015;7(2):330-40. doi: 10.1111/1758-2229.12252. PubMed PMID: 25472701; PMCID: PMC4656019.
18. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science. 2002;295(5559):1487. doi: 10.1126/science.295.5559.1487. PubMed PMID: 11859186.
19. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.
20. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.
21. Hymes SR, Randis TM, Sun TY, Ratner AJ. DNase inhibits Gardnerella vaginalis biofilms *in vitro* and *in vivo*. J Infect Dis. 2013;207(10):1491-7. doi: 10.1093/infdis/jit047. PubMed PMID: 23431033; PMCID: PMC3627197.
22. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol.

2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

23. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. BMC Microbiol. 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794.
24. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. Microb Pathog. 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864.
25. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J Antibiot (Tokyo). 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.
26. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.
27. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. DNA Cell Biol. 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.
28. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.

29. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.
30. Devaraj A, Buzzo J, Rocco CJ, Bakaletz LO, Goodman SD. The DNABII family of proteins is comprised of the only nucleoid associated proteins required for nontypeable Haemophilus influenzae biofilm structure. Microbiologyopen. 2017. doi: 10.1002/mbo3.563. PubMed PMID: 29230970.
31. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
32. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. Biochem J. 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594.
33. Tabor CW, Tabor H. Polyamines in microorganisms. Microbiol Rev. 1985;49(1):81-99. PubMed PMID: 3157043; PMCID: PMC373019.
34. Bachrach U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. Curr Protein Pept Sci. 2005;6(6):559-66. PubMed PMID: 16381604.
35. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.
36. Sarkar T, Petrov AS, Vitko JR, Santai CT, Harvey SC, Mukerji I, Hud NV. Integration host factor (IHF) dictates the structure of polyamine-DNA condensates: implications for the role of IHF in the compaction of bacterial chromatin. Biochemistry. 2009;48(4):667-

75. doi: 10.1021/bi8019965. PubMed PMID: 19132923.

37. Sarkar T, Vitoc I, Mukerji I, Hud NV. Bacterial protein HU dictates the morphology of DNA condensates produced by crowding agents and polyamines. Nucleic Acids Res. 2007;35(3):951 61. doi: 10.1093/nar/gkl1093. PubMed PMID: 17259223; PMCID: PMC1807954.
38. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225.
39. Thomas TJ, Messner RP. A left-handed (Z) conformation of poly(dA-dC).poly(dG-dT) induced by polyamines. Nucleic Acids Res. 1986;14(16):6721-33. PubMed PMID: 3748821; PMCID: PMC311676.
40. Thomas TJ, Messner RP. Structural specificity of polyamines in left-handed Z-DNA formation. Immunological and spectroscopic studies. J Mol Biol. 1988;201(2):463-7. PubMed PMID: 3418706.
41. Pohl FM. Salt-induced transition between two double-helical forms of oligo (dC-dG). Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1983;47 Pt 1:113-7. PubMed PMID: 6574834.
42. Pohl FM. Dynamics of the B-to-Z transition in supercoiled DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1986;83(14):4983-7. PubMed PMID: 3460079; PMCID: PMC323873.
43. Rahmouni AR. Z-DNA as a probe for localized supercoiling *in vivo*. Mol Microbiol. 1992;6(5):569-72. PubMed PMID: 1552856.
44. Jovin TMS, D. M.; McIntosh, L. P. The Transition Between B-DNA and Z-DNA. Ann Rev Phys Chem. 1987;38:521-60.
45. Kim DH, Im H, Jee JG, Jang SB, Yoon HJ, Kwon AR, Kang SM, Lee BJ. beta-Arm flexibility of HU from Staphylococcus aureus dictates the DNA-binding and recognition mechanism. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2014;70(Pt 12):3273-89. doi:

10.1107/S1399004714023931. PubMed PMID: 25478845.

46. Chaires JB, Norcum MT. Structure and stability of Z* DNA. J Biomol Struct Dyn. 1988;5(6):1187-207.doi: 10.1080/07391102.1988.10506463. PubMed PMID: 3271507.
47. Thomas TJ, Bloomfield VA. Chain flexibility and hydrodynamics of the B and Z forms of poly(dGdC). poly(dG-dC). Nucleic Acids Res. 1983;11(6):1919-30. PubMed PMID: 6835843; PMCID: PMC325846.
48. Athanasiadis A. Zalpha-domains: at the intersection between RNA editing and innate immunity. Semin Cell Dev Biol. 2012;23(3):275-80. doi: 10.1016/j.semcdb.2011.11.001. PubMed PMID: 22085847.
49. Bergen HR, 3rd, Losman MJ, O'Connor T, Zacharias W, Larson JE, Accavitti MA, Wells RD, Koopman WJ. Specificity of monoclonal anti-Z-DNA antibodies from unimmunized MRL/Mp-lpr/lpr mice. J Immunol. 1987;139(3):743-8. PubMed PMID: 3496387.
50. Herbert A, Rich A. The biology of left-handed Z-DNA. J Biol Chem. 1996;271(20):11595-8. PubMed PMID: 8662853.
51. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.
52. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms *in vitro* and induce bacterial clearance *in vivo*. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.
53. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein.

Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.

54. Bakaletz LO. Chinchilla as a robust, reproducible and polymicrobial model of otitis media and its prevention. Expert Rev Vaccines. 2009;8(8):1063-82. doi: 10.1586/erv.09.63. PubMed PMID: 19627188.
55. Iacomino G, Picariello G, Sbrana F, Di Luccia A, Raiteri R, D'Agostino L. DNA is wrapped by the nuclear aggregates of polyamines: the imaging evidence. Biomacromolecules. 2011;12(4):1178-86. doi: 10.1021/bm101478j. PubMed PMID: 21401020.
56. Paulin L, Lindberg LA, Poso H. Reversible inhibition of flagella formation after specific inhibition of spermidine synthesis by dicyclohexylamine in Pseudomonas aeruginosa. Antonie Van Leeuwenhoek. 1986;52(6):483-90. PubMed PMID: 3101591.
57. Pegg AE, Bitonti AJ, McCann PP, Coward JK. Inhibition of bacterial aminopropyltransferases by Sadenosyl- 1, 8-diamino-3-thiooctane and by dicyclohexylamine. FEBS Lett. 1983;155(2):192-6. PubMed PMID: 6406265.
58. Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersboll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology. 2000;146 (Pt 10):2395-407. doi: 10.1099/00221287-146-10-2395. PubMed PMID: 11021916.
59. Yang CL, Chilvers M, Montgomery M, Nolan SJ. Dornase alfa for cystic fibrosis. Paediatr Respir Rev. 2017;21:65-7. doi: 10.1016/j.prrv.2016.09.001. PubMed PMID: 27769785.
60. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)2] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. Sci Rep. 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867.
61. Segall AM, Goodman SD, Nash HA. Architectural elements in

nucleoprotein complexes: interchangeability of specific and non-specific DNA binding proteins. EMBO J. 1994;13(19):4536-48. PubMed PMID: 7925295; PMCID: PMC395386.

62. Tjokro NO, Rocco CJ, Priyadarshini R, Davey ME, Goodman SD. A biochemical analysis of the interaction of Porphyromonas gingivalis HU PG0121 protein with DNA. PLoS One. 2014;9(3):e93266. doi: 10.1371/journal.pone.0093266. PubMed PMID: 24681691; PMCID: PMC3969353.
63. Ayala E, Downey JS, Mashburn-Warren L, Senadheera DB, Cvitkovitch DG, Goodman SD. A biochemical characterization of the DNA binding activity of the response regulator VicR from Streptococcus mutans. PLoS One. 2014;9(9):e108027. doi: 10.1371/journal.pone.0108027. PubMed PMID: 25229632; PMCID: PMC4168254.
64. Hung DC, Downey JS, Ayala EA, Kreth J, Mair R, Senadheera DB, Qi F, Cvitkovitch DG, Shi W, Goodman SD. Characterization of DNA binding sites of the ComE response regulator from Streptococcus mutans. J Bacteriol. 2011;193(14):3642-52. doi: 10.1128/JB.00155-11. PubMed PMID: 21602345; PMCID: PMC3133340.
65. Idicula WK, Jurcisek JA, Cass ND, Ali S, Goodman SD, Elmaraghy CA, Jatana KR, Bakaletz LO. Identification of biofilms in post-tympanostomy tube otorrhea. Laryngoscope. 2016;126(8):1946-51. doi: 10.1002/lary.25826. PubMed PMID: 27426942; PMCID: PMC4955598.
66. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.
67. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. Microbiol Spectr.

2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162.

68. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. Microbiol Spectr. 2015;3(4). doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012. PubMed PMID: 26350328; PMCID: PMC4566162.
69. Justice SS, Li B, Downey JS, Dabdoub SM, Brockson ME, Probst GD, Ray WC, Goodman SD. Aberrant community architecture and attenuated persistence of uropathogenic Escherichia coli in the absence of individual IHF subunits. PLoS One. 2012;7(10):e48349. doi: 10.1371/journal.pone.0048349. PubMed PMID: 23133584; PMCID: PMC3485042.
70. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. Mol Syst Biol. 2006;2:2006 0008. doi: 10.1038/msb4100050. PubMed PMID: 16738554; PMCID: PMC1681482.
71. Karperien A. FracLac for ImageJ 1999-2013. Available from: rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm.
72. Kashiwagi K, Miyamoto S, Suzuki F, Kobayashi H, Igarashi K. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(10):4529-33. PubMed PMID: 1584788; PMCID: PMC49116.
73. Soksawatmaekhin W, Kuraishi A, Sakata K, Kashiwagi K, Igarashi K. Excretion and uptake of cadaverine by CadB and its physiological functions in Escherichia coli. Mol Microbiol. 2004;51(5):1401-12. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03913.x. PubMed PMID: 14982633.
74. Higashi K, Ishigure H, Demizu R, Uemura T, Nishino K, Yamaguchi A, Kashiwagi K, Igarashi K. Identification of a spermidine excretion

protein complex (MdtJI) in Escherichia coli. J Bacteriol. 2008;190(3):872-8. doi: 10.1128/JB.01505-07. PubMed PMID: 18039771; PMCID: PMC2223573.

75. Sugiyama Y, Nakamura A, Matsumoto M, Kanbe A, Sakanaka M, Higashi K, Igarashi K, Katayama T, Suzuki H, Kurihara S. A Novel Putrescine Exporter SapBCDF of Escherichia coli. J Biol Chem. 2016;291(51):26343-51. doi: 10.1074/jbc.M116.762450. PubMed PMID: 27803167; PMCID: PMC5159496.
76. Sabate Bresco M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, O'Mahony L, Richards RG, Moriarty TF. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. Front Microbiol. 2017;8:1401. doi: 10.3389/fmicb.2017.01401. PubMed PMID: 28824556; PMCID: PMC5539136.
77. Hakkinen MR, Roine A, Auriola S, Tuokko A, Veskimae E, Keinanen TA, Lehtimaki T, Oksala N, Vepsalainen J. Analysis of free, mono- and diacetylated polyamines from human urine by LC-MS/MS. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2013;941:81-9. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.10.009. PubMed PMID: 24185098.
78. Liu R, Li Q, Ma R, Lin X, Xu H, Bi K. Determination of polyamine metabolome in plasma and urine by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method: application to identify potential markers for human hepatic cancer. Anal Chim Acta. 2013;791:36-45. doi: 10.1016/j.aca.2013.06.044. PubMed PMID: 23890604.
79. Xu H, Liu R, He B, Bi CW, Bi K, Li Q. Polyamine Metabolites Profiling for Characterization of Lung and Liver Cancer Using an LC-Tandem MS Method with Multiple Statistical Data Mining Strategies: Discovering Potential Cancer Biomarkers in Human Plasma and Urine. Molecules. 2016;21(8). doi: 10.3390/molecules21081040. PubMed PMID: 27517900.
80. Kabir A, Suresh Kumar G. Binding of the biogenic polyamines to

deoxyribonucleic acids of varying base composition: base specificity and the associated energetics of the interaction. PLoS One. 2013;8(7):e70510. doi: 10.1371/journal.pone.0070510. PubMed PMID: 23894663; PMCID: PMC3722294.

81. Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B, Prosseda G. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. Int J Med Microbiol. 2013;303(8):484-91. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.06.008. PubMed PMID: 23871215.
82. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. Biotechnol Lett. 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324.
83. Kim YG, Kim PS, Herbert A, Rich A. Construction of a Z-DNA-specific restriction endonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(24):12875-9. PubMed PMID: 9371768; PMCID: PMC24231.
84. Shin SI, Ham S, Park J, Seo SH, Lim CH, Jeon H, Huh J, Roh TY. Z-DNA-forming sites identified by ChIP-Seq are associated with actively transcribed regions in the human genome. DNA Res. 2016. doi: 10.1093/dnares/dsw031. PubMed PMID: 27374614; PMCID: PMC5066173.
85. Kim J, Yang C, DasSarma S. Analysis of left-handed Z-DNA formation in short d(CG)n sequences in Escherichia coli and Halobacterium halobium plasmids. Stabilization by increasing repeat length and DNA supercoiling but not salinity. J Biol Chem. 1996;271(16):9340-6. PubMed PMID: 8621598.
86. Kwakye-Berko F, Meshnick S. Sequence preference of chloroquine binding to DNA and prevention of Z-DNA formation. Mol Biochem Parasitol. 1990;39(2):275-8. PubMed PMID: 2320060.
87. Shafer RH, Brown SC, Delbarre A, Wade D. Binding of ethidium and bis(methidium)spermine to Z DNA by intercalation. Nucleic Acids Res. 1984;12(11):4679-90. PubMed PMID: 6739293; PMCID: PMC318867.

88. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Biopolymers. 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.
89. Muramatsu A, Shimizu Y, Yoshikawa Y, Fukuda W, Umezawa N, Horai Y, Higuchi T, Fujiwara S, Imanaka T, Yoshikawa K. Naturally occurring branched-chain polyamines induce a crosslinked meshwork structure in a giant DNA. J Chem Phys. 2016;145(23):235103. doi: 10.1063/1.4972066. PubMed PMID: 28010109.
90. Zimmer C, Marck C, Guschlbauer W. Z-DNA and other non-B-DNA structures are reversed to B-DNA by interaction with netropsin. FEBS Lett. 1983;154(1):156-60. PubMed PMID: 6299791.
91. Temiz NA, Donohue DE, Bacolla A, Luke BT, Collins JR. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. PLoS One. 2012;7(4):e35558. doi: 10.1371/journal.pone.0035558. PubMed PMID: 22530050; PMCID: PMC3328458.
92. Goodman SD, Nash HA. Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. Nature. 1989;341(6239):251-4. doi: 10.1038/341251a0. PubMed PMID: 2528697.
93. Herbert AG, Rich A. A method to identify and characterize Z-DNA binding proteins using a linear oligodeoxynucleotide. Nucleic Acids Res. 1993;21(11):2669-72. PubMed PMID: 8332463; PMCID: PMC309597.
94. Shishido K, Sakaguchi R, Nosoh Y. Enhancement of S1 nuclease-susceptibility of negatively superhelical DNA by netropsin. Biochem Biophys Res Commun. 1984;124(2):388-92. PubMed PMID: 6093797.
95. Mattila T, Honkanen-Buzalski T, Poso H. Reversible inhibition of bacterial growth after specific inhibition of spermidine synthase by dicyclohexylamine. Biochem J. 1984;223(3):823 30. PubMed PMID:

6508744; PMCID: PMC1144368.

96. Muth A, Madan M, Archer JJ, Ocampo N, Rodriguez L, Phanstiel Ot. Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. J Med Chem. 2014;57(2):348-63. doi: 10.1021/jm401174a. PubMed PMID: 24405276.
97. Takaji S, Hibasami H, Imoto I, Hashimoto Y, Nakao K, Ikemura N, Taguchi Y, Nakashima K. Growth inhibition of Helicobacter pylori by a polyamine synthesis inhibitor, methylglyoxal bis(cyclopentylamidinohydrazone). Lett Appl Microbiol. 1997;25(3):177-80. PubMed PMID: 9351259.
98. Weinstein MP. Comparative evaluation of penicillin, ampicillin, and imipenem MICs and susceptibility breakpoints for vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. J Clin Microbiol. 2001;39(7):2729-31. doi: 10.1128/JCM.39.7.2729-2731.2001. PubMed PMID: 11427608; PMCID: PMC88224.
99. LaPlante KL, Leonard SN, Andes DR, Craig WA, Rybak MJ. Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and *in vitro* pharmacodynamic models. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(6):2156-62. doi: 10.1128/AAC.01046-07. PubMed PMID: 18411321; PMCID: PMC2415789.
100. Pinheiro L, Brito CI, Pereira VC, Oliveira A, Bartolomeu AR, Camargo CH, Cunha ML. Susceptibility Profile of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over a Period of 12 Years. Microb Drug Resist. 2016;22(4):283-93. doi: 10.1089/mdr.2015.0064. PubMed PMID: 26623676.
101. Sader HS, Mendes RE, Streit JM, Flamm RK. Antimicrobial

Susceptibility Trends among Staphylococcus aureus Isolates from U.S. Hospitals: Results from 7 Years of the Ceftaroline (AWARE) Surveillance Program, 2010 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(9). doi: 10.1128/AAC.01043-17. PubMed PMID: 28630196; PMCID: PMC5571371.

