



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 342 411**

51 Int. Cl.:

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 31/203 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05791359 .2**

96 Fecha de presentación : **14.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1771558**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.04.2007**

54 Título: **Inhibición de la formación de biopelículas.**

30 Prioridad: **14.07.2004 US 587680 P**
14.09.2004 US 609763 P
21.03.2005 US 85279

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2010

73 Titular/es: **SEQUOIA SCIENCES, Inc.**
1912 Innerbelt Center Drive
St. Louis, Missouri 63114, US

72 Inventor/es: **Eldridge, Gary, R.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 342 411 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibición de la formación de biopelículas.

- 5 La invención se refiere a procedimientos para reducir o inhibir la formación de biopelículas. La invención también se refiere a procedimientos para la modulación de la expresión de un gen *cysB*. Además, la presente invención se refiere a procedimientos para la identificación de inhibidores de biopelículas.

10 Antecedentes

Las biopelículas bacterianas existen en entornos naturales, médicos, y de ingeniería. La biopelícula puede ofrecer una ventaja selectiva a un microorganismo para asegurar su supervivencia, o le permita existir una cierta cantidad de tiempo en estado latente hasta que se producen condiciones adecuadas de crecimiento. Esta ventaja selectiva podría plantear serias amenazas para la salud humana. Por ejemplo, las biopelículas están implicadas en el 65% de las infecciones bacterianas humanas. Las biopelículas también están implicadas en prostatitis, infecciones del tracto biliar, infecciones del tracto urinario, cistitis, pielonefritis, infecciones pulmonares, infecciones de los senos, infecciones del oído, acné y heridas crónicas.

20 Las biopelículas contribuyen a una variedad de condiciones médicas. Cada año en los Estados Unidos solamente, más de 7 millones de pacientes reciben implantes de dispositivos médicos, incluyendo catéteres venosos centrales, tubos endotraqueales, válvulas cardíacas mecánicas, marcapasos y prótesis articulares. Aproximadamente la mitad de estos pacientes desarrollan infecciones nosocomiales, y aproximadamente 80.000 muertes anuales se atribuyen a las infecciones nosocomiales. Las biopelículas proporcionan una matriz estructural que facilita la adhesión de las bacterias a las superficies inertes de los implantes de dispositivos médicos y catéteres venosos. Estudios microscópicos confirman que los catéteres venosos centrales están recubiertos por bacterias. Estudios microscópicos confirman que los catéteres venosos centrales están cubiertos por bacterias incrustadas en biopelículas. Desafortunadamente, más de 1 millón de pacientes desarrollan infecciones del tracto urinario por estos catéteres.

30 Las biopelículas constituyen una barrera protectora para las bacterias, permitiendo así que la bacteria resista tratamientos antibióticos. Los desarrolladores de los antibióticos deben afrontar el reto continuo de la resistencia a los antibióticos. La resistencia a los antibióticos dificulta significativamente el tratamiento de la condición médica. Por ejemplo, la resistencia microbiana a minociclina y rifampicina, que son ampliamente utilizados para tratar infecciones, está emergiendo. Un estudio de 1998 de una unidad de cuidados intensivos reveló que 6 de cada 7 enterococos resistentes a vancomicina fueron resistentes a la rifampicina.

La inhibición de las biopelículas ofrece numerosas ventajas. Las bacterias no tienen ninguna resistencia conocida a los inhibidores de biopelículas. Los inhibidores de biopelículas pueden actuar específicamente sobre los mecanismos biológicos que protegen las bacterias de los antibióticos y del sistema inmunológico de un huésped. En un estudio de catéteres urinarios, la rifampicina fue capaz de eliminar *Staphylococcus aureus* planctónicos o suspendidos resistentes a la meticilina, pero fue incapaz de erradicar las bacterias en un biopelícula. El tratamiento actual de las infecciones, por ejemplo infecciones nosocomiales, a menudo requiere una administración secuencial o simultánea de una combinación de productos, tal como amoxicilina/clavulanato y quinupristina/dalfopristina. Una inhibición directa de los mecanismos bacterianos utilizada para formar biopelículas puede ayudar a reducir las infecciones del torrente sanguíneo (BSI).

Además, una inhibición directa de los mecanismos bacterianos usados para formar biopelículas retrasa la aparición de resistencia microbiana a los antibióticos y, posiblemente, reduce la aparición de bacterias multirresistentes. Otra aproximación para reducir o inhibir la formación de biopelículas es aplicar presión evolutiva a los mecanismos de crecimiento bacteriano. En consecuencia, una amplia investigación está dedicada a elucidar los genes, y especialmente los más críticos, que intervienen en la formación de la biopelícula de control.

En consecuencia, por las razones expuestas anteriormente y otras, sigue habiendo una necesidad de un medio de control de la biopelícula y su formación.

55

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una biopelícula, que no es un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, que comprende la modulación de la expresión de un gen *cysB* en una bacteria gram negativa capaz de la formación de la biopelícula.

Además, la presente invención proporciona un procedimiento para la modulación de la expresión de un gen *cys B*, no siendo un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, que comprende contactar una bacteria gram-negativa capaz de formar un biopelícula, con una composición que comprende un compuesto seleccionado a partir de ácido ursólico, ácido asiático, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos, y N-óxidos de dichos ácidos.

La presente invención también proporciona un procedimiento para identificar un ácido ursólico o análogo del ácido asiático capaces de reducir o inhibir la formación de biopelículas, que comprende

- (a) contactar una bacteria gram-negativa capaz de formar biopelículas con un ácido ursólico o un análogo del ácido asiático;
- (b) proporcionar un marcador reportero ligado a un gen, en el que el gen es un gen *cysB* o un gen relacionado con *cysB*, y en el que el marcador reportero permite la detección de la expresión del gen;
- (c) detectar la modulación de la expresión del gen o de su producto génico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la inhibición de la formación de biopelículas en *E. coli* K12, *P. aeruginosa* PAO1, y *V. harveyi* BB120 con ácido ursólico.

La figura 2 muestra la inhibición de biopelícula de interfaz aire-líquido con ácido ursólico.

La Figura 3 muestra una comparación de la inhibición de la formación de biopelículas mediante *E. coli* de tipo salvaje y *E. coli* mutante (mutación *cys B*) con ácido ursólico.

Las figuras 4-8 muestran análogos de ácido ursólico y ácido asiático.

La Figura 9 muestra las estructuras químicas del ácido ursólico y del ácido asiático.

Definiciones

“Portador aceptable” se refiere a un portador que es compatible con los otros ingredientes de la formulación y no es perjudicial para su receptor.

“Reducción o inhibición”, en referencia a una biopelícula se refiere a la prevención de la formación o el crecimiento de la biopelícula, la reducción en el índice de formación o crecimiento de la biopelícula, la inhibición parcial o completa de la formación o crecimiento de la biopelícula.

“Modula” o “modulación” se refiere a la regulación hacia arriba o la regulación hacia abajo de la replicación de un gen o expresión.

Descripción

La presente invención proporciona un procedimiento para reducir o inhibir una biopelícula que incluye la modulación de la expresión de un gen *cysB* en una célula capaz de la formación de la biopelícula, en el que la célula es una bacteria gram negativa y el procedimiento no es un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia.

