

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 598**

51 Int. Cl.:

A01N 63/50 (2010.01)

A01N 25/34 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2016** **PCT/EP2016/074350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.04.2017** **WO17064066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2016** **E 16781745 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 3361866**

54 Título: **Uso de un biopolímero para reducir la formación de una biopelícula**

30 Prioridad:

12.10.2015 EP 15189329

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

14.04.2025

73 Titular/es:

AMSILK GMBH (100.00%)
Anna-Sigmund-Straße 1- 3
82061 Neuried, DE

72 Inventor/es:

KLEIN, JENS;
RÖMER, LIN;
SCHEIBEL, THOMAS y
SLOTTA, UTE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 3 013 598 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

Uso de un biopolímero para reducir la formación de una biopelícula

La presente invención se refiere al uso no terapéutico, *ex vivo*, o *in vitro* de un polipéptido de seda de araña para reducir la formación de una biopelícula. También se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un sustrato que reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato.

Antecedentes de la invención

Una biopelícula es formada por microorganismos. En una biopelícula, las células microbianas se adhieren entre sí y/o a una superficie. Estas células generalmente se parecen a células adherentes que a menudo están incrustadas dentro de una matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular (EPS). La matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular también puede denominarse limo microbiano. Es un conglomerado polimérico generalmente compuesto de ADN extracelular, proteínas y/o polisacáridos. Los microorganismos forman una biopelícula en respuesta a muchos factores, que pueden incluir el reconocimiento celular de sitios de unión específicos o no específicos en una superficie, señales nutricionales o la exposición a moléculas y/o estímulos específicos. Cuando una célula conmuta al modo de crecimiento de biopelícula, experimenta un cambio fenotípico en el comportamiento en donde varios genes se regulan de forma diferente.

Las biopelículas se desarrollan preferiblemente en superficies inertes, incluyendo las de artículos de uso diario y domésticos, así como en dispositivos médicos. Las biopelículas pueden formarse en materiales poliméricos, metales, vidrio y cerámica, entre otros. La exposición a dichos microorganismos, por ejemplo, a través del contacto con la superficie de la piel, puede provocar infecciones que comprometen la salud. Las biopelículas pueden formarse en cualquier número de elementos con los que las personas entran en contacto, tales como: productos de higiene, dispositivos médicos, electrodomésticos, grifería, etc. El control de la formación de biopelículas podría resultar en una menor infección de individuos.

La formación de biopelículas tiene otras implicaciones importantes para la salud pública. Se sabe que los sistemas de agua potable y de aguas residuales albergan biopelículas, aunque estos entornos a menudo contienen desinfectantes. Cualquier sistema que proporcione una interfaz entre una superficie y un fluido o gas tiene el potencial para el desarrollo de biopelículas. Es bien sabido que los sistemas de ventilación, así como los sistemas de aire acondicionado, tal como las torres de enfriamiento por agua para los aparatos de aire acondicionado, plantean riesgos para la salud pública debido a la formación de biopelículas, como lo atestiguan los brotes episódicos de infecciones causadas por legionella. El flujo de fluido turbulento sobre la superficie no proporciona protección. Las biopelículas pueden formarse en conductos por donde pasa agua corriente u otros fluidos, con el efecto de alterar las características del flujo y hacer pasar organismos planctónicos río abajo. Las operaciones de procesamiento de fluidos industriales han experimentado bloqueos mecánicos, impedancia de los procesos de transferencia de calor y biodeterioro de productos industriales a base de fluidos, todo ello atribuible a las biopelículas. Se han identificado biopelículas en conductos de flujo tal como tubos de hemodiálisis y en conductos de distribución de agua. También se ha identificado que las biopelículas causan bioincrustaciones en determinados tanques de almacenamiento de agua municipales, pozos privados y sistemas de riego por goteo.

La infección microbiana y la consiguiente formación de biopelículas sigue siendo una de las complicaciones más graves en varias áreas, en particular en dispositivos médicos, medicamentos, aplicaciones sanitarias e higiénicas, sistemas de agua potable, sistemas de purificación de agua, equipos hospitalarios y de cirugía dental, textiles, envases de alimentos y sistemas de almacenamiento de alimentos. Dado que las dificultades asociadas con la eliminación de infecciones basadas en biopelículas son bien reconocidas, se han probado varios agentes para tratar superficies o fluidos de baño para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas.