102. Liang-Yu C, Kuo SC, Liu CY, Luo BS, Huang LJ, Lee YT, Chen CP, Chen TL, Fung CP. Difference in imipenem, meropenem, sulbactam, and colistin nonsusceptibility trends among three phenotypically undifferentiated Acinetobacter baumannii complex in a medical center in Taiwan, 1997-2007. J Microbiol Immunol Infect. 2011;44(5):358-63. doi: 10.1016/j.jmii.2011.01.032. PubMed PMID: 21524973.
103. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2013;51(6):1678-84. doi: 10.1128/JCM.03385-12. PubMed PMID: 23486719; PMCID: PMC3716094.
104. Rivera CG, Narayanan PP, Patel R, Estes LL. Impact of Cefepime Susceptible-Dose-Dependent MIC for Enterobacteriaceae on Reporting and Prescribing. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(6):3854-5. doi: 10.1128/AAC.00442-16. PubMed PMID: 27067319; PMCID: PMC4879407.
105. Dervan PB, Becker, MM. Molecular recognition of DNA by small molecules. Synthesis of bis(methidium)spermine, a DNA polyintercalating molecule. 1978;100(6):1968-1970
106. Rajecky, M (2015) Interaction of benzo[*c*]phenanthridine alkaloids with DNA. Retrieved from Masaryk University.
107. Le TN, *et al.*, A Versatile Total Synthesis of Benzo[*c*]phenanthridine and Protoberberine Alkaloids Using Lithiated Toluamide−Benzonitrile Cycloaddition. 2004;69(8):2768-2772.
108. Michael AJ. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. J Biol Chem. 2016;291(29):14896-903. doi:

10.1074/jbc.R116.734780. PubMed PMID: 27268252; PMCID: PMC4946907.

109. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. FEBS J. 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.
110. Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. J Mol Biol. 2015;427(21):3389-406. doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020. PubMed PMID: 26156863.
111. Michael AJ. Biosynthesis of polyamines and polyamine-containing molecules. Biochem J. 2016;473(15):2315-29. doi: 10.1042/BCJ20160185. PubMed PMID: 27470594.
112. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. IUBMB Life. 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821.
113. Karatan E, Michael AJ. A wider role for polyamines in biofilm formation. Biotechnol Lett. 2013;35(11):1715-7. doi: 10.1007/s10529-013-1286-3. PubMed PMID: 23881324.
114. McGinnis MW, Parker ZM, Walter NE, Rutkovsky AC, Cartaya-Marin C, Karatan E. Spermidine regulates Vibrio cholerae biofilm formation via transport and signaling pathways. FEMS Microbiol Lett. 2009;299(2):166-74. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01744.x. PubMed PMID: 19694812.
115. Wortham BW, Oliveira MA, Fetherston JD, Perry RD. Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for Yersinia pestis biofilm formation. Environ Microbiol. 2010;12(7):2034-47. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02219.x. PubMed PMID: 20406298; PMCID: PMC3039482.
116. Goytia M, Dhulipala VL, Shafer WM. Spermine impairs biofilm formation by Neisseria gonorrhoeae. FEMS Microbiol Lett.

2013;343(1):64-9. doi: 10.1111/1574-6968.12130. PubMed PMID: 23506248; PMCID: PMC3651792.

117. Cardile AP, Woodbury RL, Sanchez CJ, Jr., Becerra SC, Garcia RA, Mende K, Wenke JC, Akers KS. Activity of Norspermidine on Bacterial Biofilms of Multidrug-Resistant Clinical Isolates Associated with Persistent Extremity Wound Infections. Adv Exp Med Biol. 2017;973:53-70. doi: 10.1007/5584_2016_93. PubMed PMID: 27864804; PMCID: PMC5438303.
118. Wang Y, Kim SH, Natarajan R, Heindl JE, Bruger EL, Waters CM, Michael AJ, Fuqua C. Spermidine Inversely Influences Surface Interactions and Planktonic Growth in Agrobacterium tumefaciens. J Bacteriol. 2016;198(19):2682-91. doi: 10.1128/JB.00265-16. PubMed PMID: 27402627; PMCID: PMC5019071.
119. Qu L, She P, Wang Y, Liu F, Zhang D, Chen L, Luo Z, Xu H, Qi Y, Wu Y. Effects of norspermidine on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and eradication. Microbiologyopen. 2016;5(3):402-12. doi: 10.1002/mbo3.338. PubMed PMID: 26817804; PMCID: PMC4905993.
120. Konai MM, Adhikary U, Samaddar S, Ghosh C, Haldar J. Structure-Activity Relationship of Amino Acid Tunable Lipidated Norspermidine Conjugates: Disrupting Biofilms with Potent Activity against Bacterial Persisters. Bioconjug Chem. 2015;26(12):2442-53. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00494. PubMed PMID: 26452096.
121. Si X, Quan X, Wu Y. A small-molecule norspermidine and norspermidine-hosting polyelectrolyte coatings inhibit biofilm formation by multi-species wastewater culture. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;99(24):10861-70. doi: 10.1007/s00253-015-6943-0. PubMed PMID: 26350146.
122. Dewangan RP, Joshi S, Kumari S, Gautam H, Yar MS, Pasha S. N-terminally modified linear and branched spermine backbone dipeptidomimetics against planktonic and sessile methicillin-

resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):5435-47. doi: 10.1128/AAC.03391-14. PubMed PMID: 24982082; PMCID: PMC4135887.

123. Ding Y, Peng N, Du Y, Ji L, Cao B. Disruption of putrescine biosynthesis in Shewanella oneidensis enhances biofilm cohesiveness and performance in Cr(VI) immobilization. Appl Environ Microbiol. 2014;80(4):1498-506. doi: 10.1128/AEM.03461-13. PubMed PMID: 24362428; PMCID: PMC3911039.
124. Planet PJ, LaRussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, Uhlemann AC, Boundy S, Goldberg J, Narechania A, Kulkarni R, Ratner AJ, Geoghegan JA, Kolokotronis SO, Prince A. Emergence of the epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin. MBio. 2013;4(6):e00889-13. doi: 10.1128/mBio.00889-13. PubMed PMID: 24345744; PMCID: PMC3870260.
125. Hobley L, Li B, Wood JL, Kim SH, Naidoo J, Ferreira AS, Khomutov M, Khomutov A, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Spermidine promotes Bacillus subtilis biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR. J Biol Chem. 2017;292(29):12041-53. doi: 10.1074/jbc.M117.789644. PubMed PMID: 28546427; PMCID: PMC5519356.
126. Ou M, Ling J. Norspermidine changes the basic structure of S. mutans biofilm. Mol Med Rep. 2017;15(1):210-20. doi: 10.3892/mmr.2016.5979. PubMed PMID: 27922663; PMCID: PMC5355703.
127. Nesse LL, Berg K, Vestby LK. Effects of norspermidine and spermidine on biofilm formation by potentially pathogenic Escherichia coli and Salmonella enterica wild-type strains. Appl Environ Microbiol. 2015;81(6):2226-32. doi: 10.1128/AEM.03518-14. PubMed PMID: 25595767; PMCID: PMC4345383.

128. Ramon-Perez ML, Diaz-Cedillo F, Contreras-Rodriguez A, Betanzos-Cabrera G, Peralta H, Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jan-Roblero J, Cancino Diaz JC. Different sensitivity levels to norspermidine on biofilm formation in clinical and commensal Staphylococcus epidermidis strains. Microb Pathog. 2015;79:8-16. doi: 10.1016/j.micpath.2014.12.004. PubMed PMID: 25549879.

129. Hobley L, Kim SH, Maezato Y, Wyllie S, Fairlamb AH, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Norspermidine is not a self-produced trigger for biofilm disassembly. Cell. 2014;156(4):844-54. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.012. PubMed PMID: 24529384; PMCID: PMC3969229.

130. Sakamoto A, Terui Y, Yamamoto T, Kasahara T, Nakamura M, Tomitori H, Yamamoto K, Ishihama A, Michael AJ, Igarashi K, Kashiwagi K. Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and ribosome recycling factor. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(11):1877-86. doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.010. PubMed PMID: 22814172.

131. Burrell M, Hanfrey CC, Murray EJ, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in Bacillus subtilis biofilm formation. J Biol Chem. 2010;285(50):39224-38. doi: 10.1074/jbc.M110.163154. PubMed PMID: 20876533; PMCID: PMC2998088.

132. Lee J, Sperandio V, Frantz DE, Longgood J, Camilli A, Phillips MA, Michael AJ. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in Vibrio cholerae. J Biol Chem. 2009;284(15):9899-907. doi: 10.1074/jbc.M900110200. PubMed PMID: 19196710; PMCID: PMC2665113.

133. Patel CN, Wortham BW, Lines JL, Fetherston JD, Perry RD, Oliveira MA. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J Bacteriol. 2006;188(7):2355-63. doi: 10.1128/JB.188.7.2355-2363.2006. PubMed PMID: 16547021; PMCID: PMC1428407.

134. Chen X, Wu H, Cao Y, Yao X, Zhao L, Wang T, Yang Y, Lv D, Chai Y, Cao Y, Zhu Z. Ion-pairing chromatography on a porous graphitic carbon column coupled with time-of-flight mass spectrometry for targeted and untargeted profiling of amino acid biomarkers involved in Candida albicans biofilm formation. Mol Biosyst. 2014;10(1):74-85. doi: 10.1039/c3mb70240e. PubMed PMID: 24150280.

135. Liao Z, ZhangGuan X, Zhu Z, Yao X, Yang Y, Jiang Y, Cao Y. Enhancement of the antibiofilm activity of amphotericin B by polyamine biosynthesis inhibitors. Int J Antimicrob Agents. 2015;46(1):45-52. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.021. PubMed PMID: 25937097.

136. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. J Bacteriol. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050.

137. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.

138. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID: PMC4933457.

139. Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the Candida

albicans biofilm matrix and its contribution to biofilms. Mycopathologia. 2010;169(5):323-31. doi: 10.1007/s11046-009-9264-y. PubMed PMID: 20012895; PMCID: PMC3973130.

140. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.
141. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
142. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.
143. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.
144. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO. Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.
145. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. Clin Vaccine

Immunol. 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379.

146. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms *in vitro* and induce bacterial clearance *in vivo*. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.
147. Novotny LA, Jurcisek JA, Ward MO, Jr., Jordan ZB, Goodman SD, Bakaletz LO. Antibodies against the majority subunit of type IV Pili disperse nontypeable Haemophilus influenzae biofilms in a LuxS-dependent manner and confer therapeutic resolution of experimental otitis media. Mol Microbiol. 2015;96(2):276-92. doi: 10.1111/mmi.12934. PubMed PMID: 25597921; PMCID: PMC4423401.
148. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.
149. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.
150. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. J Control Release. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.

151. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. Campylobacter jejuni biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. Front Microbiol. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105.

152. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.

153. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.

154. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

155. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.

156. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. Orig Life Evol Biosph. 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678.

157. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsalainen J, Patel R, Keinanen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. Biomacromolecules. 2010;11(1):97-105. doi:

10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070.

158. Cavaliere R., Ball J. L., Turnbull L., and Whitchurch C. (2014). The biofilm matri destabilizers, EDTA, and DNAseI, enhance biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin. Microbiology Open. 3(4):557-567.
159. Chmielewski R.A.N. and Frank J.F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol. 2. 22-32.
160. Devaraj A., Justice S.S., Bakaletz L.O., and Goodman S.D. (2015). DNABII Proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Molecular Microbiology. 96 (6): 1119-1135.
161. Dongari-Bagtzoglou A. (2008). Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Expert Rev Anti Infect Ther.6(2):201-8. Donlan R.M. (2001). Biofilms and device-associated infections. Emerging Infectious Diseases. 7(2):277-281.
162. Flemming H. and Wingender J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 8:623-633
163. Goodman S.D., Obergfell K.P., Jurcisek J.A., Novotny L.A., Downey J.S., Ayala E.A., Tjokro N., Li B., Justice S.S., and Bakaletz L.O. (2011). Mucosal Immunology. 4 (6): 625-637.
164. Gueroult M., Boittin O., Mauffret O., Etchebest C., and Hartmann B. (2012). Mg 2+ in the Major Groove Modulates B-DNA Structure and Dynamics. PLOS ONE. (7)-7-e41704.
165. Hackl E. V., Kornilova S.V., and Blagoi Y. P. (2005) DNA structural transitions induced by divalent metals ions in aqueous solutions. International Journal of Biological Macromolecules 35:175-191.
166. Hobley L., Li B., Wood J.L., Kim S.H., Naidoo J., Ferreira A.S., Khomutov M., Khomutov A., Stanley-Wall N.R., and Michael A.J. (2017). Spermidine promotoes Bacillus subtilis biofilm formation by activating expression of the matrix regulator slrR. Journal of Biological Chemistry. 292(29): 12041-12053.
167. Nash H. A., Robertson C. A., Flamm E., Weisberg R. A., and Miller

H. I. (1987). Overproduction of Escherichia coli Integration Host Factor, a Protein with Nonidentical Subunits. Journal of Bacteriology. 4124-4127.

168. Novotny L.A., Jucisek J.A., Goodman S. D., and Bakaletz L.O. (2016). Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms *in vitro* and induce bacterial clearance *in vivo*. EBioMedicine. (10) :33-44.
169. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., and Oliveira M.A. (2006). Polyamines Are Essential for the Formation of Plague Biofilm. Journal of Bacteriology. 2355-2363.
170. Tan Z-J. and Chen S-J. (2006). Nucleic Acid Helix Stability: Effects of Salt Concentration, Cation Valence and Size, and Chain Length. Biophysical Journal. (90): 1175-1190.
171. Vorgias C. E., and Wilson K. S. (1991). A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from Escherichia coli. Protein Expression and Purifcation. 2(5-6):317-20.
172. Wood T.L., Guha R., Tang. L., Geitner M., Kumar M., and Wood T.K. (2016). Living biofouling-resistant membranes as a model for the beneficial use of engineered biofilms. PNAS. E2802-E2811.
173. Visick KL, Schembri MA, Yildiz F, Ghigo JM. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. J Bacteriol. 2016;198(19):2553-63. doi: 10.1128/JB.00156-16. PubMed PMID: 26977109; PMCID: PMC5019050.
174. Hoiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS. 2017;125(4):272-5. doi: 10.1111/apm.12686. PubMed PMID: 28407426.
175. Gunn JS, Bakaletz LO, Wozniak DJ. What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention. J Biol Chem. 2016;291(24):12538-46. doi: 10.1074/jbc.R115.707547. PubMed PMID: 27129225; PMCID:

PMC4933457.

176. Okshevsky M, Meyer RL. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. Crit Rev Microbiol. 2015;41(3):341-52. doi: 10.3109/1040841X.2013.841639. PubMed PMID: 24303798.
177. Wilton M, Charron-Mazenod L, Moore R, Lewenza S. Extracellular DNA Acidifies Biofilms and Induces Aminoglycoside Resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2015;60(1):544-53. doi: 10.1128/AAC.01650-15. PubMed PMID: 26552982; PMCID: PMC4704225.
178. Brandstetter KA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO, Das S. Antibodies directed against integration host factor mediate biofilm clearance from Nasopore. Laryngoscope. 2013;123(11):2626-32. doi: 10.1002/lary.24183. PubMed PMID: 23670606; PMCID: PMC4060527.
179. Brockson ME, Novotny LA, Mokrzan EM, Malhotra S, Jurcisek JA, Akbar R, Devaraj A, Goodman SD, Bakaletz LO. Evaluation of the kinetics and mechanism of action of anti-integration host factor-mediated disruption of bacterial biofilms. Mol Microbiol. 2014;93(6):1246-58. doi: 10.1111/mmi.12735. PubMed PMID: 25069521; PMCID: PMC4160410.
180. Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. Mol Microbiol. 2015;96(6):1119-35. doi: 10.1111/mmi.12994. PubMed PMID: 25757804; PMCID: PMC4464964.
181. Freire MO, Devaraj A, Young A, Navarro JB, Downey JS, Chen C, Bakaletz LO, Zadeh HH, Goodman SD. A bacteriuml-biofilm-induced oral osteolytic infection can be successfully treated by immuno-targeting an extracellular nucleoid-associated protein. Mol Oral Microbiol. 2017;32(1):74-88. doi: 10.1111/omi.12155. PubMed PMID: 26931773; PMCID: PMC5010536.
182. Gustave JE, Jurcisek JA, McCoy KS, Goodman SD, Bakaletz LO.

Targeting bacterial integration host factor to disrupt biofilms associated with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2013;12(4):384-9. doi: 10.1016/j.jcf.2012.10.011. PubMed PMID: 23168017; PMCID: PMC3582735.

183. Novotny LA, Clements JD, Goodman SD, Bakaletz LO. Transcutaneous Immunization with a Band-Aid Prevents Experimental Otitis Media in a Polymicrobial Model. Clin Vaccine Immunol. 2017;24(6). doi: 10.1128/CVI.00563-16. PubMed PMID: 28381402; PMCID: PMC5461379.
184. Novotny LA, Jurcisek JA, Goodman SD, Bakaletz LO. Monoclonal antibodies against DNA-binding tips of DNABII proteins disrupt biofilms *in vitro* and induce bacterial clearance *in vivo*. EBioMedicine. 2016;10:33-44. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.022. PubMed PMID: 27342872; PMCID: PMC5006588.
185. Rocco CJ, Davey ME, Bakaletz LO, Goodman SD. Natural antigenic differences in the functionally equivalent extracellular DNABII proteins of bacterial biofilms provide a means for targeted biofilm therapeutics. Mol Oral Microbiol. 2017;32(2):118-30. doi: 10.1111/omi.12157. PubMed PMID: 26988714; PMCID: PMC5023461.
186. Novotny LA, Amer AO, Brockson ME, Goodman SD, Bakaletz LO. Structural stability of Burkholderia cenocepacia biofilms is reliant on eDNA structure and presence of a bacteriuml nucleic acid binding protein. PLoS One. 2013;8(6):e67629. doi: 10.1371/journal.pone.0067629. PubMed PMID: 23799151; PMCID: PMC3682984.
187. Baelo A, Levato R, Julian E, Crespo A, Astola J, Gavalda J, Engel E, Mateos-Timoneda MA, Torrents E. Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. J Control Release. 2015;209:150-8. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.028. PubMed PMID: 25913364.

188. Brown HL, Hanman K, Reuter M, Betts RP, van Vliet AH. Campylobacter jejuni biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment. Front Microbiol. 2015;6:699. doi: 10.3389/fmicb.2015.00699. PubMed PMID: 26217328; PMCID: PMC4498105.