La formación de biopelículas implica vías biológicas conservadas entre diferentes especies de bacterias. Por ejemplo, diferentes especies de bacterias comparten un regulador global común en la formación y el mantenimiento de las biopelículas. Jackson *et al.* mostraron que la represión del catabolismo inducido por la glucosa causó una reducción del 30% al 95% en las biopelículas entre *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella enterica*. (Jackson, *et al.* J. Bacteriol. 2002, 184, 3406-3410). Una señal autoinductora bacteriana, AI-2, ha demostrado estar implicada en la formación de biopelículas. AI-2 y los genes de respuesta a esta señal se han identificado en una variedad de bacterias. La biopelícula se reduce o inhibe por modulación de la expresión de *cysB* en bacterias Gram-negativas. Preferiblemente, la biopelícula se reduce o inhibe mediante modulación de la expresión de *cysB* en *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *V. harveyi*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia sp.*, *Neisseria sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.*, *Klebsiella sp.*, o *Yersinia pestis*.

CysB se puede modular en una serie de maneras. Por ejemplo, la limitación de N-acetil-serina y azufre de regulación superior *cysB*. Lochowska, A. *et al.*, Functional Dissection of the LysR-type *CysB* Transcriptional Regulator. J. Biol. Chem. 2001, 276, 2098-2107. Además, al igual que otros reguladores tipo LysR, *cysB* se puede reprimir a sí mismo. Lilic, M. *et al.*, Identification of the *CysB*-regulated gene, *hslJ*, related to the *Escherichia coli* novobiocin resistance phenotype. FEMS Micro. Letters. 2003, 224, 239-246.

La descripción aquí describe otro medio para modular *cysB*. La presente invención, por lo tanto, también proporciona un procedimiento de modulación de la expresión de un gen *cysB* que comprende contactar la célula con una composición que comprende un compuesto seleccionado a partir de ácido ursólico, ácido asiático, sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, hidratos de dichos compuestos, solvatos de dichos compuestos y N-óxidos de dichos compuestos, o una combinación de los mismos.

La descripción aquí describe el descubrimiento de que el gen *cysB*, un regulador transcripcional de la biosíntesis de cisteína, está implicado en la formación de la biopelícula. (Verschuere, K.H.G., Crystallization of full-length CysB of *Klebsiella aerogenes*, a LysR-type transcriptional regulator, BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY D57:260-262, 2001). Como se demuestra en los ejemplos aquí, la eliminación de *cysB* de *E. coli* resulta en una reducción significativa de la formación de biopelículas *E. coli* en comparación con *E. coli* de tipo salvaje. La proteína *cysB* es un regulador transcripcional de la familia LysR de genes. Los reguladores transcripcionales de esta familia tienen motivos de unión al ADN de hélice-vuelta-hélice en su terminal amino. La proteína *cysB* se requiere para la expresión completa de los genes *cys*, que participan en la biosíntesis de cisteína.

El gen *cysB* está genéticamente conservado entre especies diferentes de bacterias, y más específicamente bacterias Gram-negativas. Verschuere, *et al.*, Acta Cryst. (2001) D57, 260-262; Byrne *et al.*, J. Bacteriol. 1988 170 (7), p. 3150-3157. De hecho, *cysB* se conserva entre *Pseudomonas* sp. incluyendo, pero no limitado a, *P. aeruginosa*, *P. putida*, y *P. syringae*. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi. Búsqueda blast del gen *cysB* en la base de datos de Genómica Microbiana del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH)). El gen *cysB* también está genéticamente conservado entre las siguientes especies de bacterias: *Vibrio* sp. (por ejemplo *V. harveyi* y *V. cholera*), *Proteus mirabilis*, *Burkholderia* sp. (por ejemplo *fongorum* B., *B. mallei*, y *B. cepacia*), *Klebsiella* sp., *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis*, *Salmonella typhimurium*, y *Acinetobacter* sp. ([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). Búsqueda blast del gen *cysB* en la base de datos genómica microbiana en NCBI del NIH). El gen *cysB* también está genéticamente conservado entre las bacterias Gram-positivas de *Bacilo* sp. incluyendo, pero no limitado a, *B. subtilis*, *B. cereus*, y *B. anthracis*. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi. Búsqueda blast del gen *cysB* en la base de datos genómica microbiana en NCBI de los NIH; Van der Ploeg, J.R.; FEMS Microbiol. Lett. 2001, 201, p. 29-35).

La célula se selecciona de un grupo que consiste en bacterias Gram-negativas. En realizaciones de la invención, la célula se selecciona entre *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Francisella tularensis*, *Vibrio* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, *V. harveyi*, *Pseudomonas* sp. *Salmonella* sp. *Haemophilus influenzae*, *Borrelia* sp. *Neisseria* sp. *Bacilo* sp. *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp. y *Yersinia pestis*. Preferiblemente, la célula es *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *V. harveyi*. Como se demuestra en el ejemplo 2, el ácido úrsólico reduce o inhibe la formación de biopelículas en *E. coli*, *P. aeruginosa*, y *V. harveyi*. Utilizando un procedimiento similar descrito en el ejemplo 2, el ácido asiático se demostró en el ejemplo 6 que reduce o inhibe la formación de biopelículas en *E. coli*.

Cys B controla la familia *cysDIJK* de genes a nivel transcripcional. Leyh, T., *et al.* J. Biol. Chem. 1992, 267 (15), p. 10405-10410. La administración de ácido úrsólico regula hacia abajo la expresión de *cysB* y ciertos genes bajo su control transcripcional, tal como *cysDIJK*, mientras que la administración de ácido asiático regula hacia arriba la expresión de *cysB* y ciertos genes bajo su control transcripcional. Al modular la expresión de *cysB*, el ácido úrsólico y el ácido asiático reducen o inhiben la formación de biopelículas.

Los miembros de la familia de los reguladores transcripcionales LysR se ha demostrado que regulan diversos procesos metabólicos. *cysB* presenta un control directo de la biosíntesis de cisteína. Verschuere *et al.*, página 260. El gen *cysB* está implicado, directa o indirectamente, en el transporte intracelular de la glutatona, la utilización de fuente de carbono, deshidrogenasas alanina, y el sistema dependiente de la arginina. *YbiK* está bajo el control directo de *cysB* y participa en el transporte intracelular de la glutatona. Los datos en el ejemplo 1 demuestran la regulación a la baja de *ybiK* contactando una célula bacteriana con ácido úrsólico. La regulación hacia abajo de *ybiK* en el ejemplo 1 de la memoria también apoya que el ácido úrsólico regula hacia abajo *cysB*. En una realización de la invención, el ácido úrsólico o el ácido asiático modula la expresión de *ybiK*.

La Figura 9 muestra la estructura química del ácido úrsólico (C110) y el ácido asiático (C255). El ácido úrsólico (UA) es un compuesto aislado de triterpeno pentacíclico de muchos tipos de plantas medicinales y está presente en la dieta humana. Se ha informado que tiene una amplia gama de beneficios farmacológicos, incluyendo terapias contra el cáncer y contra el envejecimiento. Véase por ejemplo, Hsu *et al.*, Life Sci. 75 (19): 2303-2316, 24 de septiembre de 2004 y Both *et al.*, Arch Dermatol. Res. 293 (11): 569-575, enero de 2002. El ácido úrsólico también ha sido identificado como un antagonista del factor de crecimiento transformante (TGF β 1). Murakami *et al.*, FEBS Lett. 566 (1-3): 55-59, 21 de mayo de 2004. Sin embargo, antes de la descripción aquí, ni ácido úrsólico ni ácido asiático ha sido informado de que modulen la expresión del gen *cysB*. Tampoco se ha informado que el ácido úrsólico ni el ácido asiático reduzcan o inhiban las formaciones de biopelículas. Análogos del ácido úrsólico (C110) y del ácido asiático (C 255) se espera que también modulen la expresión del gen *cysB*. Las figuras 4-8 muestran ejemplos de los análogos del ácido úrsólico y del ácido asiático.