Para prevenir o impedir la formación de biopelículas por microorganismos indeseables se requiere tradicionalmente el uso de dispersantes, tensioactivos, enzimas, agentes antimicrobianos, biocidas, metales específicos y/o productos químicos. El documento US 2009/162439 A1 se refiere, por ejemplo, a composiciones y métodos para prevenir o inhibir la formación de biopelículas en un sustrato sólido que comprende un agente antimicrobiano y una enzima degradadora de biopelículas incrustada en un material de matriz. Sin embargo, se ha informado que los agentes para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas disponibles en el mercado, por ejemplo, agentes antimicrobianos o metales tal como la plata, son caros, no permanentes, nocivos para la salud, nocivos para el medio ambiente y requieren un proceso laborioso para su fabricación y aplicación. Además, muchos agentes utilizados en este contexto no pueden esterilizarse. Los antibióticos, por ejemplo, a menudo dejan de ser activos después de someterse a procesos de esterilización. Además, muchos agentes para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas, por ejemplo, los aditivos químicos, no son adecuados en aplicaciones médicas debido a sus efectos secundarios. Además, cualquier agente utilizado para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas al que estarán expuestas las personas debe ser seguro para el usuario. Ciertos agentes biocidas, en cantidades suficientes para interferir con las biopelículas, también pueden dañar los tejidos del huésped. Por lo tanto, es ventajoso que el compuesto resistente a la biopelícula

funcione no como biocida, sino para hacer que las superficies no sean aptas para la adhesión y la colonización por microorganismos. Un compuesto de este tipo no depende de un "mecanismo de eliminación" para prevenir la formación de biopelículas, sino de la creación de un entorno no propicio para su formación.

- 5 Con base en lo anterior, existe una necesidad de nuevos agentes/sustratos que puedan usarse para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas, por ejemplo, agentes/sustratos que sean rentables, estables, esterilizables, seguros y libres de efectos secundarios. Para este fin serían muy deseables sustancias naturales o idénticas a las naturales, ya que suelen ser bien toleradas por los seres humanos y los animales. Sin embargo, estas sustancias naturales suelen parecer un caldo de cultivo perfecto para los microbios - resultando en el opuesto al deseado.
- 10 Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente un biopolímero, concretamente un polipéptido de seda de araña, que tiene las propiedades mencionadas anteriormente y que, por tanto, es muy adecuado para evitar o reducir la formación de biopelículas. Sorprendentemente, descubrieron que la formación de biopelículas se puede evitar o reducir recubriendo una superficie de un sustrato con un biopolímero de polipéptido de seda de araña o incorporando este biopolímero a un sustrato como un todo. El mecanismo por el cual la presente invención prolonga/dificulta la formación y crecimiento de biopelículas es mediante la
- 15 creación de una superficie con este biopolímero, en donde los microorganismos asociados a las biopelículas no se adhieren ni colonizan fácilmente.

Resumen de la invención

- 20 En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso no terapéutico, *ex vivo*, o *in vitro* de un polipéptido de seda de araña para evitar o reducir la formación de una biopelícula.

También se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un sustrato que evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato que comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- 25 (ii) recubrir la composición sobre la superficie de dicho sustrato.

También se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un sustrato que evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato que comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- 30 (ii) formar dicho sustrato a partir de la composición.

Descripción detallada de la invención

- 35 Antes de describir en detalle la presente invención a continuación, se debe entender que esta invención no está limitada a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene únicamente el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica.

- 40 Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

- 45 A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderán como que implican la inclusión de un número entero o paso o grupo de números enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o paso o grupo de números enteros o pasos.