189. Frederiksen B, Pressler T, Hansen A, Koch C, Hoiby N. Effect of aerosolized rhDNase (Pulmozyme) on pulmonary colonization in patients with cystic fibrosis. Acta Paediatr. 2006;95(9):1070-4. doi: 10.1080/08035250600752466. PubMed PMID: 16938752.

190. Martins M, Henriques M, Lopez-Ribot JL, Oliveira R. Addition of DNase improves the *in vitro* activity of antifungal drugs against Candida albicans biofilms. Mycoses. 2012;55(1):80-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x. PubMed PMID: 21668524; PMCID: PMC3175262.

191. Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, Tjokro N, Li B, Justice SS, Bakaletz LO. Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. Mucosal Immunol. 2011;4(6):625-37. doi: 10.1038/mi.2011.27. PubMed PMID: 21716265.

192. Cho C, Chande A, Gakhar L, Bakaletz LO, Jurcisek JA, Ketterer M, Shao J, Gotoh K, Foster E, Hunt J, O'Brien E, Apicella MA. Role of the nuclease of nontypeable Haemophilus influenzae in dispersal of organisms from biofilms. Infect Immun. 2015;83(3):950-7. doi: 10.1128/IAI.02601-14. PubMed PMID: 25547799; PMCID: PMC4333478.

193. Kiedrowski MR, Kavanaugh JS, Malone CL, Mootz JM, Voyich JM, Smeltzer MS, Bayles KW, Horswill AR. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS One. 2011;6(11):e26714. doi: 10.1371/journal.pone.0026714. PubMed PMID: 22096493; PMCID: PMC3214024.

194. Liu J, Sun L, Liu W, Guo L, Liu Z, Wei X, Ling J. A Nuclease from Streptococcus mutans Facilitates Biofilm Dispersal and Escape from Killing by Neutrophil Extracellular Traps. Front Cell Infect Microbiol. 2017;7:97. doi: 10.3389/fcimb.2017.00097. PubMed PMID: 28401067; PMCID: PMC5368189.

195. Steichen CT, Cho C, Shao JQ, Apicella MA. The Neisseria gonorrhoeae biofilm matrix contains DNA, and an endogenous nuclease controls its incorporation. Infect Immun. 2011;79(4):1504-11. doi: 10.1128/IAI.01162-10. PubMed PMID: 21300774; PMCID: PMC3067525.

196. Hall-Stoodley L, Nistico L, Sambanthamoorthy K, Dice B, Nguyen D, Mershon WJ, Johnson C, Hu FZ, Stoodley P, Ehrlich GD, Post JC. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in Streptococcus pneumoniae clinical isolates. BMC Microbiol. 2008;8:173. doi: 10.1186/1471-2180-8-173. PubMed PMID: 18842140; PMCID: PMC2600794.

197. Izano EA, Shah SM, Kaplan JB. Intercellular adhesion and biocide resistance in nontypeable Haemophilus influenzae biofilms. Microb Pathog. 2009;46(4):207-13. doi: 10.1016/j.micpath.2009.01.004. PubMed PMID: 19490830; PMCID: PMC2691864.

198. Kaplan JB, LoVetri K, Cardona ST, Madhyastha S, Sadovskaya I, Jabbouri S, Izano EA. Recombinant human DNase I decreases biofilm and increases antimicrobial susceptibility in staphylococci. J Antibiot (Tokyo). 2012;65(2):73-7. doi: 10.1038/ja.2011.113. PubMed PMID: 22167157; PMCID: PMC3288126.

199. Tetz VV, Tetz GV. Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. DNA Cell Biol. 2010;29(8):399-405. doi: 10.1089/dna.2009.1011. PubMed PMID: 20491577.

200. Wang G, Vasquez KM. Z-DNA, an active element in the genome. Front Biosci. 2007;12:4424-38. PubMed PMID: 17485386.

201. Barraud P, Allain FH. ADAR proteins: double-stranded RNA and Z-DNA binding domains. Curr Top Microbiol Immunol. 2012;353:35-60. doi: 10.1007/82_2011_145. PubMed PMID: 21728134; PMCID: PMC3226063.
202. Choi J, Majima T. Conformational changes of non-B DNA. Chem Soc Rev. 2011;40(12):5893-909. doi: 10.1039/c1cs15153c. PubMed PMID: 21901191.
203. Yang L, Wang S, Tian T, Zhou X. Advancements in Z-DNA: development of inducers and stabilizers for B to Z transition. Curr Med Chem. 2012;19(4):557-68. PubMed PMID: 22204344.
204. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines. IUBMB Life. 2006;58(2):75-82. doi: 10.1080/15216540600662525. PubMed PMID: 16608821.
205. Balasundaram D, Tyagi AK. Polyamine--DNA nexus: structural ramifications and biological implications. Mol Cell Biochem. 1991;100(2):129-40. PubMed PMID: 2008175.
206. Thomas TJ, Gunnia UB, Thomas T. Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)n insert. J Biol Chem. 1991;266(10):6137-41. PubMed PMID: 1848849.
207. Kim SK, Eriksson S, Norden B. Z-->B transition in poly[d(G-m5C)2] induced by interaction with 4',6-diamidino-2-phenylindole. Biopolymers. 1993;33(11):1677-86. doi: 10.1002/bip.360331105. PubMed PMID: 8241427.
208. Mirau PA, Kearns DR. The effect of intercalating drugs on the kinetics of the B to Z transition of poly(dG-dC). Nucleic Acids Res. 1983;11(6):1931-41. PubMed PMID: 6835844; PMCID: PMC325847.
209. Waga S, Mizuno S, Yoshida M. Nonhistone protein HMG1 removes the transcriptional block caused by left-handed Z-form segment in a supercoiled DNA. Biochem Biophys Res Commun. 1988;153(1):334-9. PubMed PMID: 3377790.

210. Pasini A, Caldarera CM, Giordano E. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs. Amino Acids. 2014;46(3):595-603. doi: 10.1007/s00726-013-1550-9. PubMed PMID: 23836422.
211. Baeza I, Ibanez M, Wong C, Chavez P, Gariglio P, Oro J. Possible prebiotic significance of polyamines in the condensation, protection, encapsulation, and biological properties of DNA. Orig Life Evol Biosph. 1991;21(4):225-42. PubMed PMID: 1668678.
212. D'Agostino L, di Pietro M, Di Luccia A. Nuclear aggregates of polyamines are supramolecular structures that play a crucial role in genomic DNA protection and conformation. FEBS J. 2005;272(15):3777-87. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.04782.x. PubMed PMID: 16045750.
213. Nayvelt I, Hyvonen MT, Alhonen L, Pandya I, Thomas T, Khomutov AR, Vepsalainen J, Patel R, Keinanen TA, Thomas TJ. DNA condensation by chiral alpha-methylated polyamine analogues and protection of cellular DNA from oxidative damage. Biomacromolecules. 2010;11(1):97-105. doi: 10.1021/bm900958c. PubMed PMID: 19919070.
214. Duell BL, Su YC, Riesbeck K. Host-pathogen interactions of nontypeable Haemophilus influenzae: from commensal to pathogen. FEBS Lett. 2016;590(21):3840-53. doi: 10.1002/1873-3468.12351. PubMed PMID: 27508518.
215. Blango MG, Mulvey MA. Persistence of uropathogenic Escherichia coli in the face of multiple antibiotics. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(5):1855-63. doi: 10.1128/AAC.00014-10. PubMed PMID: 20231390; PMCID: PMC2863638.
216. Jang YJ, Lee C, Kim SK. Formation of Poly[d(A-T)2] Specific Z-DNA by a Cationic Porphyrin. Sci Rep. 2015;5:9943. doi: 10.1038/srep09943. PubMed PMID: 25943171; PMCID: PMC4421867.

REIVINDICAÇÕES

1. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, **caracterizado** por que compreende contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

2. **Método Para Tratar Biofilme em Sujeito**, **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito infectado um biofilme de uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

3. **Método Para Prevenir Formação de Biofilme em Sujeito Suscetível a Desenvolver Biofilme**, **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, opcionalmente em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

4. **Método Para Tratar Infecção Causada por Bactéria que Produz Biofilme em Sujeito em Necessidade do Mesmo**, sendo o método **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo, opcionalmente em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

5. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, **caracterizado** por que compreende contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento

ou um equivalente dos mesmos.

6. **Método Para Tratar Biofilme em Sujeito**, **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

7. **Método Para Prevenir Formação de Biofilme em Sujeito Suscetível a Desenvolver Biofilme**, **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, opcionalmente em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

8. **Método Para Tratar Infecção Causada por Bactéria que Produz Biofilme em Sujeito em Necessidade do Mesmo**, sendo o método **caracterizado** por que compreende administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme e um agente que inibe a replicação do organismo, opcionalmente em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

9. **Método**, de acordo com a Reivindicação 1 ou 5, **caracterizado** por que o contato é *in vitro* ou *in vivo*.

10. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1, 5 ou 9, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme é um tRNA.

11. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado** por que o agente é um inibidor da síntese de poliamina ou um agente que inibe a ligação da poliamina ao DNA, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente

dos mesmos.

12. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado** por que a poliamina é selecionada a partir do grupo de: putrescina, espermina, cadaverina, 1,3-diaminopropano ou espermidina.

13. **Método**, de acordo com a Reivindicação 11, **caracterizado** por que o agente compreende um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclohexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis [guanilhidrazona] (MGBG), 1-aminooxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina, diciclohexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos ou um sal dos mesmos.

14. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 9, **caracterizado** por que o agente compreende um agente que esgota cátions do biofilme, opcionalmente uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, uma coroa-aza ou uma cripta.

15. **Método**, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme é do grupo de: sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, fosfocelulose P11, sulfato de heparina ou um derivado ou análogo do mesmo.

16. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, compreendendo o contato do biofilme *in vitro* com um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, **caracterizado** por que o contato compreende o revestimento de uma superfície com uma quantidade eficaz de agente que esgota os cátions, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

17. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, compreendendo o contato do biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de um agente que

interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, **caracterizado** por que o contato compreende o revestimento de uma superfície com uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que esgotam cátions, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

18. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 9 ou 16 ou 17, **caracterizado** por que o agente que interfere com a conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local.

19. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 16 a 18, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

20. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 16 a 18, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos.

21. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 16 a 18, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

22. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, compreendendo o contato do biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, **caracterizado** por que o contato compreende o revestimento de uma superfície com uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

23. **Método Para Inibir Estabilidade de Biofilme**, compreendendo o contato do biofilme *in vitro* com uma quantidade eficaz de cloroquina e

anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo, **caracterizado** por que o contato compreende o revestimento de uma superfície com uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

24. **Método Para Tratar Biofilme em Paciente que Sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF)**, **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos.

25. **Método Para Tratar Biofilme em Paciente que Sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF)**, **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos.

26. **Método**, de acordo com a Reivindicação 22 ou 25, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

27. **Método**, de acordo com a Reivindicação 22 ou 25, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

28. **Método**, de acordo com a Reivindicação 22 ou 25, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um dos mesmos.

29. **Método Para Tratar Biofilme em Paciente que Sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF)**, **caracterizado**

por que compreende administrar uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos.

30. **Método Para Tratar Biofilme em Paciente que Sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF)**, **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos.

31. **Método Para Tratar Infecção Produtora de Biofilme Incidente**, para administrar uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia, sendo o método **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos.

32. **Método Para Tratar Infecção Produtora de Biofilme Incidente**, para administrar uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia, sendo o método **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos.'

33. **Método**, de acordo com a Reivindicação 31 ou 32, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

34. **Método**, de acordo com a Reivindicação 31 ou 32, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

35. **Método**, de acordo com a Reivindicação 31 ou 32, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio,

bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos.

36. **Método Para Tratar Infecção Produtora de Biofilme Incidente**, para administração de uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia, sendo o método **caracterizado** por que compreende a administração de uma quantidade eficaz de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

37. **Método Para Tratar Infecção Produtora de Biofilme Incidente**, para administrar uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia, sendo o método **caracterizado** por que compreende administrar uma quantidade eficaz de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos.

38. **Método**, de acordo com a Reivindicação 1 ou 5, **caracterizado** por que compreende ainda contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano.

39. **Método**, de acordo com a Reivindicação 38, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU ou fragmentos de cada um dos mesmos.

40. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 2 a 39, **caracterizado** por que compreende ainda administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano.

41. **Método**, de acordo com a Reivindicação 40, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU ou fragmentos de cada um dos mesmos.

42. **Método**, de acordo com a Reivindicação 14 ou 15, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme tem uma carga líquida negativa.

43. **Método**, de acordo com a Reivindicação 14 ou 15, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme tem uma carga neutra.

44. **Método**, de acordo com a Reivindicação 38, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida negativa.

45. **Método**, de acordo com a Reivindicação 38, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida neutra.

46. **Método**, de acordo com a Reivindicação 38, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva.

47. **Método**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 46, **caracterizado** por que os métodos são realizados na ausência de administração de uma enzima DNAse.

48. **Composição**, **caracterizada** por que compreende um, dois ou três ou mais dos seguintes: um agente que interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme, um agente que esgota cátions do biofilme, um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z -DNA no biofilme ou em seu ambiente local, um agente que interfere na ligação do eDNA a

uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano.

49. **Composição**, de acordo com a Reivindicação 48, **caracterizada** por que compreende ainda um transportador farmaceuticamente aceitável.

50. **Composição**, de acordo com a Reivindicação 48 ou 49, **caracterizada** por que o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme compreende um ou mais dentre: um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclohexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis[guanilhidrazona] (MGBG), 1-aminooxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina e / ou diciclohexilamina, um derivado de qualquer um deles ou um sal deste.

51. **Composição**, de acordo com a Reivindicação 48 ou 49, **caracterizada** por que o agente que esgota cátions do biofilme compreende um ou mais de: uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, um coroa-aza ou uma cripta, sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, fosfocelulose P11 e/ou sulfato de heparina, ou um derivado ou análogo dos mesmos.

52. **Composição**, de acordo com a Reivindicação 48 ou 49, **caracterizada** por que o agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local compreende um ou mais de: proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos, um anti-B-DNA anticorpo ou fragmento ou derivado do mesmo, e/ou cloroquina, ou um derivado de qualquer um dos mesmos.

53. **Composição**, de acordo com a Reivindicação 48 ou 49, **caracterizada** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais dentre: um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU, ou fragmentos de cada um dos mesmos.

54. **Kit**, **caracterizado** por que compreende a composição conforme

definida em qualquer uma das Reivindicações de 48 a 53, e instruções de uso e, opcionalmente, em que os agentes são combinados ou embalados separadamente.

55. **Kit**, de acordo com a Reivindicação 54, **caracterizado** por que as instruções de uso fornecem instruções para conduzir o método conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 1 a 47.

56. **Uso de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para inibir estabilidade de biofilme.

57. **Uso de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em sujeito.

58. **Uso de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (opcionalmente exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para prevenir formação de biofilme em sujeito suscetível a desenvolver biofilme.

59. **Uso de um agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes e agente que inibe a replicação do organismo** (opcionalmente exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção causada por bactéria que produz biofilme em sujeito em necessidade do mesmo.

60. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou

um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para inibir estabilidade de biofilme.

61. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em sujeito.

62. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes** (opcionalmente exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para prevenir formação de biofilme em sujeito suscetível a desenvolver biofilme.

63. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes e um agente que inibe a replicação do organismo** (opcionalmente exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção causada por bactéria que produz biofilme em sujeito em necessidade do mesmo.

64. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 56 ou 60, **caracterizado** por que o contato é *in vitro* ou *in vivo*.

65. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações 56, 60 ou 64, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme é um tRNA.

66. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado** por que o agente é um inibidor da síntese de poliamina ou um agente que inibe a ligação da poliamina ao DNA, em que o agente deixa de ser uma proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos.

67. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações precedentes, **caracterizado** por que a poliamina é selecionada a partir do grupo de: putrescina, espermina, cadaverina, 1,3-diaminopropano ou espermidina.

68. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 66, **caracterizado** por que o agente compreende um análogo de poliamina difluorometilornitina, trans-4-metilciclohexilamina, sardomozida, metilglioxal-bis [guanilhidrazona] (MGBG), 1-aminooxi-3-aminopropano, oxaliplatina, cisplatina, diciclohexilamina, um derivado de qualquer um dos mesmos ou um sal dos mesmos.

69. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 56 a 64, **caracterizado** por que o agente compreende um agente que esgota cátions do biofilme, opcionalmente uma resina de troca catiônica, um ácido aminopolicarboxílico, um éter de coroa, uma coroa-aza ou uma cripta.

70. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 69, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme é do grupo de: sulfonato, sulfopropil, fosfocelulose, fosfocelulose P11, sulfato de heparina ou um derivado ou análogo do mesmo.

71. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 56 a 64, **caracterizado** por que o agente que interfere com a conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local.

72. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 71, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

73. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 71, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide

benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos.

74. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 71, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

75. **Uso de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em paciente que sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF).

76. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em paciente que sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF).

77. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local**, de acordo com a Reivindicação 76, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

78. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local**, de acordo com a Reivindicação 76, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

79. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local**, de acordo com a Reivindicação 76, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-

amino acridina ou um dos mesmos.

80. **Uso de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em paciente que sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF).

81. **Uso de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar biofilme em paciente que sofre de Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLE) e/ou Fibrose Cística (CF).

82. **Uso agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção produtora de biofilme incidente, administrando uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia.

83. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local** (exceto proteína HMGB1, fragmento ou um equivalente de cada um dos mesmos), **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção produtora de biofilme incidente, administrando uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia.

84. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local**, de acordo com a Reivindicação 82 ou 83, **caracterizado** por que o agente compreende cloroquina ou um derivado da mesma.

85. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-**

DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local, de acordo com a Reivindicação 82 ou 83, **caracterizado** por que o agente compreende um anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo.