Otros medios para controlar la formación de la biopelícula es comprender los factores genéticos subyacentes implicados. Como resultado, una compleja red de genes regula la formación y el mantenimiento de las biopelículas mediante bacterias. Por ejemplo, Sauer *et al.* han demostrado que aproximadamente 525 proteínas están reguladas diferencialmente en las distintas etapas de desarrollo de las mismas en *Pseudomonas aeruginosa*. Sauer *et al.*, J. Bacteriol. Noviembre de 2004, 186 (21): 7312-26. Stanley *et al.* han demostrado que aproximadamente 519 proteínas están reguladas diferencialmente en las primeras 24 horas de formación de la biopelícula en *Bacillus subtilis*. Stanley, N.R. *et al.* J. Bacteriol. 2003, 185, 1951-1957. Aunque numerosos genes pueden estar implicados en una variedad de vías biológicas, sólo unos pocos genes juegan un papel crítico. Los investigadores gastan una cantidad considerable de esfuerzo para determinar qué gen(es) es (son) fundamental(es) o esencial(es) en las vías biológicas que participan en las diversas etapas de la formación de la biopelícula y el mantenimiento. La descripción aquí describe el descubrimiento

de los genes implicados en la formación de biopelículas, tal como gen(es) *cysB*, *cysD*, *cysI*, *cysJ*, *cysK*, y *ybiK* y los compuestos que modulan estos genes y reducen o inhiben la formación de la biopelícula.

La presente descripción proporciona un procedimiento para identificar los agentes que reducen o inhiben la formación de biopelículas. Como se describe aquí, la modulación de la expresión de *cysB* inhibe la formación de biopelículas. *cysB* es el regulador global de la biosíntesis de cisteína, que controla directamente la expresión de los genes implicados en este proceso. Esto permite que un experto en la materia de compuestos de cribado en el descubrimiento de fármacos mida la modulación de un gen, en el que el gen es un gen *cysB* o un gen relacionado con *cysB*, durante el cribado de compuestos como un procedimiento de detección nuevo para la reducción o la inhibición de las biopelículas. Este procedimiento ofrece varias ventajas sobre las estrategias de cribado actuales. Tradicionalmente, el proceso de identificación de inhibidores de la biopelícula consiste en exponer al menos una célula bacteriana a un compuesto, y luego medir la disminución en la formación de biopelículas 24 a 72 horas después de la exposición. La reducción en la formación de biopelículas se evalúa mediante tinción con cristal violeta, que puede ser problemático. Como se describe en la literatura, después que las bacterias son expuestas a los compuestos, se lavan durante una cantidad variable de tiempo, se tiñen durante una cierta cantidad de tiempo con cristal violeta, se lavan con solventes o combinaciones de solventes, y se analizan mediante la determinación de las densidades ópticas de las soluciones de cristal violeta en comparación con los controles. (Pratt, L. A. *et al.* Mol. Micro. 1998, 30 (2), p. 285-298.). Por lo tanto, la medición de la inhibición de la formación de la biopelícula puede ser laboriosa y puede producir resultados poco fiables. Aprovechando el descubrimiento aquí descrito, esa modulación de un gen *cysB* está involucrada en la formación de la biopelícula, proporcionando un procedimiento simple, rápido y barato de detección de la inhibición de las biopelículas. El procedimiento consiste en la detección de la modulación de un gen, en el que el gen es un gen *cysB* o un gen relacionado con *cysB* que participa en la formación de la biopelícula. Un sistema reportero está vinculado con el gen o su producto génico. Específicamente, la modulación del gen *cysB*, un gen relacionado con un gen *cysB* o su producto génico pueden detectarse con un reportero, por ejemplo, una proteína fluorescente verde, antibiótico, isótopo radiactivo, o un tinte fluorescente. Por consiguiente, este procedimiento para identificar inhibidores de biopelícula es superior a los actualmente disponibles en la técnica.

Las biopelículas pueden adherirse a superficies, tales como tubos y filtros. Las biopelículas peligrosas son problemáticas en los entornos industriales, debido a que ensucian y corroen sistemas tales como intercambiadores de calor, oleoductos y sistemas de agua. Elvers *et al.*, Biofilms and Biofouling 2ª ed., Vol. 1, Academic Press, San Diego, CA. Se pueden emplear inhibidores de biopelículas para evitar que los microorganismos se adhieran a las superficies que pueden ser porosas, blandas, duras, semiblandas, semiduras, regeneradoras, o no regeneradoras. Estas superficies incluyen, pero no están limitadas a, poliuretano, metal, aleación, o superficies poliméricas en productos sanitarios, esmalte de dientes y membranas celulares de animales, preferentemente mamíferos, más preferentemente, seres humanos. Las superficies pueden estar recubiertas o impregnadas con inhibidores de biopelícula antes de su uso. Por otra parte, las superficies pueden tratarse con inhibidores de biopelícula para controlar, reducir o erradicar los microorganismos adheridos a estas superficies.

Las descripciones aquí no están pensadas para limitar el alcance de la presente invención, sino sólo para demostrar la utilidad de gran alcance de la invención para los expertos en la materia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Inhibición de la formación de biopelículas mediante *E. coli* K12 [R1drd19], *P. aeruginosa* PAO1, y *V. harveyi* BB120 mediante la adición de 10 µg/ml de ácido ursólico. Para *E. coli* K12 [R1drd19], los datos se recogieron 16 horas después de la adición de ácido ursólico a una biopelícula de 24 horas en medio LB, para *P. aeruginosa* PAO1, los datos fueron recogidos 18 horas después de la adición de ácido ursólico con la inoculación en medio LB más citrato de sodio al 1%, y para *V. harveyi* BB 120, los datos se recogieron 18 horas después de la adición de ácido ursólico con la inoculación en medio M9. Todas las lecturas de la masa de biopelículas en OD540 se normalizaron basadas en la lectura de tipo salvaje sin ácido ursólico que se normaliza a 1. Se muestra una desviación estándar. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

El Ejemplo 1 se repitió, excepto que se añadió ácido ursólico con la inoculación en *E. coli* JM109 crecido en glucosa LB al 0,2%. El ácido ursólico inhibió la biopelícula de interfaz aire-líquido. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 3

Para identificar los genes controlados mediante ácido ursólico, se cultivó *E. coli* K12 en medio LB durante la noche, diluido 1:100 en agua dulce LB suplementada con 0, 10, ó 30 µg/ml de ácido ursólico. La misma cantidad de etanol se suplementó para eliminar los efectos del solvente. El cultivo se realizó en una SD₆₀₀ de 0,9. Las células se

centrifugaron en una microcentrífuga durante 15 segundos a 20.000 x g en mini tubos de batido de cuentas (Biospec, Bartlesville, Oklahoma), que se enfriaron a -80°C antes del muestreo. Los gránulos de células fueron congeladas inmediatamente en un baño de hielo seco-etanol y se almacenaron a -80°C hasta el aislamiento del ARN.