- 50 A continuación se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos y realizaciones preferidas descritos no deben interpretarse como que limitan la presente invención únicamente a las realizaciones descritas explícitamente. Esta descripción debe entenderse como que respalda y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse revelada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

El término "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. El término "que consiste esencialmente en" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero establecido o un grupo de números enteros, mientras que excluye modificaciones u otros números enteros que afectarían o alterarían materialmente el número entero establecido. El término "que consiste en" o variaciones tales como "consiste en" de acuerdo con la presente invención significa la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados y la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

Como se mencionó anteriormente, existe una necesidad de nuevos agentes/sustratos que puedan usarse para prevenir o perjudicar la formación de biopelículas, por ejemplo, agentes/sustratos que sean rentables, estables, esterilizables, seguros, no tóxicos y libres de efectos secundarios. Para este fin serían muy deseables sustancias naturales o idénticas a las naturales, ya que suelen ser bien toleradas por los seres humanos y los animales.

Los inventores de la presente invención encontraron sorprendentemente un biopolímero que tiene las propiedades mencionadas anteriormente y que, por lo tanto, es muy adecuado para evitar o reducir la formación de biopelículas. Sorprendentemente, descubrieron que la formación de biopelículas se puede evitar o reducir recubriendo una superficie de un sustrato con el biopolímero o incorporando el biopolímero a un sustrato como un todo. Esto fue sorprendente porque el biopolímero en sí mismo contiene componentes (por ejemplo, aminoácidos) que generalmente sirven como caldo de cultivo para los microorganismos formadores de biopelículas. El mecanismo por el cual la presente invención prolonga/dificulta la formación y crecimiento de biopelículas es mediante la creación de una superficie con el biopolímero, en donde los microorganismos asociados con las biopelículas no se adhieren o colonizan fácilmente. En otras palabras, el biopolímero hace que la superficie de un sustrato, normalmente propenso a la formación de una biopelícula, no sea apta para la adhesión y colonización por microorganismos. El biopolímero no depende de un "mecanismo de eliminación" para evitar o reducir las biopelículas. Más bien, evita o reduce la formación de biopelículas al interferir con la capacidad de un microorganismo de adherirse a una superficie. El biopolímero utilizado en la presente invención es un polipéptido de seda de araña.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso no terapéutico, *ex vivo*, o *in vitro* de un polipéptido de seda de araña para evitar o reducir la formación de una biopelícula. Dicho uso podrá ser un uso *in vitro* o *in vivo*.

El término "biopolímero" engloba cualquier biopolímero que evita o reduce la formación de una biopelícula. Como se mencionó anteriormente, el biopolímero no depende de un "mecanismo de eliminación" para evitar o reducir las biopelículas, sino de la creación de un entorno no propicio para la formación de biopelículas. El término "biopolímero", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere además a una molécula que se forma preferiblemente a partir de bloques de construcción repetidos similares a la naturaleza. El biopolímero puede ser un polipéptido, por ejemplo, un polipéptido recombinante. Dicho polipéptido comprende bloques de construcción repetidos hechos de aminoácidos. El biopolímero utilizado en la presente invención es un polipéptido de seda de araña.

A menos que se indique lo contrario, los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a un péptido, independientemente de su longitud o modificación postraducciona. Además, los términos "bloque de construcción repetitivo", "unidad repetitiva", "unidad repetitiva" o "unidad de repetición" se utilizan de forma intercambiable en el contexto de la presente invención.

El término "evitar la formación de una biopelícula", como se utiliza en el presente documento, significa que no se forma ninguna biopelícula en comparación con una situación correspondiente en donde no está presente ningún polipéptido de seda de araña como biopolímero. El término "reducir la formación de una biopelícula", como se utiliza en el presente documento, significa que se forma menos biopelícula en comparación con una situación correspondiente en donde no está presente ningún polipéptido de seda de araña como biopolímero. La formación de una biopelícula puede reducirse al menos en 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, o en 100 % en comparación con una situación correspondiente en donde no está presente ningún polipéptido de seda de araña como biopolímero. Preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce al menos en 10 %. Más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce al menos en 20 %. Aún más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce al menos en 30 %. Lo más preferible es que la formación de una biopelícula se reduzca al menos en 90 %, por ejemplo, en 100 %. El experto en la técnica puede determinar fácilmente de forma experimental si se evita o reduce la formación de una biopelícula, por ejemplo, mediante mediciones del recuento de células, mediciones de densidad óptica (OD) u otros métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Preferiblemente se utilizan mediciones del recuento de células. En este sentido se remite al apartado experimental.