86. **Uso de um ou mais agentes que interferem na conversão de B-DNA em Z-DNA no biofilme ou seu ambiente local**, de acordo com a Reivindicação 82 ou 83, **caracterizado** por que o agente compreende riboflavina, brometo de etídio, bis(metídio)espermina, daunorrubicina, TMPyP4, um alcalóide benzo[c]fenantridina quaternário, quinacrina, 9-amino acridina ou um derivado dos mesmos.

87. **Uso de proteína HMGB1 ou fragmento biologicamente ativo da mesma e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado do mesmo**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção produtora de biofilme incidente, administrando uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia.

88. **Uso de cloroquina e anticorpo anti-B-DNA ou fragmento ou derivado dos mesmos**, **caracterizado** por que é no fabrico de medicamentos para tratar infecção produtora de biofilme incidente, administrando uma quimioterapia à base de platina em um paciente que recebe ou que recebeu a quimioterapia.

89. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes**, de acordo com a Reivindicação 56 ou 60, **caracterizado** por que compreende ainda contatar o biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano.

90. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes**, de acordo com a Reivindicação 89, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA à

proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU ou fragmentos de cada um dos mesmos.

91. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 57 a 90, **caracterizado** por que compreende ainda administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA e/ou um agente antibacteriano.

92. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 91, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA à proteína de ligação ao DNA compreende um ou mais de um anticorpo anti-DNABII, um anticorpo anti-IHF e/ou um anticorpo anti-HU ou fragmentos de cada um dos mesmos.

93. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 69 ou 70, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme tem uma carga líquida negativa.

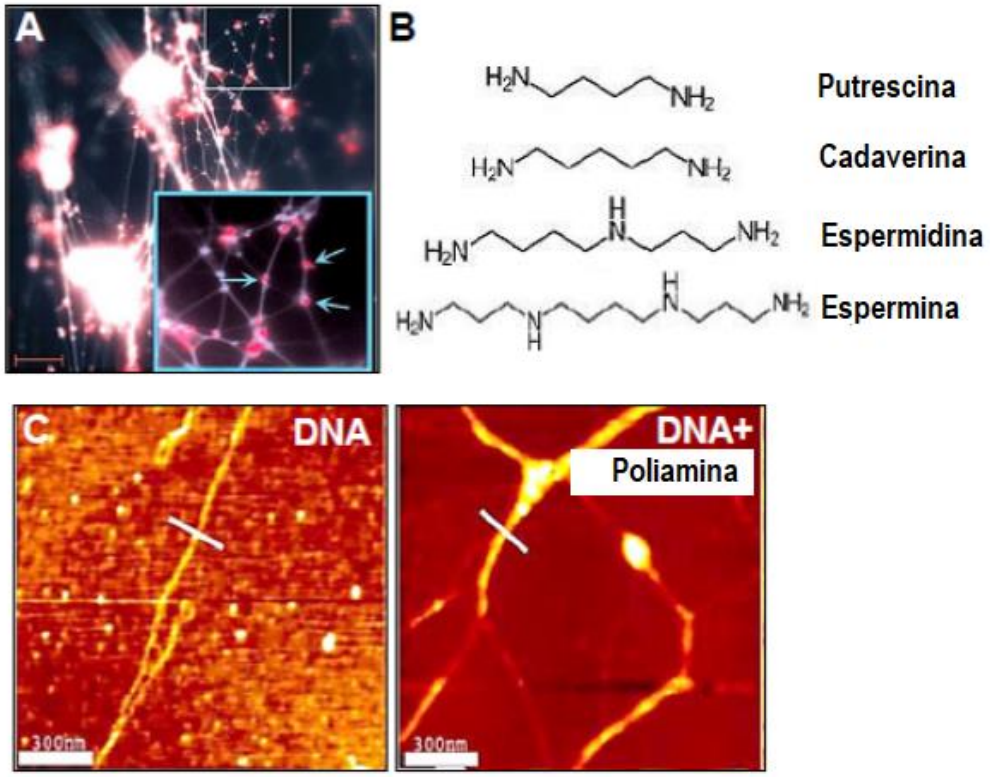
94. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com a Reivindicação 69 ou 70, **caracterizado** por que o agente que esgota cátions do biofilme tem uma carga neutra.

95. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes**, de acordo com a Reivindicação 89, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida negativa.

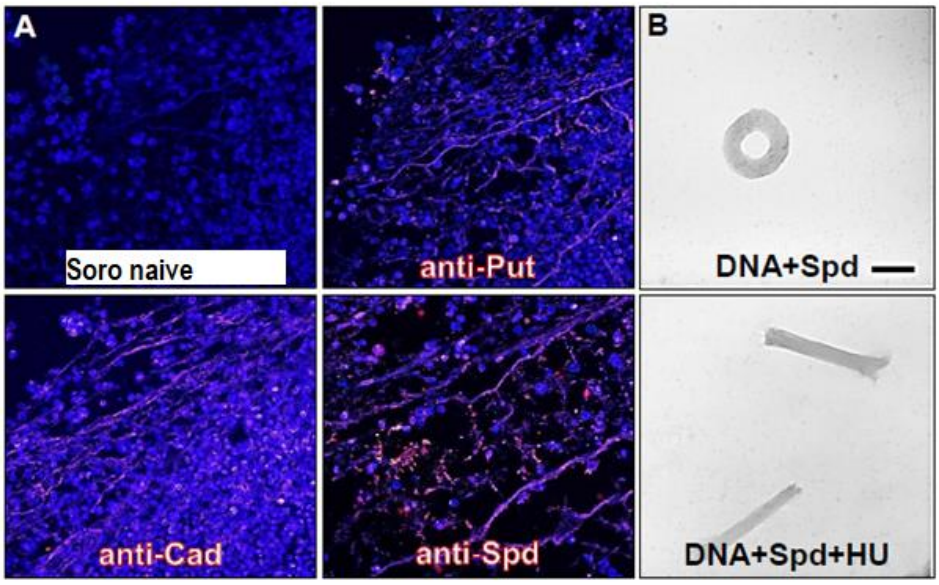
96. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes**, de acordo com a Reivindicação 89, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida neutra.

97. **Uso de um ou mais agentes que interferem na ligação de uma poliamina ao DNA de biofilmes**, de acordo com a Reivindicação 89, **caracterizado** por que o agente que interfere na ligação do eDNA a uma proteína de ligação ao DNA tem uma carga líquida positiva.

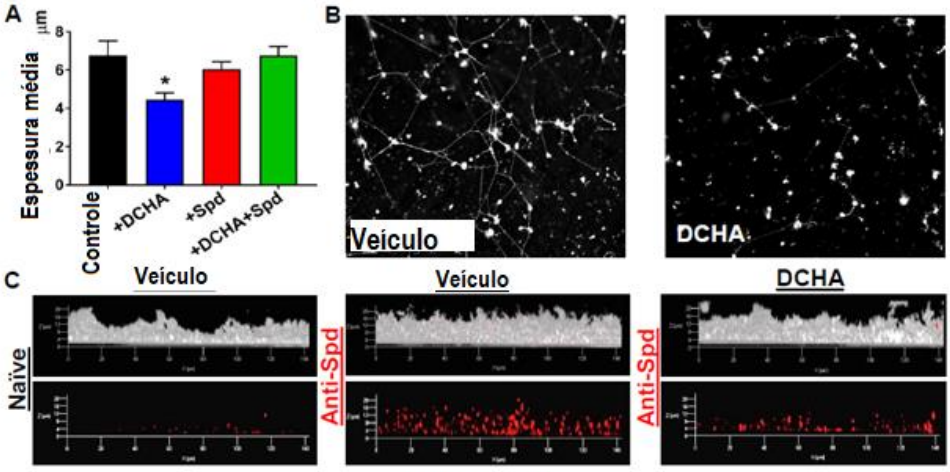
98. **Uso de um ou mais agentes**, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 56 a 97, **caracterizado** por que os métodos são realizados na ausência de administração de uma enzima DNAse.


A
B
Putrescina
Cadaverina
Espermidina
Espermina
C
DNA
300nm
DNA+
Poliamina
300nm

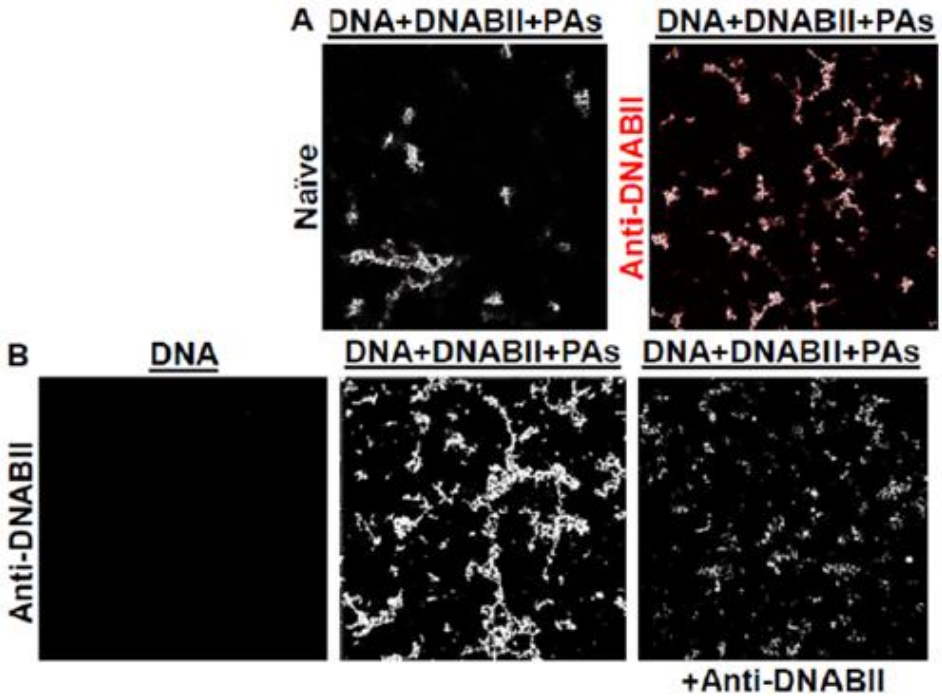
FIGS. 1A – 1C



FIGS. 2A – 2B



FIGS. 3A – 3C



FIGS. 4A – 4B

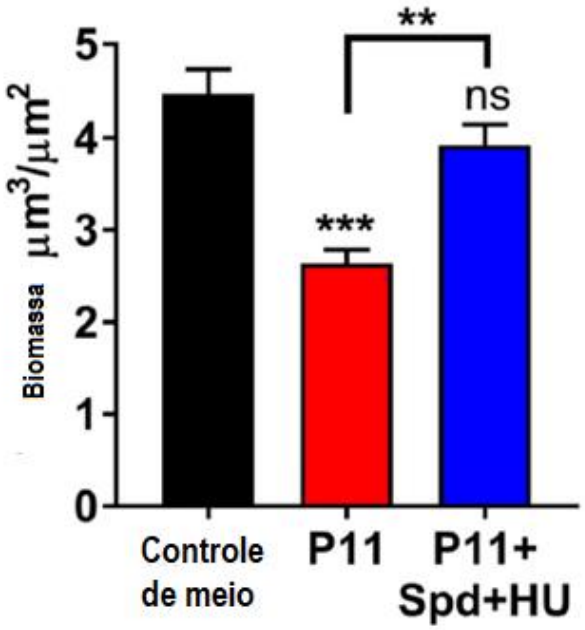


FIG. 5

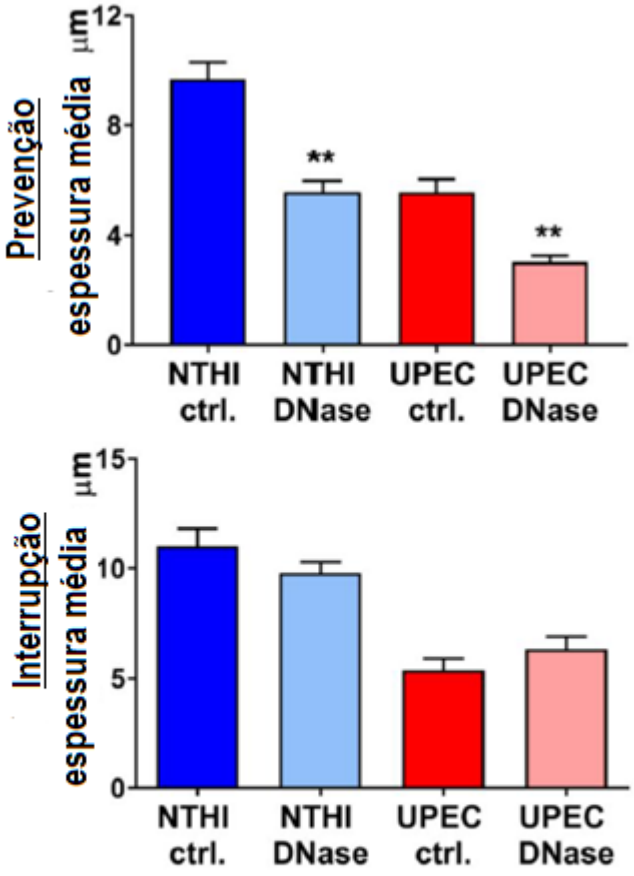
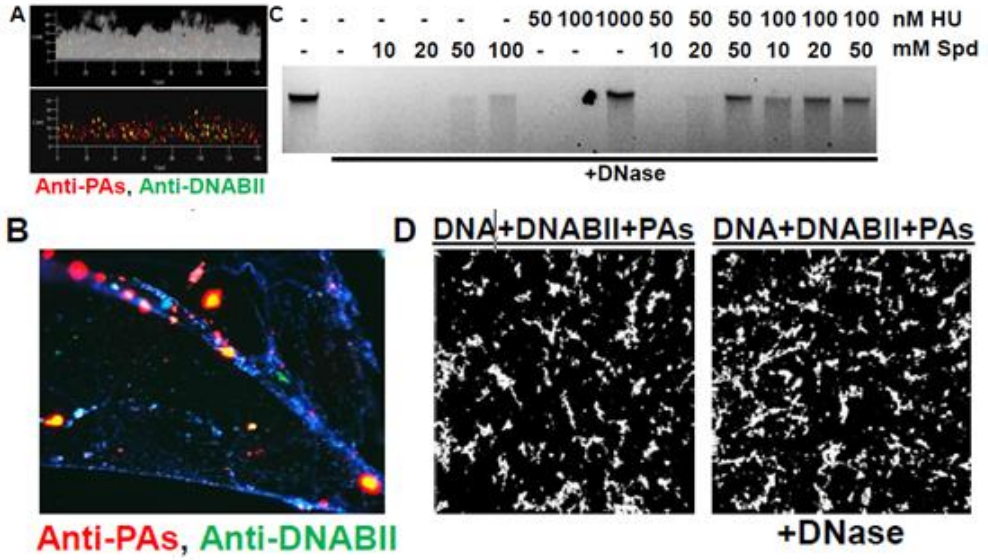
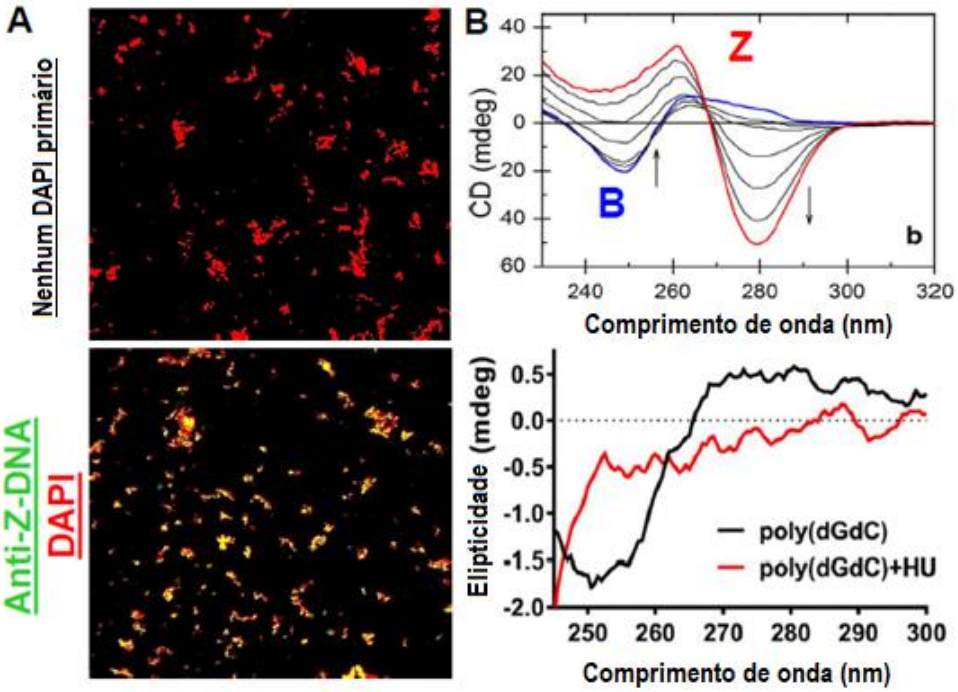

Prevenção
espessura média µm
12
8
4
0
**
**
NTHI ctrl.
NTHI DNase
UPEC ctrl.
UPEC DNase
Interrupção
espessura média µm
15
10
5
0
NTHI ctrl.
NTHI DNase
UPEC ctrl.
UPEC DNase

FIG. 6


A
Anti-PAs, Anti-DNABII
C
- - - - - - 50 100 1000 50 50 50 100 100 100 nM HU
- - 10 20 50 100 - - - 10 20 50 10 20 50 mM Spd
+DNase
B
Anti-PAs, Anti-DNABII
D
DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
+DNase

FIGS. 7A – 7D


A
Nenhum DAPI primário
Anti-Z-DNA
DAPI
B
Z
B
b
CD (mdeg)
Comprimento de onda (nm)
Elipticidade (mdeg)
poly(dGdC)
poly(dGdC)+HU
Comprimento de onda (nm)