- 5 Para lisar las células, 1,0 mL tampón RLT (Qiagen, Inc., Valencia, CA) y 0,2 mL 0,1 mm de cuentas de zirconia/sílice (Biospec) se añadieron a los tubos de batido de cuentas congelados que contienen los gránulos de la célula. Los tubos se cerraron herméticamente y se batieron durante 30 segundos a la máxima velocidad en una mini batidora de cuentas (cat. no. 3110BX, Biospec). El ARN total se aisló siguiendo el protocolo del equipo RNeasy Mini (Qiagen), incluyendo una digestión DNasa en columna con DNasa I RNasa (Qiagen). OD₂₆₀ se utilizó para cuantificar el rendimiento de ARN. OD₂₆₀/OD₂₈₀ y 23S/16S ARNr fueron medidos usando un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, California) para comprobar la pureza y la integridad del ARN (RNeasy manual Mini, Qiagen).

- 15 Las micromatrices de ADN de *E. coli* fueron preparados tal como se describió anteriormente por parte de Wei, Y. *et al.* (Journal of Bacteriology, 2001, 183 (2), p. 545-556). Cada sonda genética fue sintetizada mediante PCR y tiene el tamaño del marco de lectura totalmente abierta (200-2000 nt). Los productos de PCR de doble cadena se desnaturalizaron en dimetilsulfóxido 50% y luego se colocaron sobre portaobjetos de aminosilano (Full Moon Biosystems, Sunnyvale, CA) como sondas para hibridar con las muestras de ADNc derivado de ARNm. Se ha mostrado que cada matriz puede detectar 4228 de los 4290 ORFs *E. coli*. Cada gen tiene dos puntos por lámina.

- 20 Brevemente, el ARN total de las muestras de *E. coli* K12 cultivadas con y sin ácido ursólico se convirtieron primero en ADNc etiquetado. A continuación, las muestras de ADNc (6 mg de cada una) se marcaron cada una con los tintes Cy3 y Cy5 para eliminar artefactos relacionados con diferentes eficiencias de etiquetado; así, todos los experimentos necesitaron al menos dos portaobjetos. La muestra marcada Cy3 sin ácido ursólico y la muestra marcada con Cy5 de ácido ursólico (con 10 ó 30 µg/ml de ácido ursólico) se hibridaron en el primer portaobjetos. De manera similar, la muestra marcada Cy5 sin ácido ursólico y la muestra marcada con Cy3 de ácido ursólico se hibridaron en el segundo portaobjetos. Como que cada gen tiene dos puntos en un portaobjetos, las dos hibridaciones generaron ocho puntos de datos para cada gen (cuatro puntos para la muestra sin ácido ursólico y cuatro puntos para la muestra de ácido ursólico). Los experimentos de micromatrices con intercambio de tintes se repitieron para las dos concentraciones de ácido ursólico.

- 30 Las muestras de ADNc de *E. coli* DH5α tratado con FCM o 0,5 x LB (6 µg de cada una) se marcaron cada una con tintes Cy3 y Cy5 para eliminar artefactos relacionados con diferentes eficiencias de marcado; así, cada experimento requirió por lo menos dos portaobjetos. La muestra FCM marcada con Cy3 y muestra 0,5 x LB marcada con Cy5 se hibridaron en el primer portaobjetos. De manera similar, la muestra FCM marcada con Cy5 y la muestra 0,5 x LB marcada con Cy3 se hibridaron en el segundo portaobjetos. Como cada gen tiene dos puntos en un portaobjetos, las dos hibridaciones generaron ocho puntos de datos para cada gen (cuatro puntos para la muestra FCM y cuatro puntos para la muestra de 0,5 x LB). Las micromatrices de ADN para *E. coli* DH5α tratados con ACM o 0,5 x LB se realizaron de una manera análoga.

- 40 Las micromatrices de ADN se incubaron en una solución de prehibridización (3,5 x SSC [1x SSC es 0,15 M NaCl, más 0,015 M citrato de sodio] [Invitrogen], 0,1% de sulfato dodecil de sodio [SDS] [Invitrogen], y 0,1% de albúmina sérica bovina [Invitrogen]) a 45°C durante 20 min. Las matrices se enjuagaron con agua bidestilada y se secaron de manera giratoria mediante centrifugación. ADNc marcado (6 µg) se concentró en 10 µl de volumen total y fue mezclado con 10 µl de solución de hibridación de ADNc 4x (Full Moon Biosystems) y 20 µl de formamida (EM Science, Gibbstown, NJ). La mezcla de hibridación se calentó a 95°C durante 2 min. y se añadió a las micromatrices de ADN; cada matriz se cubrió con un cubreobjetos (Coming, Big Flats, Nueva York) y se incubó durante una noche a 37°C para la hibridación. Cuando la hibridación se terminó, los cubreobjetos se retiraron en el 1 x SSC-SDS 0,1% a temperatura ambiente, y las matrices se lavaron una vez durante 5 min en 1 x SSC-SDS 0,1% a 40°C, dos veces durante 10 minutos en 0,1 x SSC-SDS 0,1% a 40°C, y dos veces durante 1 min en 0,1 x SSC a 40°C. Las matrices fueron enjuagadas rápidamente por inmersión en agua bidestilada a temperatura ambiente y a continuación se secaron mediante centrifugación. Los portaobjetos hibridados fueron escaneados con el Generation III Array Scanner (Molecular Dynamics Corp.). Lecturas a 570 nm y 670 nm se utilizaron para cuantificar las sondas marcadas con Cy3 y Cy5 por separado. La señal se cuantificó con Array Vision 4.0 o 6.0 (Imaging Research, St. Catharines, Ontario, Canadá). Los genes fueron identificados como diferencialmente expresados cuando el índice de expresión fue superior a 1,4 y el valor p (t-test) es inferior a 0,05. Los valores p se calcularon en intensidades normalizadas transformadas de registro. La inclusión del criterio de valor p asegura la fiabilidad de la lista de genes inducidos/reprimidos. La normalización es relativa respecto a la intensidad de fluorescencia media total por portaobjetos por canal.

60

65

ES 2 342 411 T3

TABLA 1

Genes *E. coli* K12 reprimido mediante 10 y 30 µg/ml de ácido ursólico. Las relaciones subrayadas indican que los genes correspondientes fueron significativamente reprimidos por el ácido ursólico. Los genes remarcados fueron reprimidos tanto por 10 y 30 µg/ml de ácido ursólico. ER es el coeficiente de expresión y Pv es el valor p

Gen	b#	10 µg/ml de ácido ursólico		30 µg/ml de ácido ursólico		Descripción
		ER	Pv	ER	Pv	
<i>arsC</i>	b3503	<u>-1,5</u>	0,045	1,4	0,014	enzima, sensibilidad fármaco/análogo
<i>b2789</i>	b2789	-1,9	0,056	<u>-2,5</u>	0,038	permeasa D-glucarato putativa (familia MFS)
<i>cspF</i>	b1558	<u>-1,6</u>	0,003	-1,1	0,357	proteínas a modo de choque en frío
<i>cspG</i>	b0990	<u>-2,5</u>	0,009	<u>-1,7</u>	0,017	homólogo de proteína de choque en frío de <i>Salmonella</i>
<i>cysB</i>	b1275	<u>-1,7</u>	0,038	-1,4	0,018	regulador positivo de la transcripción de regulón cisteína
<i>cysD</i>	b2752	<u>-2,5</u>	9E-04	<u>-2,5</u>	0,024	metabolismo central intermediario: metabolismo de azufre
<i>cysI</i>	b2763	-1,5	0,069	<u>-1,7</u>	2E-04	metabolismo central intermediario: metabolismo de azufre
<i>cysJ</i>	b2764	<u>-3,6</u>	0,015	<u>-3,3</u>	0,009	metabolismo central intermediario: metabolismo de