En una realización preferida, se evita o reduce la formación de la biopelícula en una (al menos una) superficie de un sustrato. El término "se evita la formación de la biopelícula en una superficie de un sustrato", como se

utiliza en el presente documento, significa que no se forma ninguna biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña. El término "la formación de la biopelícula se reduce en una superficie de un sustrato", como se utiliza en el presente documento, significa que se forma menos biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña. La formación de la biopelícula sobre una superficie de un sustrato puede reducirse en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, o en 100 % en comparación con una superficie de un sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña. Preferiblemente, la formación de la biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduce en al menos 10 %. Más preferiblemente, la formación de la biopelícula sobre una superficie de sustrato se reduce en al menos 20 %. Aún más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce en al menos 30 %. Lo más preferible es que la formación de la biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduzca en al menos 90 %, por ejemplo, 100 %. En caso de que el sustrato no comprenda el polipéptido de seda de araña de la invención, es decir, un polipéptido de seda de araña que evite o reduzca la formación de una biopelícula, puede, sin embargo, comprender otro biopolímero que no tenga este efecto.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente de forma experimental si se evita o reduce la formación de la biopelícula en una superficie de un sustrato, por ejemplo, mediante mediciones del recuento de células, mediciones de densidad óptica (OD) u otros métodos tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este sentido nos gustaría referirnos al apartado experimental. Preferiblemente se utilizan mediciones del recuento de células.

Por ejemplo, una superficie de un sustrato está recubierta con un polipéptido de seda de araña. A continuación, la superficie de dicho sustrato se pone en contacto con una solución microbiana. Como control se utiliza un sustrato sin recubrimiento. El sustrato recubierto y el sustrato no recubierto (control) se incuban con la solución microbiana en las mismas condiciones, lo que generalmente permite la formación de una biopelícula, por ejemplo, entre 5 a 36 horas y/o entre 20 °C (temperatura ambiente) y 35 °C. Después de retirar la solución microbiana del sustrato recubierto y del sustrato no recubierto (control), se determina la cantidad de microorganismos que crecen en la superficie del sustrato recubierto y del sustrato no recubierto (control) y se comparan entre sí. En un enfoque alternativo, se produce un sustrato que comprende un polipéptido de seda de araña. Luego, la superficie del sustrato que comprende el polipéptido de seda de araña se pone en contacto con una solución microbiana. Como control, se utiliza un sustrato que no comprende un polipéptido de seda de araña. El sustrato que comprende el polipéptido de seda de araña y el sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña (control) se incuban con la solución microbiana en las mismas condiciones que normalmente permiten la formación de una biopelícula, por ejemplo, entre 5 a 36 horas y/o entre 20 °C (temperatura ambiente) y 35 °C. Después de la eliminación de la solución microbiana del sustrato que comprende el polipéptido de seda de araña y el sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña (control), se determina el número de microorganismos que crecen en la superficie del sustrato que comprende el polipéptido de seda de araña y el sustrato que no comprende el polipéptido de seda de araña (control) y se comparan entre sí.

El término "biopelícula", tal como se utiliza en el presente documento, significa un agregado de microorganismos en donde las células se adhieren entre sí y/o a una superficie. Dichas células frecuentemente están incrustadas dentro de una matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular (EPC). La matriz autoproducida de sustancia polimérica extracelular también se conoce como limo. La "biopelícula" puede definirse alternativamente como un conglomerado de microorganismos que se forma (predominantemente) en la interfaz entre una fase líquida y un sustrato o en la interfaz entre una fase gaseosa y un sustrato. El conglomerado de microorganismos se forma preferiblemente en ambientes acuosos o húmedos en la interfaz entre una fase líquida y un sustrato o en la interfaz entre una fase gaseosa y un sustrato. La biopelícula, por lo general, se forma en la superficie de un sustrato. El término "ambiente acuoso", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una fase líquida que comprende agua. El término "ambiente húmedo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una fase gaseosa que comprende vapor de agua.