FIGS. 8A – 8B

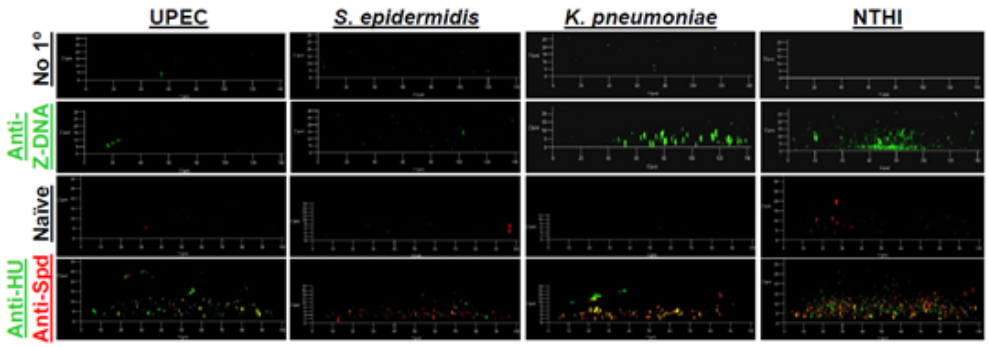


FIG. 9

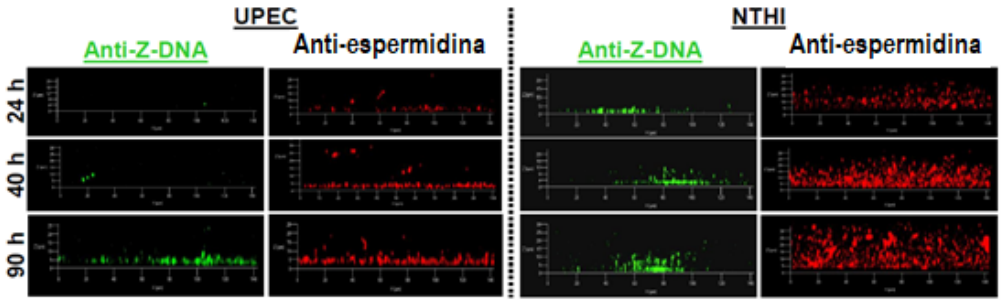


FIG. 10

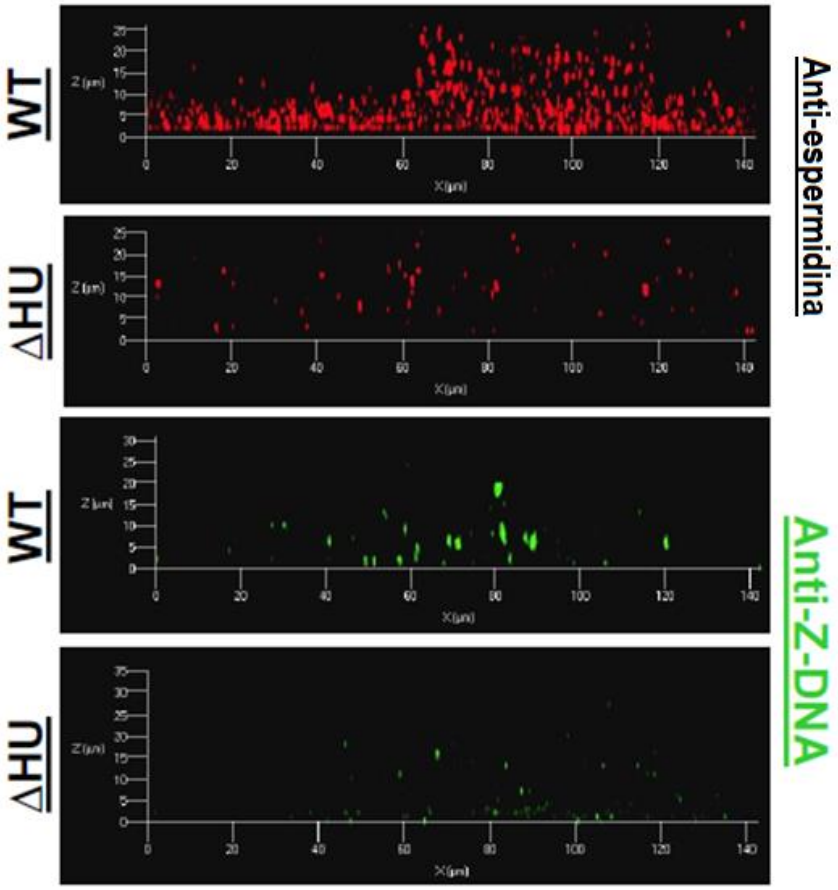
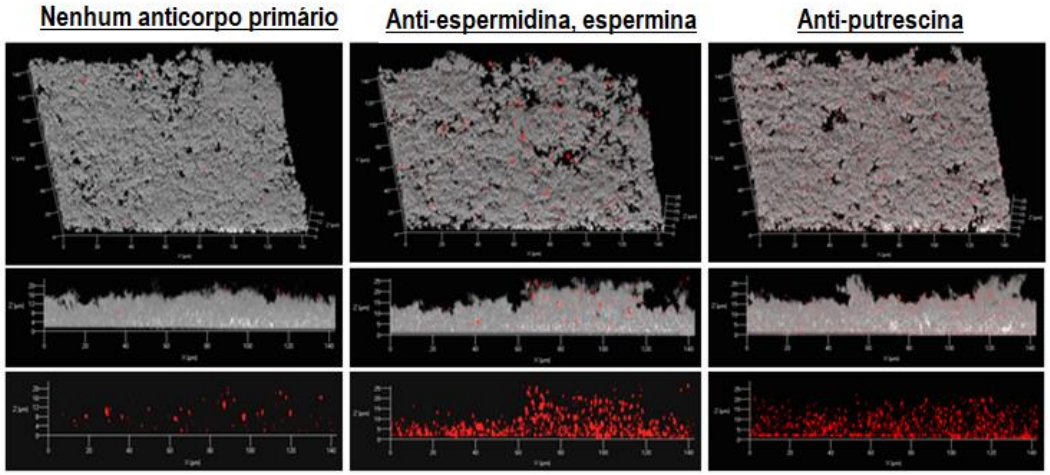

WT
ΔHU
WT
ΔHU
Anti-espermidina
Anti-Z-DNA

FIG. 11


Nenhum anticorpo primário
Anti-espermidina, espermina
Anti-putrescina

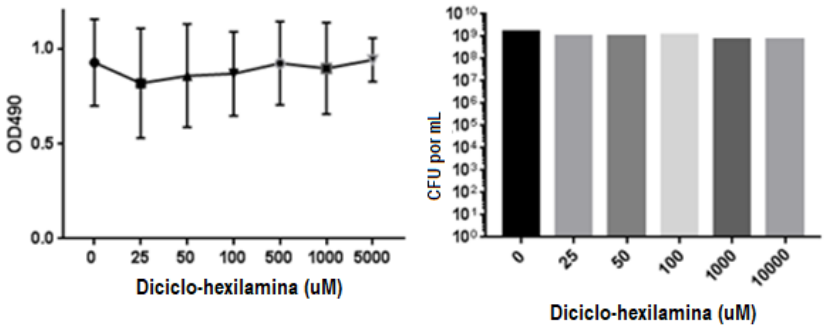

OD490
1.0
0.5
0.0
0
25
50
100
500
1000
5000
Diciclo-hexilamina (uM)
CFU por mL
0
25
50
100
1000
10000
Diciclo-hexilamina (uM)

FIG. 13

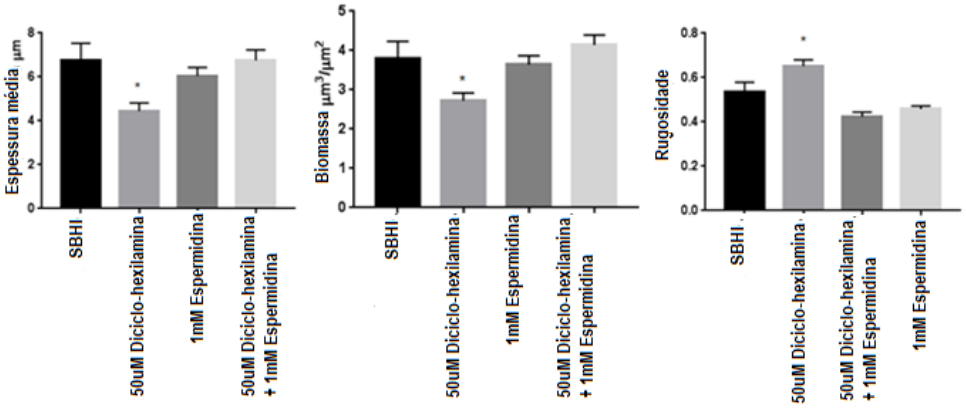

Espessura média µm
Biomassa µm³/µm²
Rugosidade
SBHI
50uM Diciclo-hexilamina
1mM Espermidina
50uM Diciclo-hexilamina + 1mM Espermidina

FIG. 14

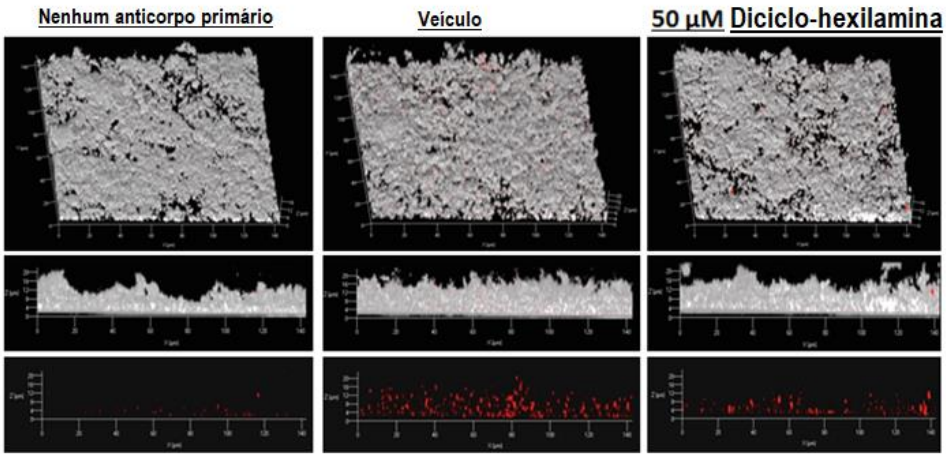

Nenhum anticorpo primário
Veículo
50 µM Diciclo-hexilamina

FIG. 15

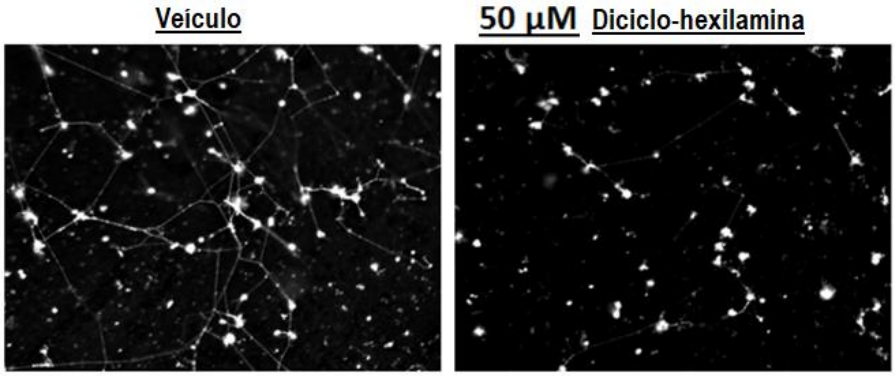
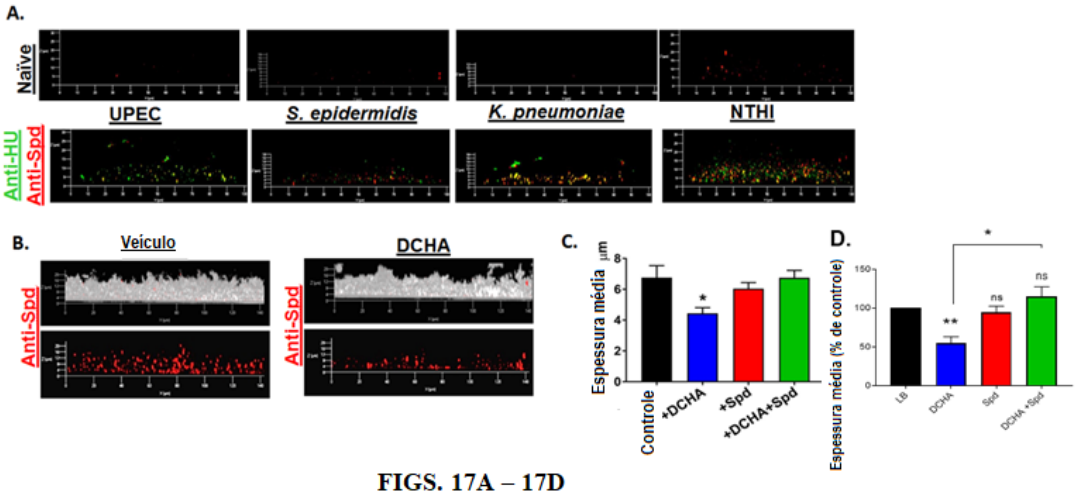
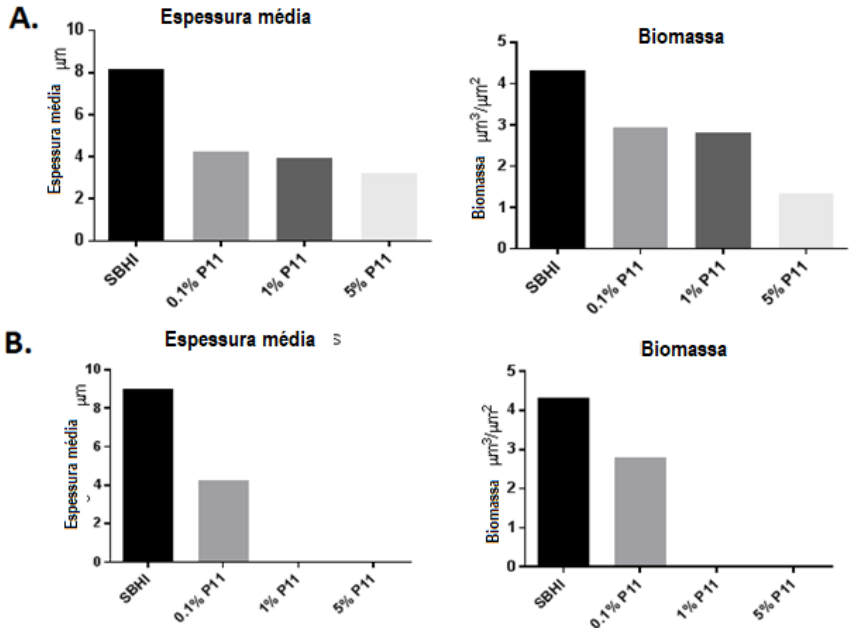

Veículo
50 µM Diciclo-hexilamina

FIG. 16



FIGS. 17A – 17D



FIGS. 18A – 18B

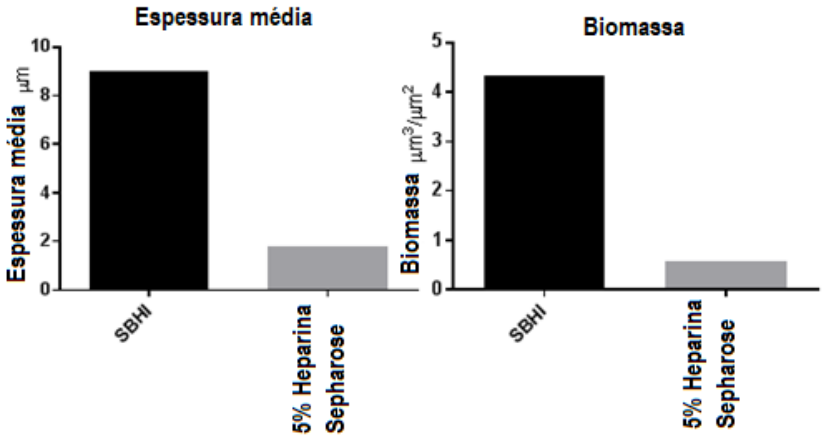

Espessura média
Espessura média µm
10
8
6
4
2
0
SBHI
5% Heparina Sepharose
Biomassa
Biomassa µm³/µm²
5
4
3
2
1
0
SBHI
5% Heparina Sepharose

FIG. 19

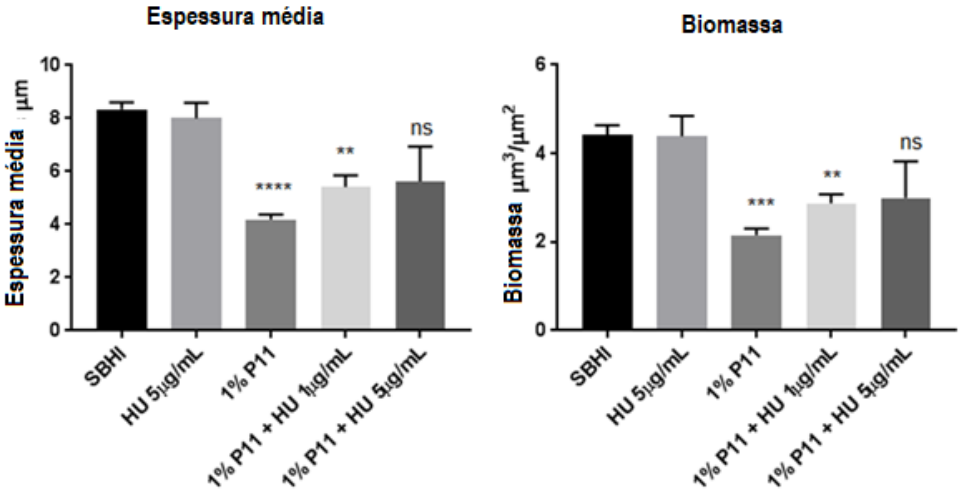

Espessura média
Espessura média µm
10
8
6
4
2
0
****
**
ns
SBHI
HU 5µg/mL
1% P11
1% P11 + HU 1µg/mL
1% P11 + HU 5µg/mL
Biomassa
Biomassa µm³/µm²
6
4
2
0
***
**
ns
SBHI
HU 5µg/mL
1% P11
1% P11 + HU 1µg/mL
1% P11 + HU 5µg/mL