ES 2 342 411 T3

Gen	b#	10 µg/ml de ácido ursólico		30 µg/ml de ácido ursólico		Descripción
		ER	Pv	ER	Pv	
						azufre
<i>cysK</i>	b2414	<u>-3,6</u>	0,003	<u>-3,3</u>	0,008	biosíntesis de aminoácidos: cisteína
<i>frvR</i>	b3897	<u>-5,4</u>	0,006	-2	0,175	proteína reguladora operón <i>frv</i> putativo
<i>gntU_1</i>	b3436	<u>-1,5</u>	0,026	-1,4	0,043	transporte de pequeñas moléculas: carbohidratos, ácidos orgánicos, alcoholes
<i>narH</i>	b1225	<u>-1,6</u>	0,002	<u>-1,4</u>	0,028	metabolismo de energía, carbono: respiración anaeróbica
<i>pheM</i>	b1715	<u>-1,6</u>	0,011	1	0,762	sintetasas aminoacil ARNt, modificación del ARNt
<i>pheP</i>	b0576	<u>-1,5</u>	0,021	-1,1	0,499	transporte de moléculas pequeñas: aminoácidos, aminas
<i>rimL</i>	b1427	<u>-1,5</u>	0,022	1	0,719	enzimas, ribosomas - maduración y modificación
<i>rmf</i>	b0953	<u>-1,5</u>	0,003	1	0,662	Factor: ribosomas - maduración y modificación
<i>rpmI</i>	b1717	<u>-1,6</u>	0,007	1	0,708	componente estructural, proteínas ribosomales - síntesis, modificación
<i>slp</i>	b3506	<u>-1,5</u>	0,006	<u>-1,6</u>	0,002	constituyentes membrana externa
<i>ugpB</i>	b3453	-1,4	0,045	<u>-1,5</u>	0,021	transporte de pequeñas moléculas: carbohidratos,

ES 2 342 411 T3

Gen	b#	10 µg/ml de ácido ursólico		30 µg/ml de ácido ursólico		Descripción
		ER	Pv	ER	Pv	
						ácidos orgánicos, alcoholes
<i>ybiK</i>	b0828	<u>-2,4</u>	7E-04	<u>-2,2</u>	0,005	asparaginasa putativa
<i>yhaD</i>	b3124	<u>-1,6</u>	0,025	<u>-2,6</u>	0,009	glicerato quinasa I
<i>yhaF</i>	b3126	<u>-1,5</u>	0,009	<u>-2,4</u>	0,002	alfa-dehidro-beta-deoxi-D-giucarato aldolasa
<i>yhaG</i>	b3128	<u>-2</u>	0,004	<u>-2,2</u>	0,008	(D)-deshidrogenasa galactarato
<i>b0309</i>	b0309	<u>-1,7</u>	0,042	-1,3	0,155	orf, proteína hipotética
<i>b0484</i>	b0484	<u>-1,5</u>	0,044	-1,1	0,425	enzima putativa, no clasificada
<i>b0485</i>	b0485	<u>-1,8</u>	0,009	-1,3	0,019	enzima putativa, no clasificada
<i>b0829</i>	b0829	<u>-1,5</u>	0,032	-1,5	0,09	transporte putativo, no clasificado
<i>61729</i>	b1729	<u>-5,6</u>	0,003	-2	0,133	enzima putativa, no clasificada
<i>b2379</i>	b2379	<u>-1,5</u>	0,011	1	0,325	enzima putativa, no clasificada
<i>hdeA</i>	b3510	<u>-1,7</u>	0,008	<u>-1,4</u>	0,008	orf, proteína hipotética
<i>hdeB</i>	b3509	<u>-1,8</u>	6E-04	<u>-1,4</u>	0,01	orf, proteína hipotética
<i>yeeD</i>	F2012	<u>-2,3</u>	0,025	-1,4	0,228	orf, proteína hipotética
<i>yeeE</i>	b2013	<u>-13</u>	0,006	-2	0,182	transporte putativo, no clasificado
<i>yjeB</i>	b4178	<u>-1,4</u>	0,005	1	0,833	orf, proteína hipotética
<i>ybhG</i>	b0795	-1,4	0,013	<u>-1,4</u>	0,002	membrana putativa, no clasificada

ES 2 342 411 T3

Gen	b#	10 µg/ml de ácido ursólico		30 µg/ml de ácido ursólico		Descripción
		ER	Pv	ER	Pv	
<i>yhaU</i>	b3127	-1,9	0,074	<u>-4,2</u>	0,003	proteína de transporte putativa

Ejemplo 4

Efecto de la adición de 30 µg/ml de ácido ursólico en la formación de biopelícula en medio LB en presencia de la mutación *cysB* (*E. coli* K12 [R1drd19] respecto a *E. coli* K12 *cysB*[R1drd19], datos recogidos 16 horas después de la adición de ácido ursólico. Todas las lecturas de la masa de biopelículas en OD540 se normalizaron basadas en la lectura de tipo salvaje sin ácido ursólico que se normalizó a 1. Se muestra una desviación estándar. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 5

El ejemplo 1 fue repetido, experto que el ácido asiático se añadió con inoculación en *E. coli* JM109 en medio de MC9 glucosa. El ácido asiático demostró aproximadamente una inhibición de biopelícula del 75%, 80% y 85% cuando se probó a 5 µg/ml, 10 µg/ml, y 15 µg/ml, respectivamente.

Ejemplo 6

El ejemplo 3 fue repetido, excepto que ácido asiático (C 255) fue añadido en lugar del ácido ursólico. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 342 411 T3

TABLA 2

Los genes *E. coli* JM109 inducidos mediante 10 µg/ml y 30 µg/ml de ácido asiático en medio de glucosa M9C. Las relaciones subrayadas indican que los genes correspondientes fueron inducidos de manera significativa mediante ácido asiático. ER es el coeficiente de expresión y Pv es el valor p