En una realización, los microorganismos comprendidos en la biopelícula se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, hongos, algas y protozoos, o cualquier combinación de los mismos. Se prefiere que la combinación esté compuesta predominantemente de bacterias. Preferiblemente, las bacterias comprendidas en la biopelícula son del género *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, y/o *Staphylococcus*. Las bacterias pueden ser especies grampositivas (por ejemplo, *Bacillus* o *Staphylococcus*) y/o especies gramnegativas (por ejemplo, *Escherichia* o *Pseudomonas*).

El término "superficie", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier superficie que sea propensa a la formación de biopelículas y/o adhesión de microorganismos. El término "superficie", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere además a cualquier superficie sobre la que se pueda formar una biopelícula. La superficie puede ser una superficie sólida. La superficie sólida se encuentra, por ejemplo, en baños, por ejemplo, accesorios, lavabos, bañeras, inodoros y depósitos de agua de enjuague, en torres de enfriamiento, en plantas de tratamiento de agua, en tanques de agua, en productos lácteos, plantas de procesamiento de alimentos, en plantas de proceso químicas o farmacéuticas, en instalaciones hospitalarias, en instalaciones para consultorios médicos, en consultorios médicos, en quirófanos o en dispositivos médicos

(por ejemplo, catéteres, dispositivos ortopédicos o implantes). Una superficie propensa a la formación de biopelículas puede ser lisa, estructurada o irregular. Una superficie propensa a la formación de biopelículas también puede ser porosa. Una superficie porosa puede estar presente, por ejemplo, en filtros, como filtros de membrana o textiles. El término "superficie", tal como se utiliza en el presente documento, también se refiere a cualquier superficie (ya sea en un entorno doméstico, industrial o médico) que proporcione una interfaz entre una fase líquida y un sustrato o que proporcione una interfaz entre una fase gaseosa y un sustrato. La superficie permite al menos un contacto intermitente entre el sustrato y el fluido o gas. Los fluidos o gases en contacto con la superficie pueden estar estancados o fluyendo, y pueden fluir de manera intermitente o continua, con reologías laminares, turbulentas o mixtas. Una superficie sobre la cual se forma una biopelícula puede estar seca a veces con contacto esporádico con fluidos, o puede tener cualquier grado de exposición a fluidos, incluyendo la inmersión total. El contacto del fluido con la superficie puede producirse a través de aerosoles u otros medios de transmisión de fluidos en el aire.

El término "sustrato", tal como se utiliza en el presente documento, significa cualquier sustrato que tenga una superficie propensa a la formación de biopelículas y/o adhesión de microorganismos. El término "sustrato", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere además a cualquier sustrato que tenga una superficie sobre la que se pueda formar una biopelícula. El sustrato puede ser un sustrato sólido.

En una realización, el sustrato es un dispositivo. El dispositivo puede seleccionarse del grupo que consiste en un dispositivo médico, un dispositivo de agua potable, un dispositivo de tratamiento de aguas residuales, un dispositivo de calefacción, un dispositivo de ventilación y un dispositivo de aire acondicionado. El término "dispositivo médico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un objeto que no existe en la naturaleza y que se utiliza para examinar y/o tratar a un sujeto, que se inserta o implanta en un sujeto o que se aplica a una superficie de un sujeto. Un dispositivo implantable es aquel que está diseñado para quedar completamente incrustado en el cuerpo sin dejar ninguna estructura fuera del mismo (por ejemplo, una válvula cardíaca). Un dispositivo insertable es aquel que está parcialmente incrustado en el cuerpo, pero tiene una parte destinada a ser externa (por ejemplo, un catéter o un drenaje). Los dispositivos médicos pueden estar destinados a una residencia a corto o largo plazo donde se encuentren ubicados. Un implante de cadera, por ejemplo, está previsto para su uso durante varios años. Por el contrario, un expansor de tejido puede ser necesario sólo durante unos pocos meses y se retira después. Los dispositivos insertables tienden a permanecer en su lugar durante menos tiempo que los dispositivos implantables, en parte porque entran en mayor contacto con microorganismos que pueden colonizarlos. El sujeto puede ser un ser humano o un animal.