FIG. 20

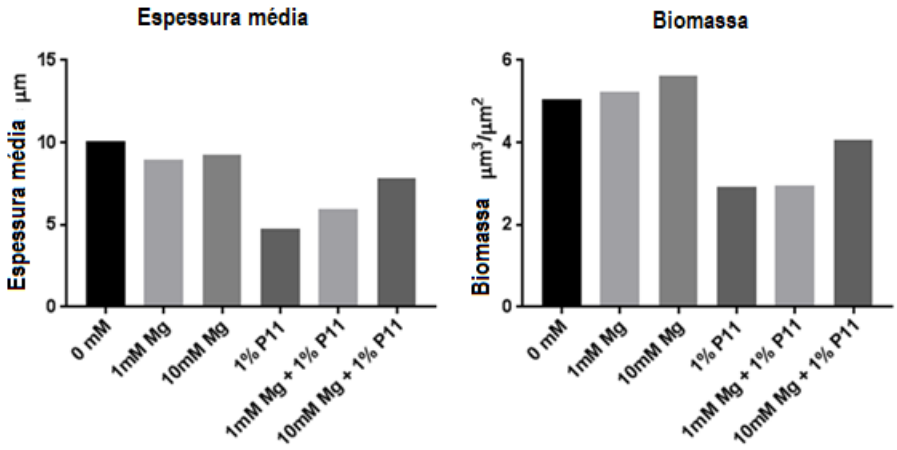

Espessura média
Espessura média µm
15
10
5
0
0 mM
1mM Mg
10mM Mg
1% P11
1mM Mg + 1% P11
10mM Mg + 1% P11
Biomassa
Biomassa µm³/µm²
6
4
2
0
0 mM
1mM Mg
10mM Mg
1% P11
1mM Mg + 1% P11
10mM Mg + 1% P11

FIG. 21

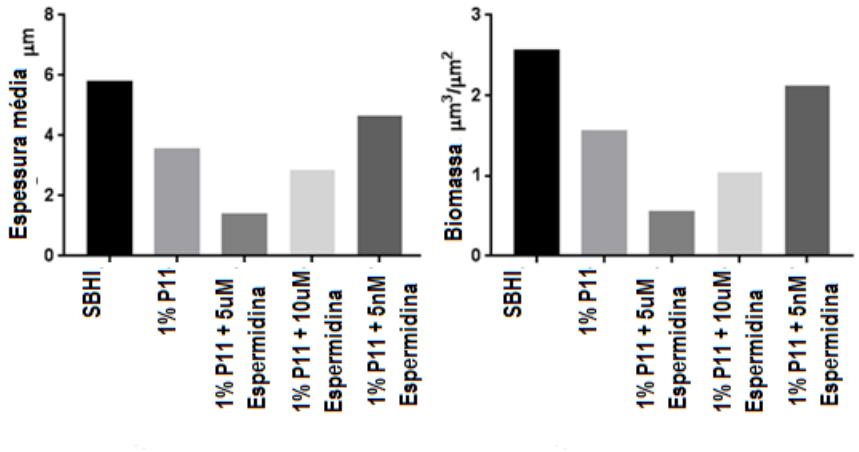

Espessura média µm
8
6
4
2
0
SBHI
1% P11
1% P11 + 5uM Espermidina
1% P11 + 10uM Espermidina
1% P11 + 5nM Espermidina
Biomassa µm³/µm²
3
2
1
0
SBHI
1% P11
1% P11 + 5uM Espermidina
1% P11 + 10uM Espermidina
1% P11 + 5nM Espermidina

FIG. 22

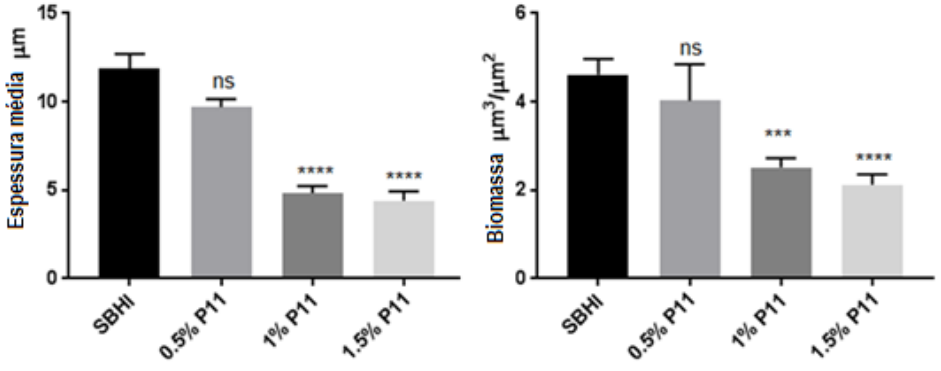

Espessura média µm
15
10
5
0
ns
****
****
SBHI
0.5% P11
1% P11
1.5% P11
Biomassa µm³/µm²
6
4
2
0
ns
***
****
SBHI
0.5% P11
1% P11
1.5% P11

FIG. 23

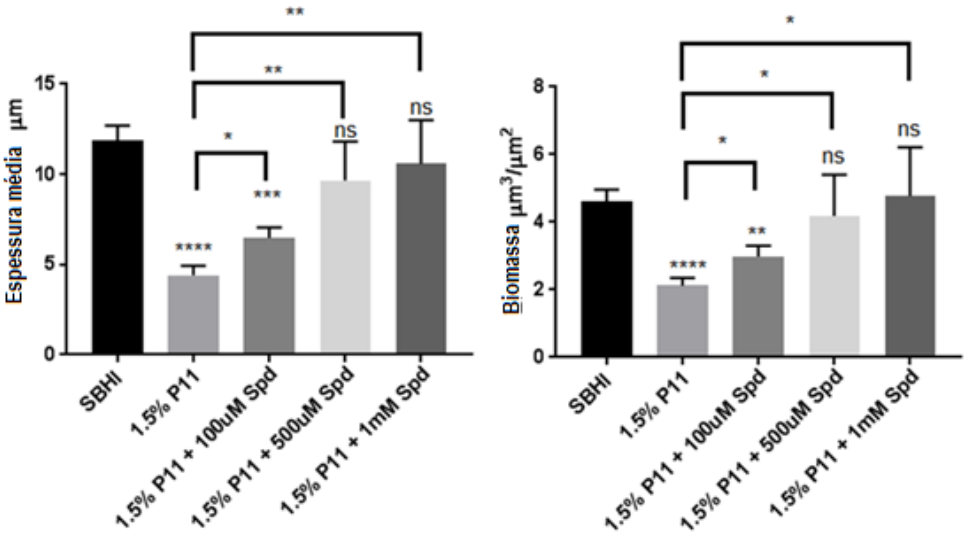

Espessura média µm
15
10
5
0
**
**
*
***
ns
ns
****
SBHI
1.5% P11
1.5% P11 + 100uM Spd
1.5% P11 + 500uM Spd
1.5% P11 + 1mM Spd
Biomassa µm³/µm²
8
6
4
2
0
*
*
*
**
ns
ns
****
SBHI
1.5% P11
1.5% P11 + 100uM Spd
1.5% P11 + 500uM Spd
1.5% P11 + 1mM Spd

FIG. 24

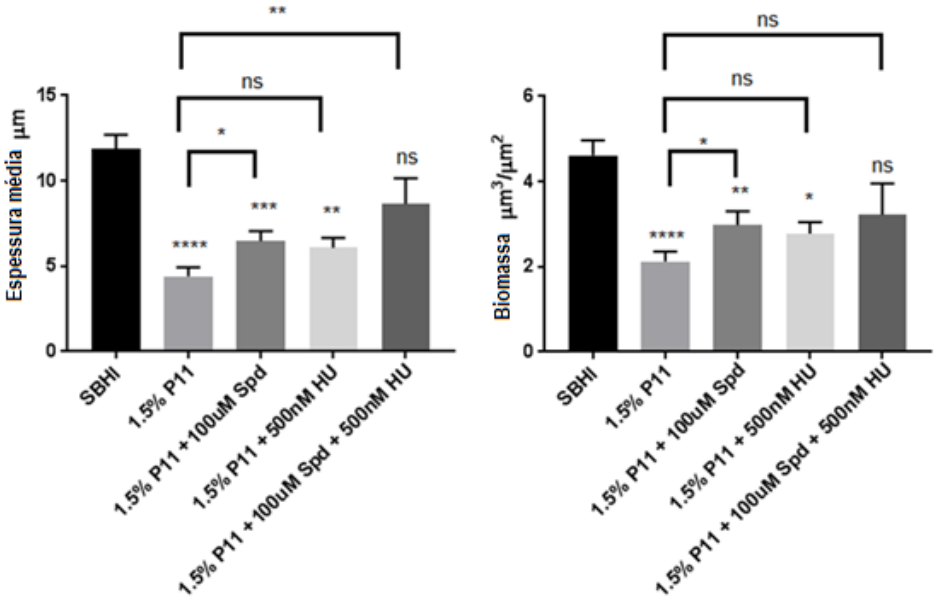
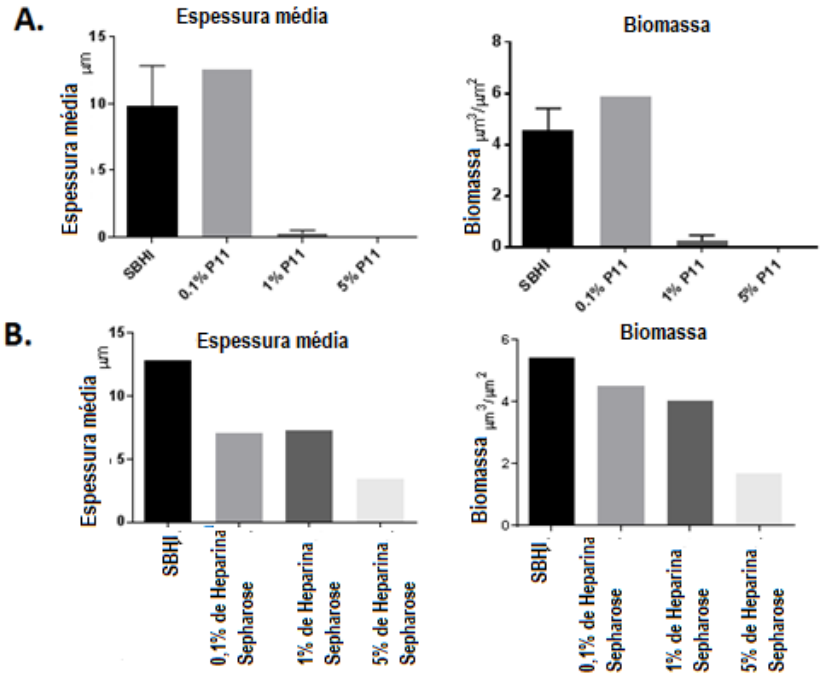


FIG. 25



FIGS. 26A – 26B

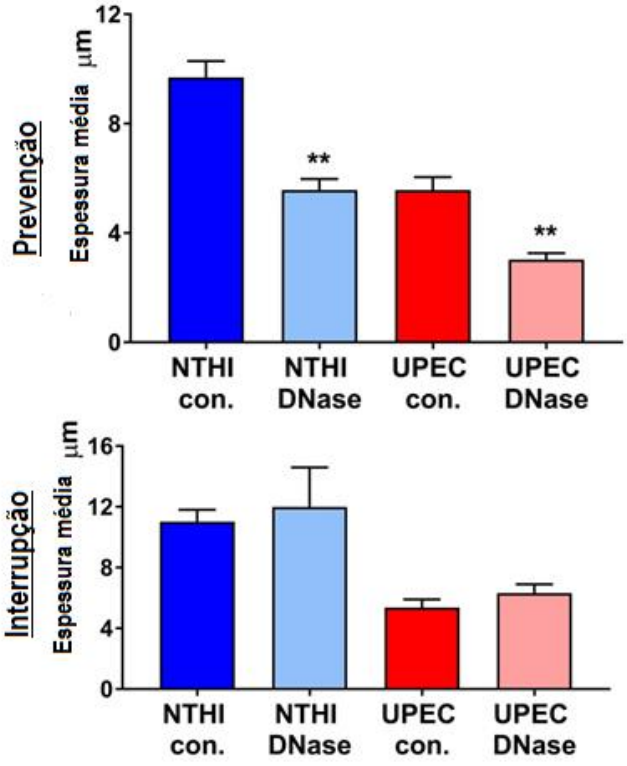

Prevenção
Espessura média μm
12
8
4
0
**
**
NTHI con.
NTHI DNase
UPEC con.
UPEC DNase
Interrupção
Espessura média μm
16
12
8
4
0
NTHI con.
NTHI DNase
UPEC con.
UPEC DNase

FIG. 27

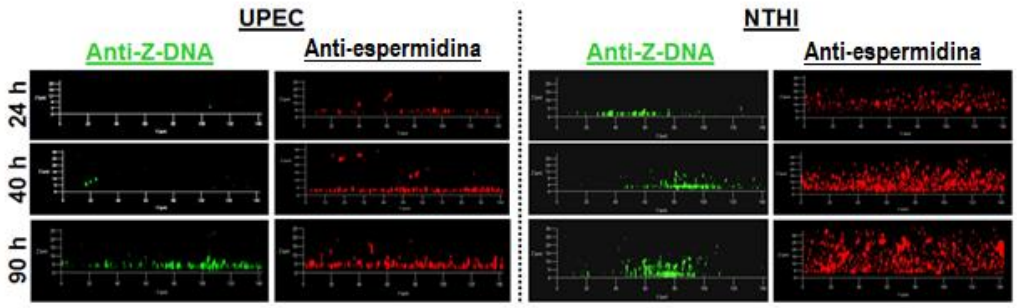

UPEC
NTHI
Anti-Z-DNA
Anti-espermidina
Anti-Z-DNA
Anti-espermidina
24 h
40 h
90 h

FIG. 28

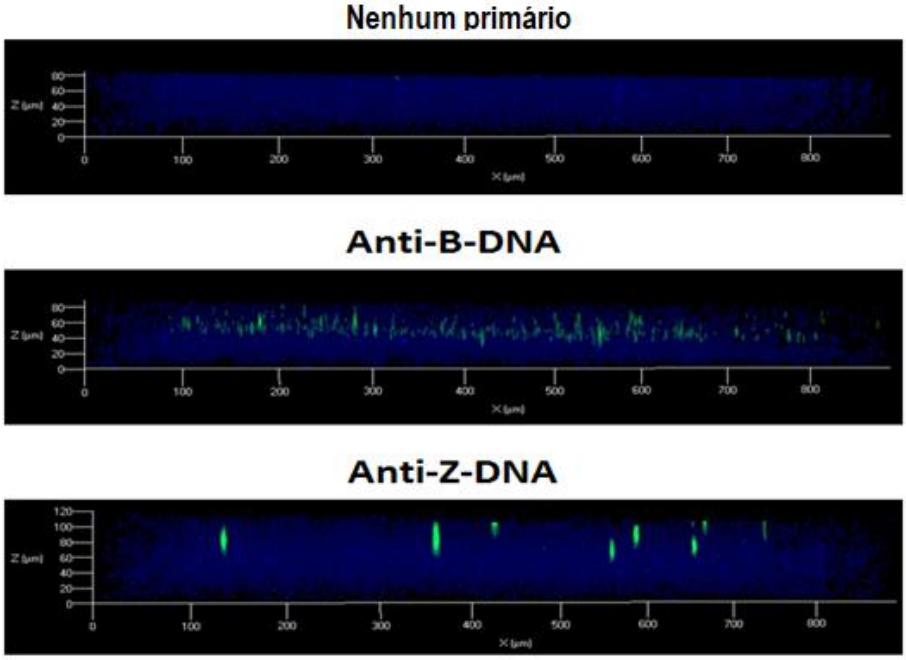

Nenhum primário
Anti-B-DNA
Anti-Z-DNA

FIG. 29

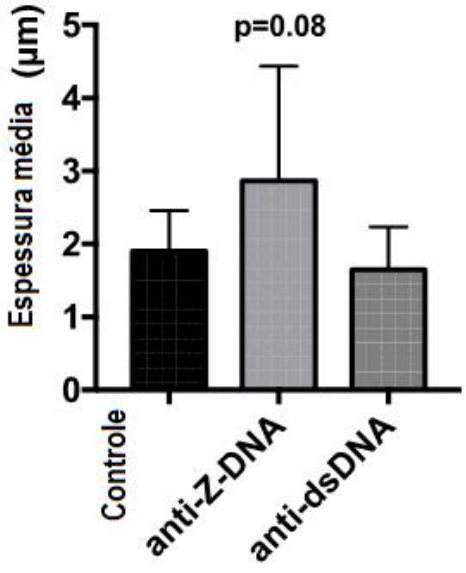

p=0.08
Espessura média (µm)
0
1
2
3
4
5
Controle
anti-Z-DNA
anti-dsDNA

FIG. 30

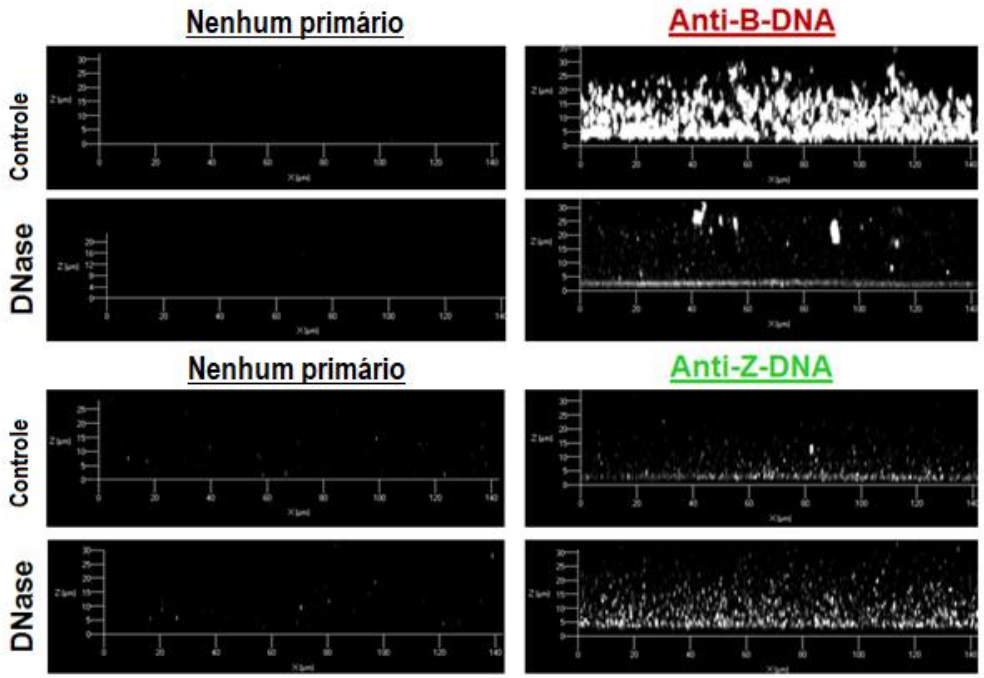

Nenhum primário
Anti-B-DNA
Controle
DNase
Nenhum primário
Anti-Z-DNA
Controle
DNase