		10 ug ml		30 ug/ml		
		Ácido asiático		Ácido asiático		
Gen	b#	Pv	ER	Pv	ER	Descripciones
b0829	b0829	0,000001	2,83	0,000001	2,46	componente putativo de unión a ATP de un sistema de transporte
b1729	b1729	0,000001	2,64	0,000001	2,30	parte de una quinasa
b1963	b1963	0,000838	2,14	0,000007	2,30	orf, proteína hipotética
b2332	b2332	0,000002	2,14	0,000002	2,30	orf, proteína hipotética
b2420	b2420	0,000006	4,29	0,004108	2,14	orf, proteína hipotética
b2531	b2531	0,000002	2,46	0,000002	2,14	orf, proteína hipotética
b2670	b2670	0,000001	3,25	0,002057	2,64	orf, proteína hipotética
b2834	b2834	0,000063	2,30	0,000121	2,00	orf, proteína hipotética
bolA	b0435	0,000001	2,30	0,000001	2,64	regulador posible de genes mureína
cbl	b1987	0,000001	13,93	0,000001	13,00	regulador transcripcional regulón cys; circuito regulador accesorio que afectan cysM
cysA	b2422	0,000002	4,00	0,000002	3,48	componente de unión a ATP de sulfato permeasa A proteína, la resistencia a cromato
cysB	b1275	0,000001	6,06	0,000001	4,29	regulador de transcripción positivo de regulón de cisteína
cysC	b2750	0,000001	10,56	0,000001	6,96	adenosina 5- fosfosulfato quinasa
cysD	b2752	0,000001	6,96	0,000001	6,502	ATP: sulfurilasa (ATP: adeniltransferasa sulfato), subun
cysH	b2762	0,000001	4,59	0,000001	3,03	reductasa 3-fosfosulfato 5- fosfoadenosina
cysI	b2763	0,000002	4,29	0,000002	3,25	reductasa sulfito, subunidad alfa
cysJ	b2764	0,000002	3,73	0,000002	4,00	sulfito reductasa (NADPH),

ES 2 342 411 T3

		10 ug ml		30 ug/ml		
		Ácido asiático		Ácido asiático		
Gen	b#	Pv	ER	Pv	ER	Descripciones
						subunidad beta flavoproteína
cysK	b2414	0,000001	4,59	0,000001	3,48	cisteína sintasa A, O-sulfhidrolasa acetilserina A
cysM	b2421	0,000001	3,73	0,000004	3,25	cisteína sintasa B, O-sulfhidrolasa acetilserina B
cysN	b2751	0,000001	11,31	0,000001	7,46	ATP-sulfurilasa (ATP: adeniltransferasa sulfato), subunidad 1, probablemente una GTPase
cysP	b2425	0,000001	4,29	0,000001	4,92	proteínas de unión tiosulfato
cysU	b2424	0,000002	4,92	0,000002	4,92	sulfato, proteína tiosulfato sistema de transporte permeasa T
cysW	b2423	0,000002	4,59	0,000002	4,00	Proteína W sistema de transporte de sulfato permeasa
dgt	b0160	0,000002	2,14	0,000057	2,30	trifosfohidrolasa trifosfato de desoxiguanosina
fliY	b1920	0,000002	4,00	0,000002	3,25	proteína putativa de transporte periplásmico de unión
ftn	b1905	0,000001	3,25	0,000001	3,03	ferritina citoplasmática (una proteína de almacenaje de hierro)
glgs	b3049	0,000001	2,14	0,000001	2,30	biosíntesis de glucógeno, dependiente rpoS
ilvG_1	b3767	0,000005	2,83	0,000059	2,00	acetolactato sintasa II, subunidad grande, críptico, interrupte
ilvL	b3766	0,000003	2,30	0,000005	3,48	péptido líder operón ilvGEDA
msrA	b4219	0,000001	2,30	0,000001	2,64	reductasa péptido metionina sulfóxido

ES 2 342 411 T3

		10 ug ml		30 ug/ml		
		Ácido asiático		Ácido asiático		
Gen	b#	Pv	ER	Pv	ER	Descripciones
NLPA	b3661	0,000001	18,38	0,000001	9,85	lipoproteína-28
pssR	b3763	0,001336	2,46	0,001832	2,14	regulador de pssA
pstS	b3728	0,000002	2,64	0,000002	2,00	sistema de transporte específico de fosfato de alta afinidad; proteína de unión de fosfato periplásmico
sbp	b3917	0,000001	18,38	0,000001	12,13	proteína de unión de sulfato periplásmico
tauA	B3065	0,000001	2,46	0,000001	2,00	proteínas periplásmica de sistema de transporte de taurina
yaeG	b0162	0,007398	4,59	0,042948	4,00	orf, proteína hipotética
yaiB	b0382	0,000001	2,30	0,000014	2,64	orf, proteína hipotética
ybgR	b0752	0,000002	2,46	0,000002	2,46	proteína de permeasa de sistema de transporte putativo
ybiK	b0828	0,000001	6,50	0,000001	5,66	asparaginasa putativa
yciW	b1287	0,000002	3,03	0,000002	3,73	oxidoreductasa putativa
yedO	b1919	0,000002	3,73	0,000002	2,83	deaminasa 1-aminociclopropano-1-carboxilato putativa
yeeD	F2012	0,000002	3,73	0,000002	2,30	orf, proteína hipotética
yeeE	b2013	0,000002	3,25	0,000002	2,14	sistema de transporte putativo proteína permeasa
ygbE	b2749	0,000002	6,96	0,000004	5,28	subunidad putativa de oxidasa citocromo
yicG	b3646	0,000001	2,83	0,000001	2,30	orf, proteína hipotética
yicL	b3660	0,000001	6,50	0,000057	2,83	transportador permeasa putativo
yjaE	b3995	0,000002	2,00	0,000002	2,14	regulador transcripcional putativo

		10 ug ml		30 ug/ml		
		Ácido asiático		Ácido asiático		
Gen	b#	Pv	ER	Pv	ER	Descripciones
yjiD	b4326	0,000001	7,46	0,000001	9,85	orf, proteína hipotética
yrbL	b3207	0,000001	2,64	0,000001	2,46	orf, proteína hipotética

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- **Jackson** *et al. J. Bacteriol.*, 2002, vol. 184, 3406-3410 [0020]

- **Lochowska**, A. *et al. Functional Dissection of the LysR-type CysB Transcriptional Regulator. J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 2098-2107 [0021]

- **Lilic**, M. *et al. Identification of the CysB-regulated gene, hslJ, related to the Escherichia coli novobiocin resistance phenotype. FEMS Micro. Letters*, 2003, vol. 224, 239-246 [0021]

- **Verschuieren**, K. H. G. Crystallization of full-length CysB of *Klebsiella aerogenes*, a LysR-type transcriptional regulator. *BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY*, 2001, vol. D57, 260-262 [0023]

- **Verschuieren** *et al. Acta Cryst.*, 2001, vol. D57, 260-262 [0024]

- **Byrne** *et al. J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170 (7), 3150-3157 [0024]

- van der **Ploeg**, J.R. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001, vol. 201, 29-35 [0024]

- **Leyh**, T. *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267 (15), 10405-10410 [0026]

- **Hsu** *et al. Life Sci.*, 24 September 2004, vol. 75 (19), 2303-2316 [0028]

- **Both** *et al. Arch Dermatol. Res.*, January 2002, vol. 293 (11), 569-575 [0028]

- **Murakami** *et al. FEBS Lett.*, 21 May 2004, vol. 566 (1-3), 55-59 [0028]

- **Sauer** *et al. J. Bacteriol.*, November 2004, vol. 186 (21), 7312-26 [0029]

- **Stanley**, N.R. *et al. J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, 1951-1957 [0029]

- **Pratt**, L. A. *et al. Mol. Micro.*, 1998, vol. 30 (2), 285-298 [0030]

- **Elvers** *et al. Biofilms and Biofouling. Academic Press*, vol. 1 [0031]

- **Wei**, Y. *et al. Journal of Bacteriology*, 2001, vol. 183 (2), 545-556 [0037]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para reducir o inhibir una biopelícula, no siendo un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, que comprende modular la expresión de un gen *cysB* en una bacteria Gram-negativa capaz de formación de la biopelícula.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la expresión del gen *cysB* se modula mediante un procedimiento que comprende contactar la bacteria con una composición que comprende un compuesto seleccionado entre ácido ursólico, ácido asiático, y sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos y N-óxidos de dichos ácidos.