En una realización preferida, el dispositivo médico se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo médico extracorpóreo, un implante y un catéter. El término "implante", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier objeto destinado a ser colocado en un cuerpo humano o animal que no sea un tejido vivo. Los implantes incluyen objetos de origen natural que se han procesado de manera que sus tejidos vivos se han desvitalizado. Por ejemplo, los injertos óseos se pueden procesar de manera que se eliminen sus células vivas, pero se conserve su forma para que sirva como plantilla para el crecimiento de hueso de un huésped. Como otro ejemplo, el coral natural se puede procesar para obtener preparaciones de hidroxiapatita que se pueden aplicar al cuerpo para ciertas terapias ortopédicas y dentales. Un implante también puede ser un artículo que comprende componentes artificiales. El término "implante" puede aplicarse a todo el espectro de dispositivos médicos destinados a ser colocados en el cuerpo humano o animal. El implante se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un stent, un implante de cóclea, un implante de microchip, un implante dental y un implante de tejido blando, preferiblemente un implante de silicona, más preferiblemente un implante mamario. Además, el dispositivo médico extracorpóreo se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en una máquina de soporte vital, una máquina corazón-pulmón y un dispositivo de diálisis. En una realización, el sustrato se selecciona del grupo que consiste en un sustrato inerte sintético, un sustrato inerte inorgánico y un sustrato de origen natural. El término "sustrato inerte sintético", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a un sustrato que ha sido fabricado o creado de otra manera por seres humanos, a diferencia de los que se encuentran en la naturaleza. La palabra "sintético" también significa elaborado artificialmente en el contexto de la presente invención. El término "sustrato inerte inorgánico", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a un sustrato que no contiene hidrocarburo como elemento principal (excepto carbonatos, cianuros y cianatos), es decir, materia distinta a la vegetal o animal, es decir, no de origen biológico. El término "sustrato de origen natural", tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, se refiere a un sustrato que existe en la naturaleza, que, sin embargo, puede modificarse y procesarse adicionalmente, por ejemplo, mediante blanqueo, lavado, estiramiento, hilado, etc., siempre que la modificación no altere significativamente la estructura polimérica del sustrato.

En una realización preferida, (i) el sustrato inerte sintético se selecciona del grupo que consiste en poliéster, poliestireno, poliamida (PA), poliamida, politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliuretano (PU), silicona, una mezcla de poliuretano y polietilenglicol (elastano), polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE) y polietileno de alto rendimiento (HPPE), (ii) el sustrato inerte inorgánico se selecciona del grupo que consiste en vidrio, carbono, cerámica, metal, zafiro, diamante y semiconductor, o (iii) el sustrato de origen natural se selecciona del grupo que consiste en queratina, colágeno, celulosa, algodón, dientes, hueso, piel, cabello, uñas, seda y tejido. En una realización más preferida, el material de origen natural es seda, por ejemplo, seda de araña. El sustrato natural también puede trasplantarse. El trasplante puede seleccionarse

del grupo que consiste en un trasplante de corazón, un trasplante de riñón y un trasplante de hígado. El sustrato inerte sintético, el sustrato inerte inorgánico o el sustrato de origen natural pueden tener la forma de una lámina, o pueden tener la forma de una fibra, un hilo que comprende la fibra, un hilo retorcido que comprende la fibra, o una tela/textil que comprende la fibra. Por ejemplo, el sustrato inerte sintético puede ser una lámina de silicona o un tejido/textil de poliéster. El sustrato natural puede ser un tejido/textil de algodón.