FIG. 31

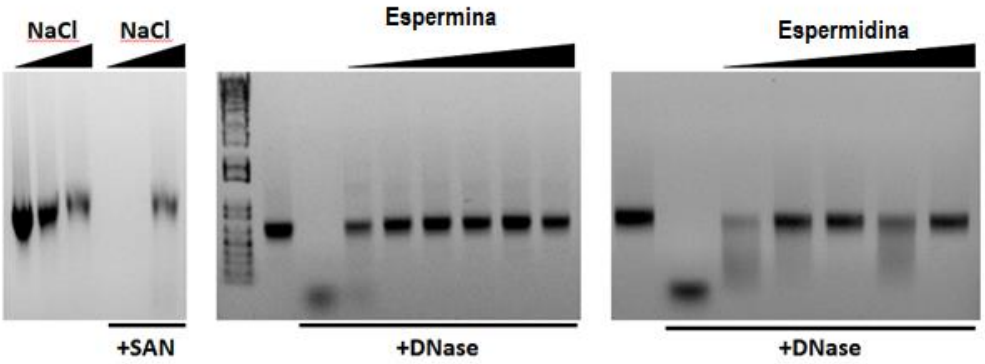

NaCl
NaCl
Espermina
Espermidina
+SAN
+DNase
+DNase

FIG. 32

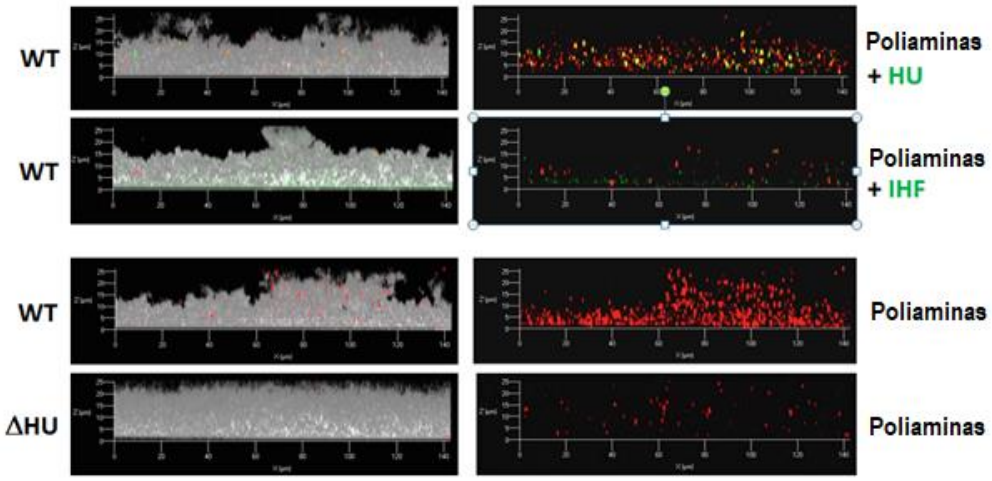
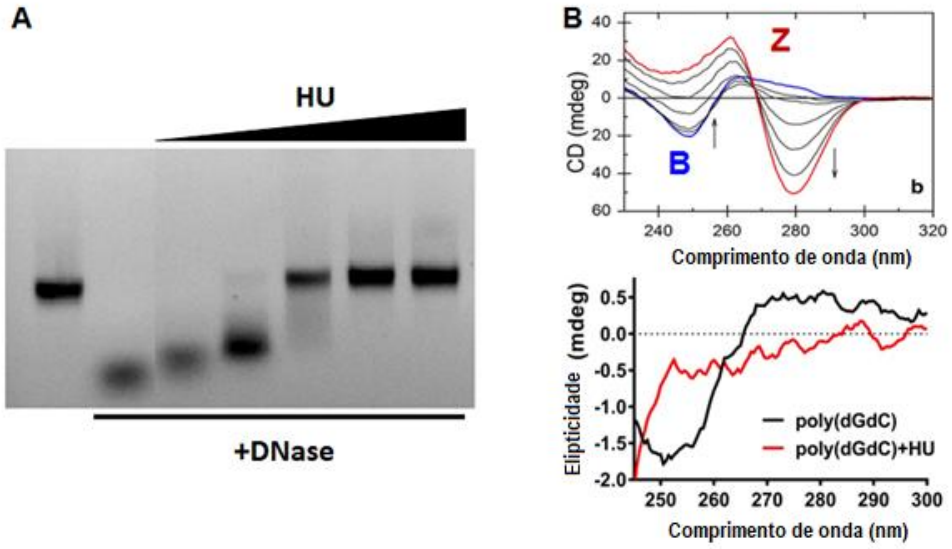
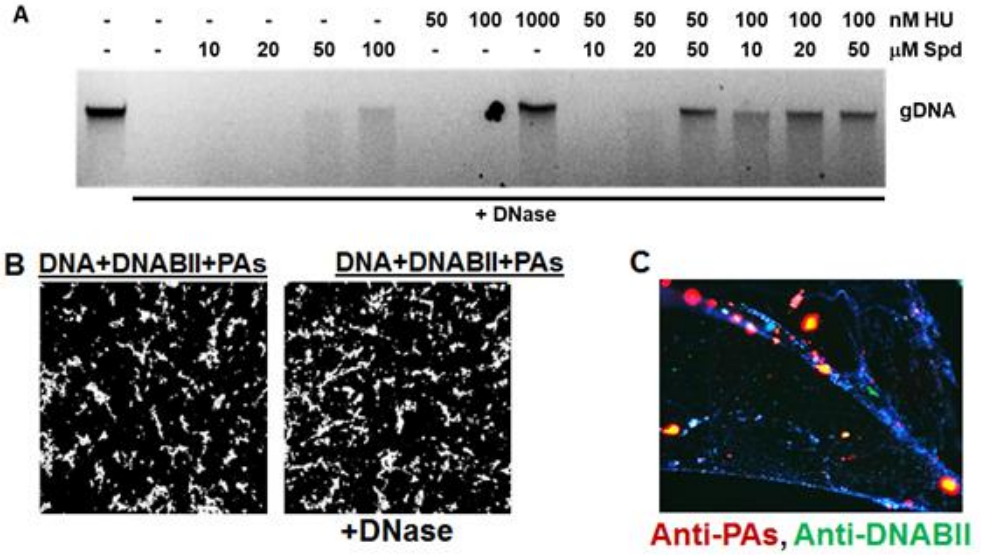


FIG. 33



FIGS. 34A – 34 B


A
- - - - - - 50 100 1000 50 50 50 100 100 100 nM HU
- - 10 20 50 100 - - - 10 20 50 10 20 50 µM Spd
gDNA
+ DNase
B DNA+DNABII+PAs
DNA+DNABII+PAs
+DNase
C
Anti-PAs, Anti-DNABII

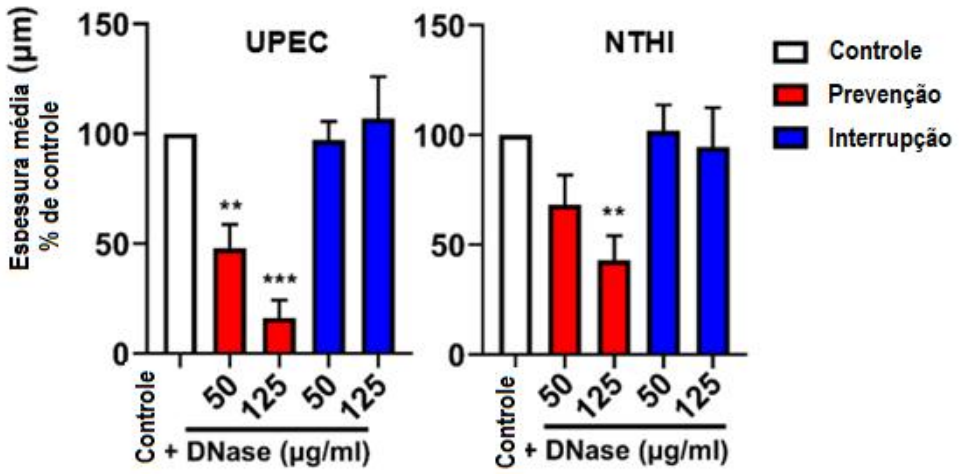

Espessura média (µm)
% de controle
150
100
50
0
UPEC
NTHI
**
***
**
Controle
50
125
50
125
+ DNase (µg/ml)
Controle
Prevenção
Interrupção

FIG. 35A– 35D

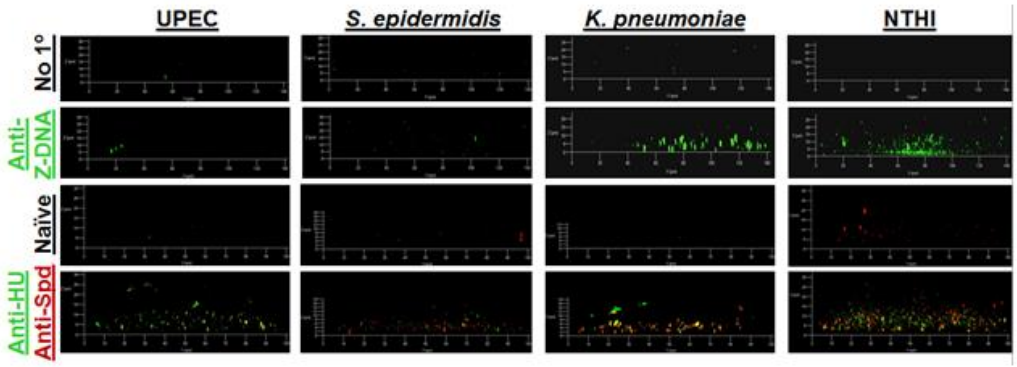

UPEC
S. epidermidis
K. pneumoniae
NTHI
No 1°
Anti-Z-DNA
Naïve
Anti-HU
Anti-Spd

FIG. 36

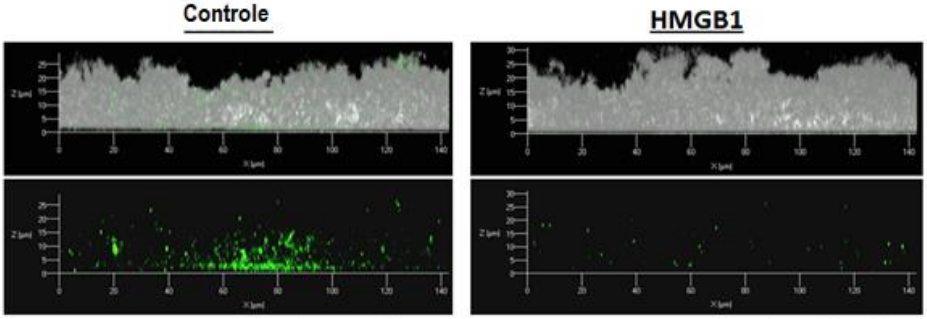
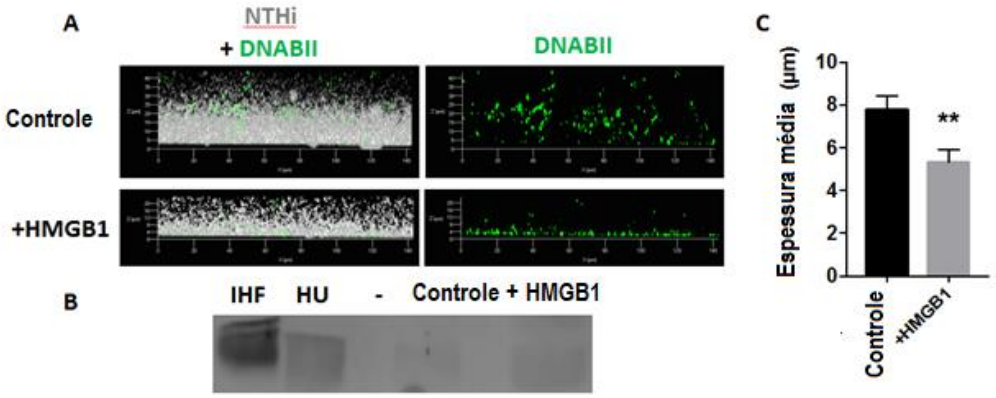
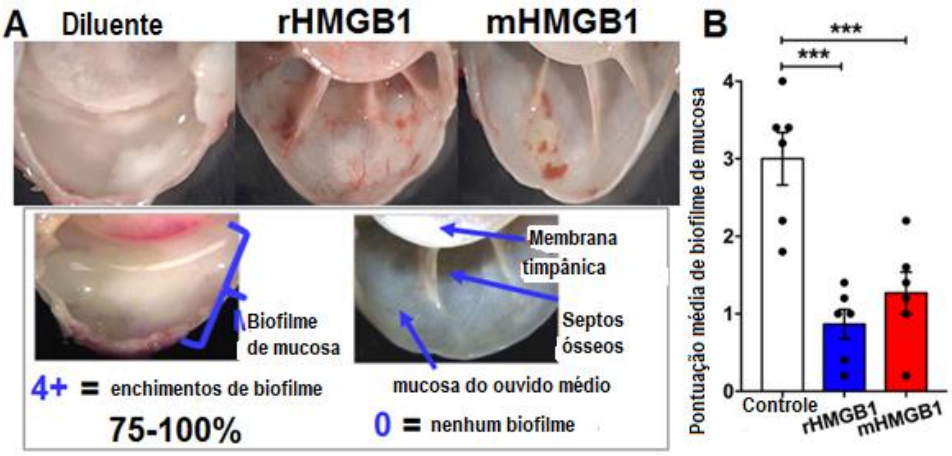

Controle
HMGB1

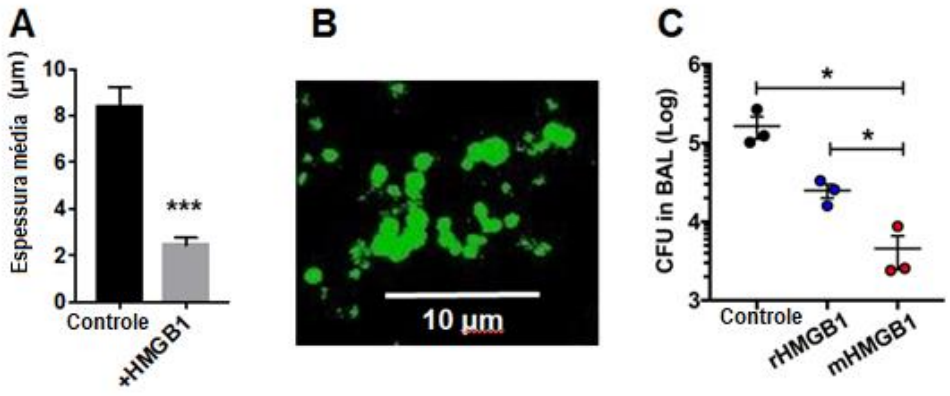
FIG. 37



FIGS. 38A – 38C



FIGS. 39A – 39B



FIGS. 40A – 40C

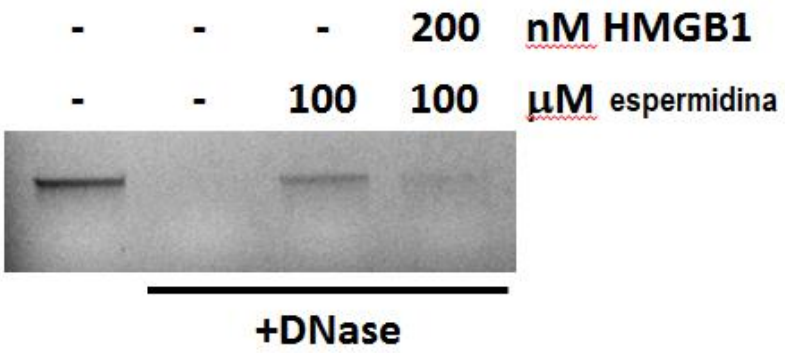
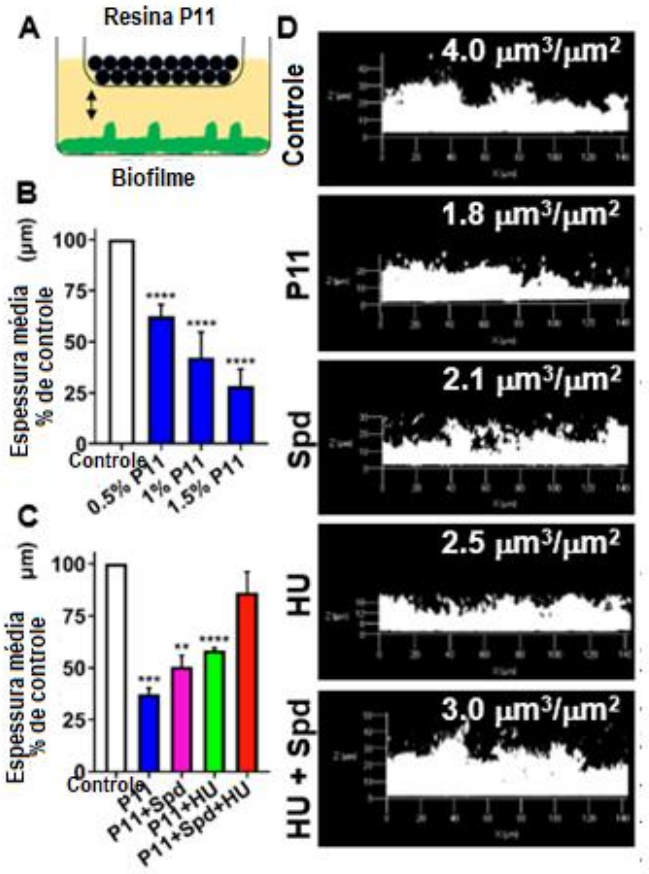