3. Procedimiento de modulación de la expresión de un gen *cys B*, no siendo un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia, que comprende contactar una bacteria Gram-negativa capaz de formar una biopelícula con una composición que comprende un compuesto seleccionado entre ácido ursólico, ácido asiático, sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos y N-óxidos de dichos ácidos.

4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho compuesto es ácido ursólico.

5. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3, en el que dicho compuesto es ácido asiático.

6. Procedimiento para la identificación de un análogo de ácido ursólico o un análogo de ácido asiático capaces de reducir o inhibir la formación de biopelículas, que comprende

(a) contactar una bacteria Gram-negativa capaz de la formación de la biopelícula con un análogo de ácido ursólico o de ácido asiático;

(b) proporcionar un marcador reportero enlazado a un gen, en el que el gen es un gen *cysB* o un gen relacionado con *cysB*, y en el que el marcador reportero permite la detección de la expresión del gen;

(c) detectar la modulación de la expresión del gen o de su producto génico.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la bacteria es una bacteria *Escherichia coli*.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la bacteria es una bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha biopelícula es adherente a una superficie.

FIGURA 1

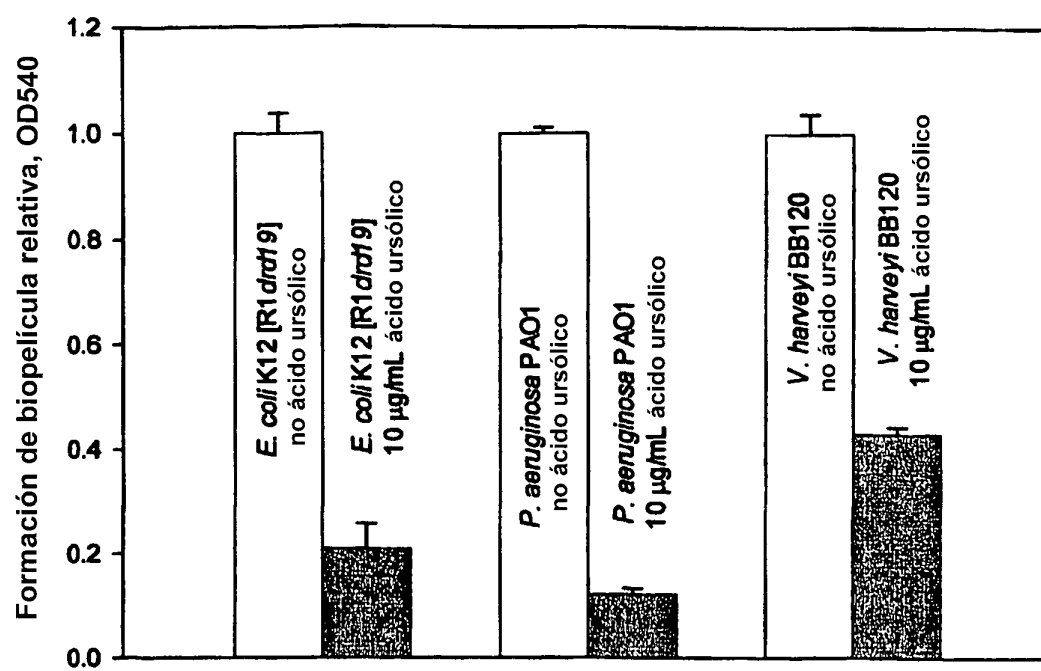


FIGURA 2

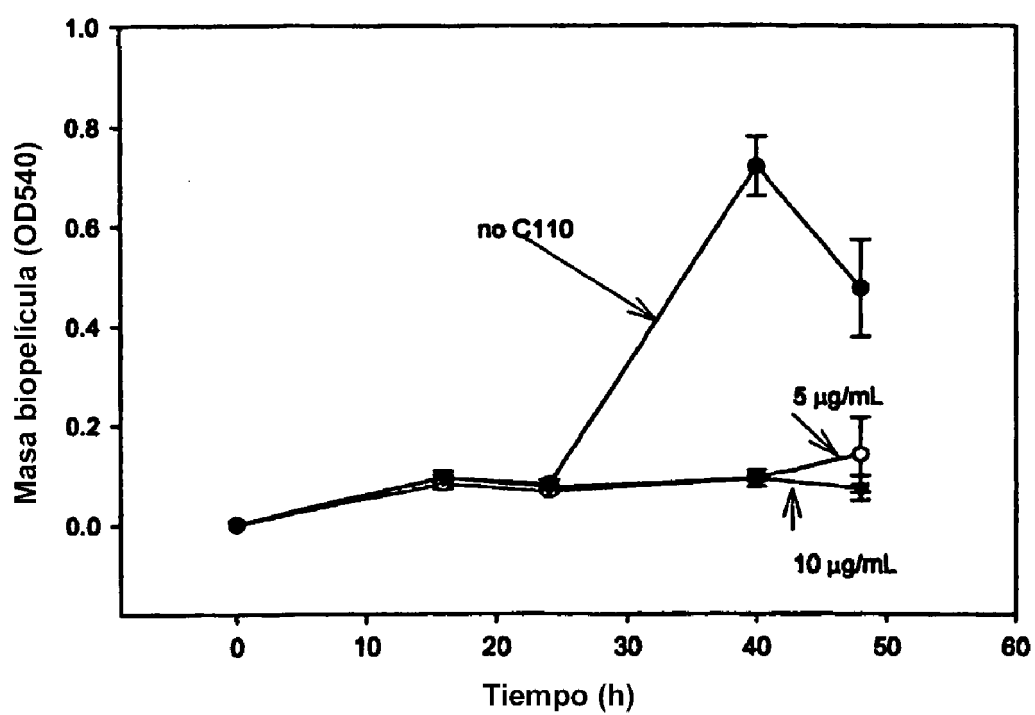


FIGURA 3

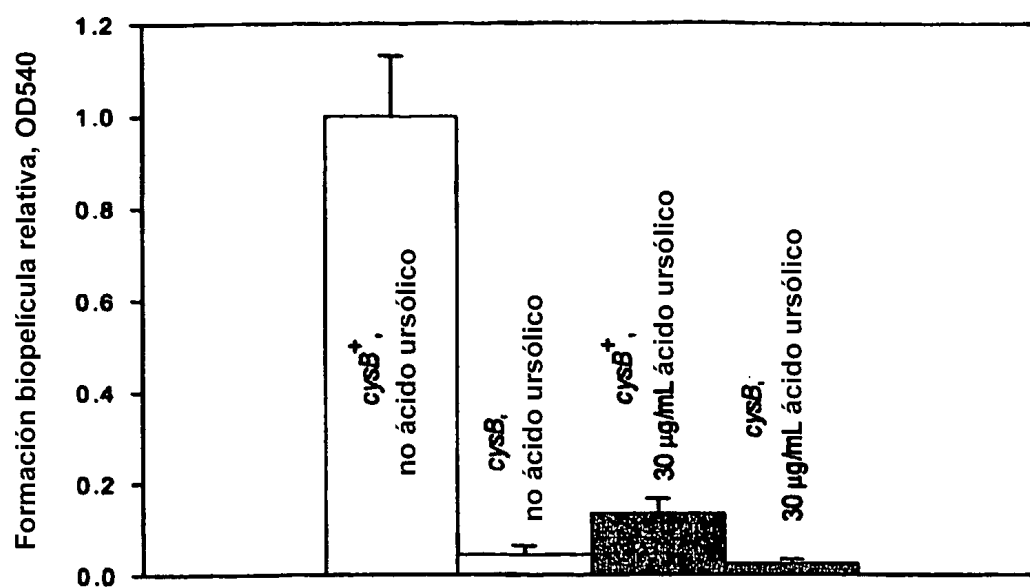
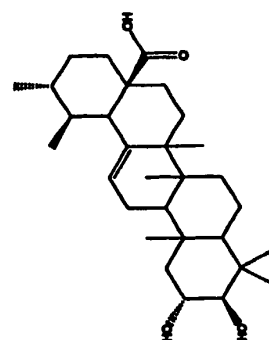
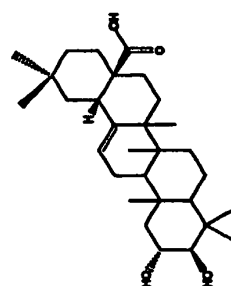
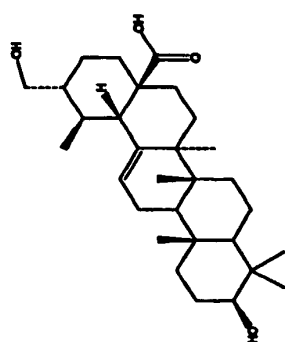


FIGURA 4

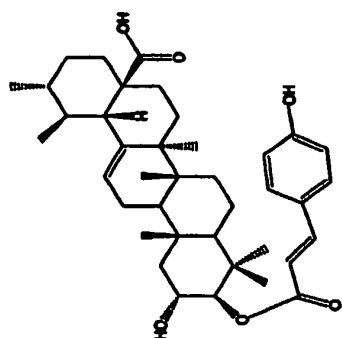


99

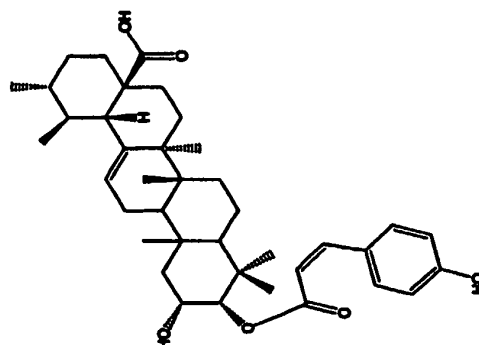
107

108

FIGURA 5

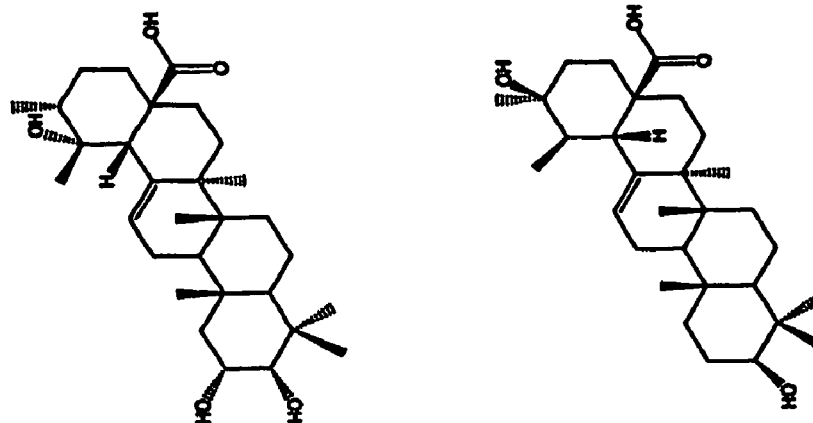


189



190

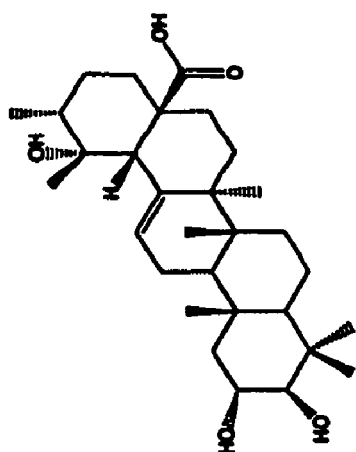
FIGURA 6



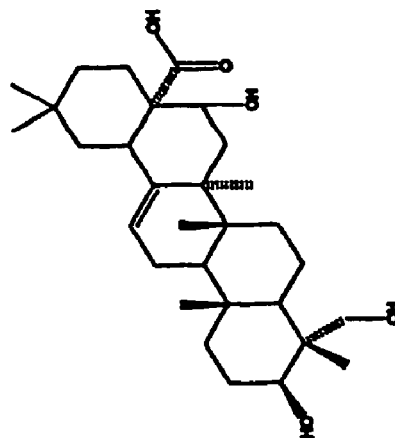
192

195

FIGURA 7

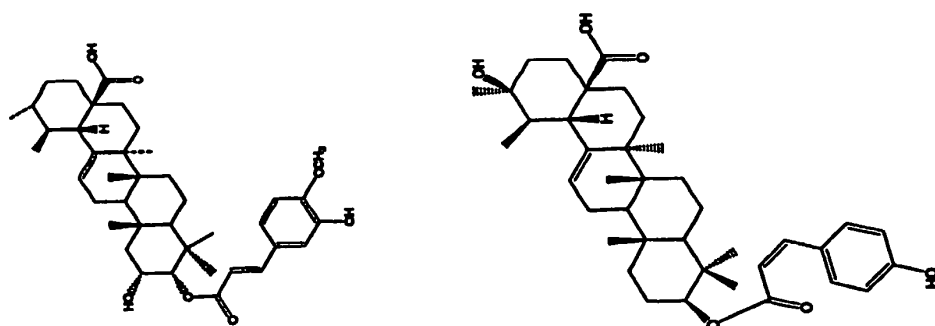


203



323

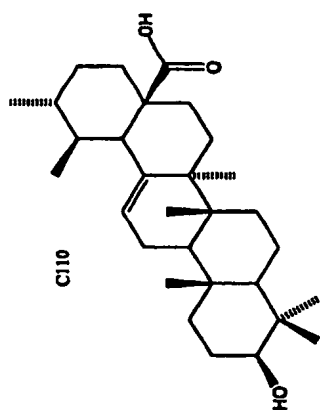
FIGURA 8



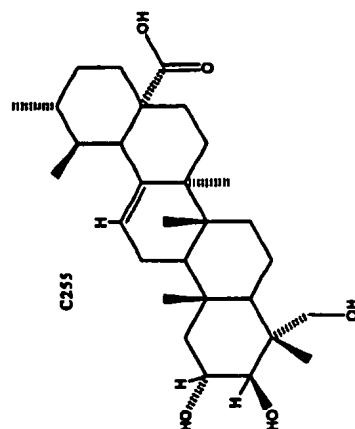
116

188

FIGURA 9



Ácido ursólico



Asiatic acid