FIG. 41



FIGS. 42A – 42D

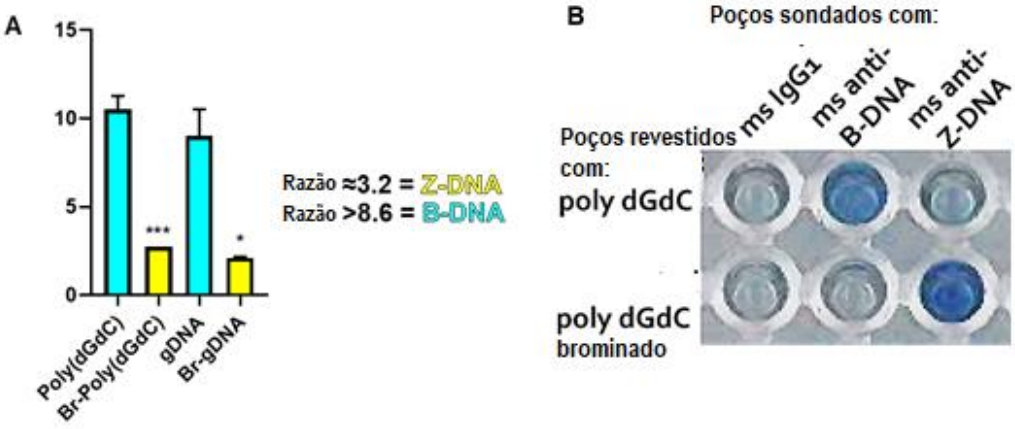


FIG. 43A – 43B

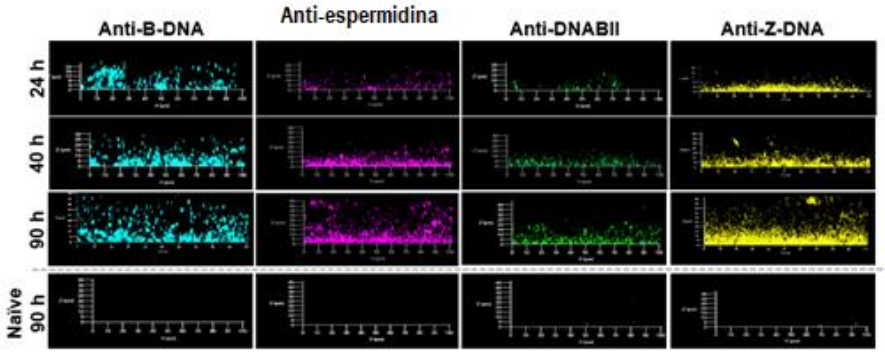


FIG. 44

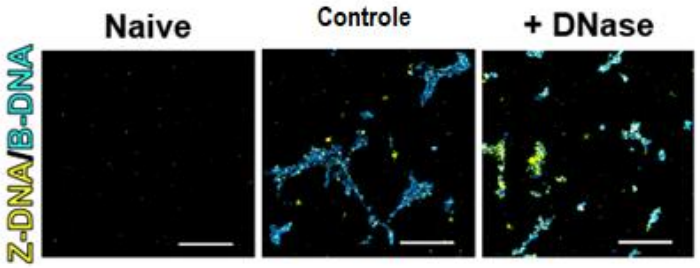


FIG. 45

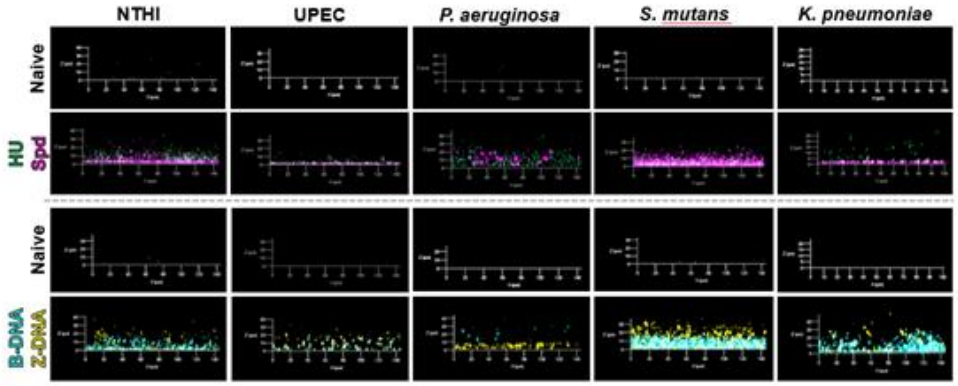
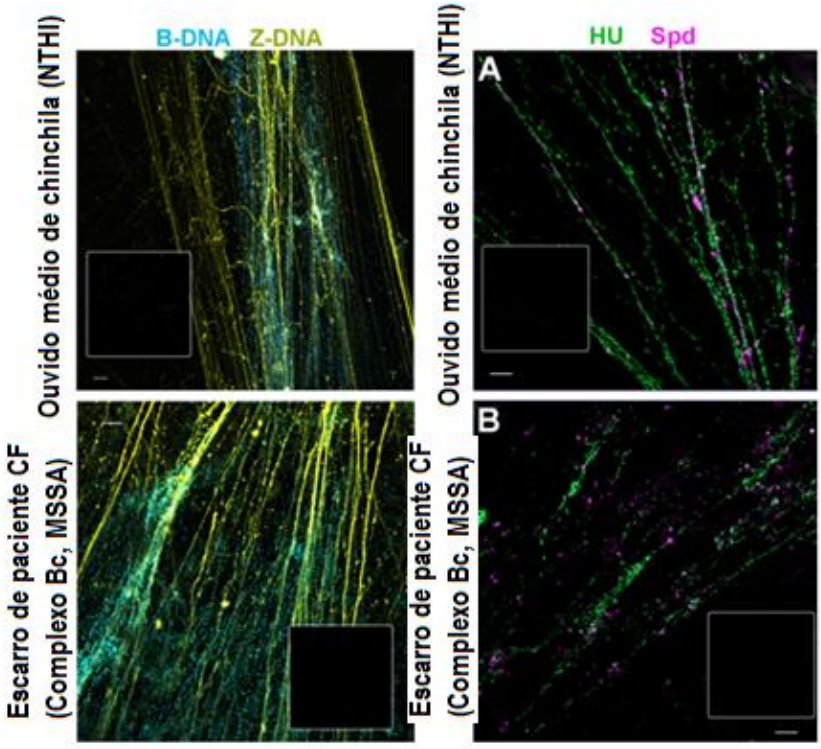
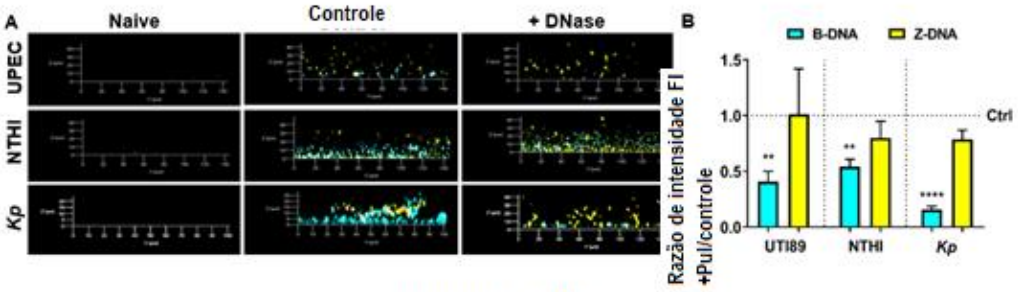


FIG. 46



FIGS. 47A – 47B



FIGS. 48A – 48B

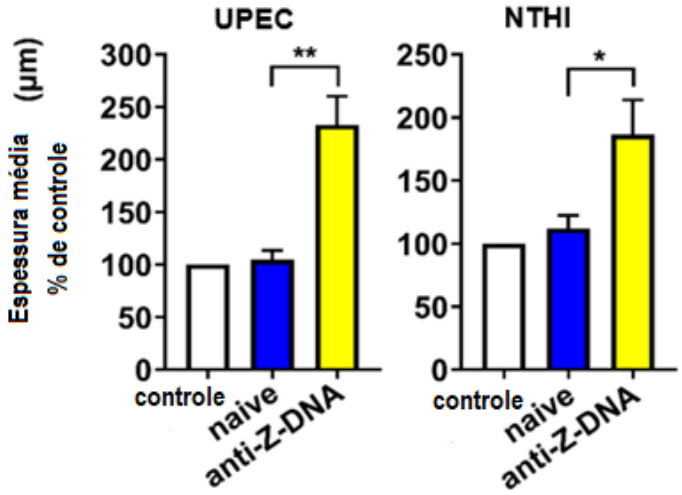
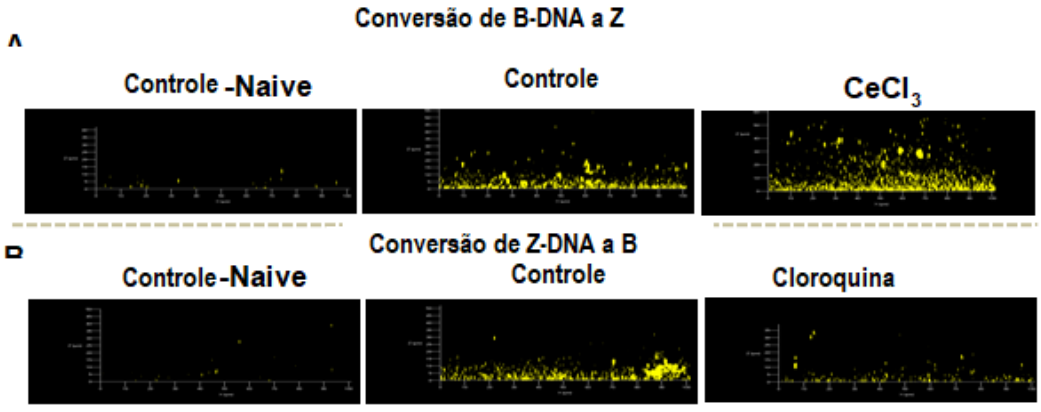
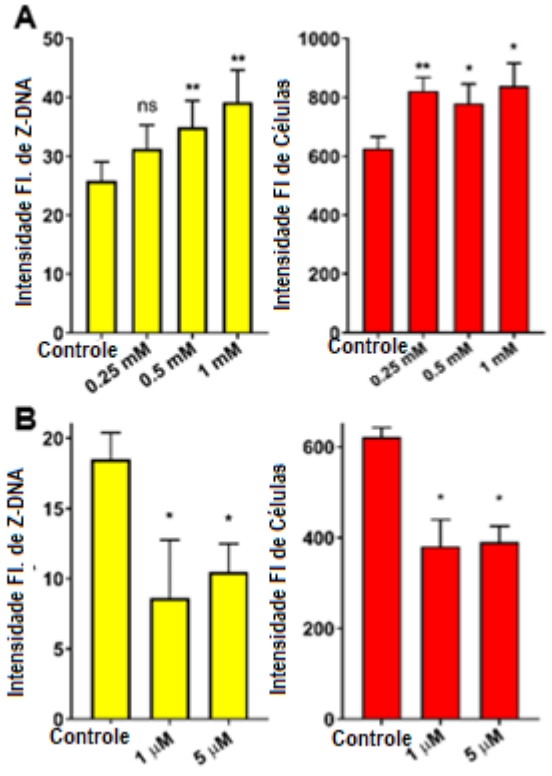


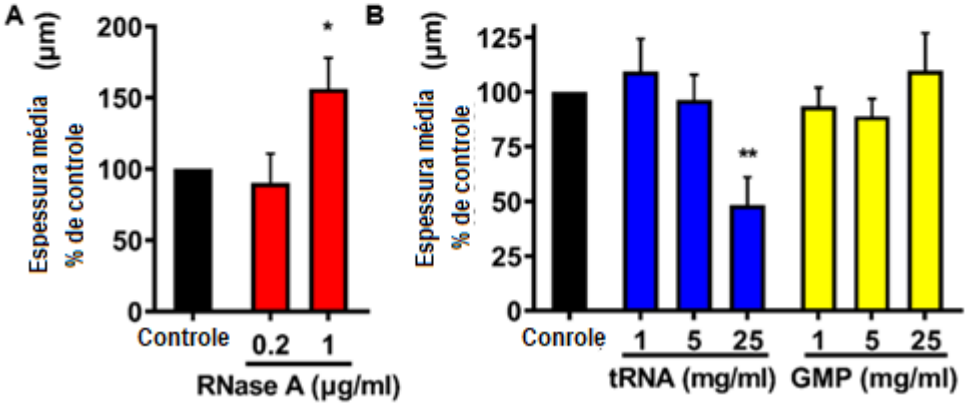
FIG. 49



FIGS. 50A – 50B


A
Intensidade Fl. de Z-DNA
50
40
30
20
10
0
ns
**
**
Controle
0.25 mM
0.5 mM
1 mM
Intensidade Fl de Células
1000
800
600
400
200
0
**
*
*
Controle
0.25 mM
0.5 mM
1 mM
B
Intensidade Fl. de Z-DNA
20
15
10
5
0
*
*
Controle
1 µM
5 µM
Intensidade Fl de Células
600
400
200
0
*
*
Controle
1 µM
5 µM

FIGS. 51A – 51B


A
Espessura média (µm)
% de controle
200
150
100
50
0
*
Controle
0.2
1
RNase A (µg/ml)
B
Espessura média (µm)
% de controle
125
100
75
50
25
0
**
Conrole
1
5
25
1
5
25
tRNA (mg/ml)
GMP (mg/ml)

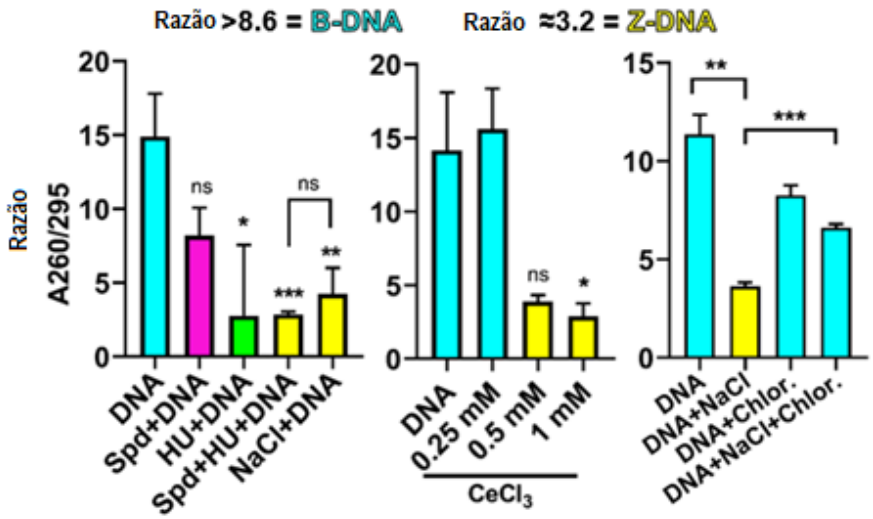

Razão >8.6 = B-DNA
Razão ≈3.2 = Z-DNA
Razão A260/295
20
15
10
5
0
ns
*
ns
**
***
DNA
Spd+DNA
HU+DNA
Spd+HU+DNA
NaCl+DNA
ns
*
DNA
0.25 mM
0.5 mM
1 mM
CeCl3
**
***
DNA
DNA+NaCl
DNA+Chlor.
DNA+NaCl+Chlor.

FIG. 53

“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA MEDIAR EPS”

RESUMO

A divulgação se refere a métodos para inibir a estabilidade de um biofilme compreendendo o contato do biofilme com uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Também são fornecidos aqui métodos para tratar um biofilme em um sujeito, compreendendo administrar ao sujeito infectado com um biofilme uma quantidade eficaz de um agente que interfere com a ligação de uma poliamina ao DNA no biofilme. Além disso, são descritos neste documento métodos para tratar um biofilme em um paciente que sofre de lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e/ou fibrose cística (CF), compreendendo administrar uma quantidade eficaz de um agente que interfere na conversão de B-DNA em Z-DNA em o biofilme ou seu ambiente local.