En una realización, el polipéptido de seda de araña está en forma de recubrimiento. En una realización preferida, el polipéptido de seda de araña está recubierto sobre la (al menos una) superficie del sustrato. En particular, el polipéptido de seda de araña recubre la (al menos una) superficie del sustrato y de ese modo evita o reduce la formación de biopelículas sobre el mismo. El término "recubrimiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier capa que cubra una superficie. El polipéptido de seda de araña que se va a recubrir puede estar en forma de aerosol, líquido, pasta, semisólido o sólido. Además, el recubrimiento se puede aplicar como un hidrogel, un aerosol o un líquido y se solidifica formando un recubrimiento sólido. Se prefiere que el recubrimiento cubra completamente la (al menos una) superficie del sustrato. El recubrimiento tiene preferiblemente un espesor de entre 1 nm y 1000 µm, preferiblemente 40 nm y 50 µm, más preferiblemente entre 0.1 µm y 10 µm y lo más preferiblemente entre 0.5 µm y 5 µm. El recubrimiento se puede lograr mediante inmersión y/o pulverización. El recubrimiento es preferiblemente una película. En una realización, el recubrimiento está formado por una composición que comprende un polipéptido de seda de araña y un disolvente. La composición puede ser una solución, una suspensión y/o una emulsión. La composición también puede ser un hidrogel. La solución puede ser una solución acuosa, una solución acuosa tamponada o una solución orgánica. El disolvente puede ser agua (H₂O), un tampón acuoso o un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido fórmico y hexafluorisopropanol (HFIP). La concentración del polipéptido de seda de araña en la composición, por ejemplo, solución, puede estar en el rango de 0.1 % (p/v) a 30 % (p/v). Preferiblemente, la concentración del polipéptido de seda de araña en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 20 % (p/v). Más preferiblemente, la concentración del polipéptido de seda de araña en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 10 % (p/v). Lo más preferible es que la concentración del polipéptido de seda de araña en la composición, por ejemplo, la solución, esté en el rango de 0.8 % (p/v) a 5 % (p/v).

Como se mencionó anteriormente, en una realización, el polipéptido de seda de araña está en forma de recubrimiento. En particular, el polipéptido de seda de araña recubre la (al menos una) superficie del sustrato y de ese modo evita o reduce la formación de biopelículas sobre el mismo. En una realización alternativa, el sustrato comprende el polipéptido de seda de araña. En particular, el polipéptido de seda de araña está incluido en el sustrato y de ese modo evita o reduce la formación de biopelículas sobre el mismo. El sustrato puede comprender al menos 0.1 % (p/v), 1 % (p/v), 10 % (p/v), 20 % (p/v), 30 % (p/v), 40 % (p/v), 50 % (p/v), 60 % (p/v), 70 % (p/v), 80 % (p/v), 90 % (p/v), 95 % (p/v), 98 % (p/v), 99 % (p/v) o 100 % (p/v) del polipéptido de seda de araña. Preferiblemente, el sustrato comprende al menos 1 % (p/v) del polipéptido de seda de araña. Más preferiblemente, el sustrato comprende al menos 2 % (p/v) del polipéptido de seda de araña. Aún más preferiblemente, el sustrato comprende al menos 10 % (p/v) del polipéptido de seda de araña. Lo más preferible es que el sustrato comprenda al menos 90 % (p/v), por ejemplo 100 % (p/v), del polipéptido de seda de araña. En el último caso, el sustrato consiste en el polipéptido de seda de araña. El sustrato que comprende el polipéptido de seda de araña puede seleccionarse del grupo que consiste en una fibra, un hilo que comprende la fibra, un hilo retorcido que comprende la fibra, una tela/textil que comprende la fibra. En una realización alternativa, el sustrato no comprende un polipéptido de seda de araña. En caso de que el sustrato no comprenda el polipéptido de seda de araña, es decir, un polipéptido de seda de araña que evite o reduzca la formación de una biopelícula, puede, sin embargo, comprender otro polipéptido de seda de araña que no tenga este efecto.

En una realización, el polipéptido de seda de araña puede constar de entre 6 a 3000 aminoácidos, más preferiblemente de entre 30 a 1500 aminoácidos, incluso más preferiblemente de entre 250 a 1200 aminoácidos, y lo más preferiblemente de entre 500 a 1000 aminoácidos. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos dos unidades repetitivas idénticas. Más preferiblemente, el polipéptido comprende entre 2 y 100 unidades repetitivas, es decir, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 unidades repetitivas. Las unidades repetitivas en el polipéptido pueden ser iguales (idénticas) o diferentes. Se prefiere que la misma unidad repetitiva (idéntica) se utilice en el polipéptido al menos 2 veces. Se prefiere además que el polipéptido comprenda o consista en al menos 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, preferiblemente al menos 95 % y más preferiblemente 100 % de unidades repetitivas.

En una realización preferida, el polipéptido de seda de araña es un polipéptido de seda de araña recombinante. El polipéptido de seda de araña puede ser un polipéptido de seda ampulado mayor, tal como un polipéptido de seda de *dragline*, un polipéptido de seda ampulado menor o un polipéptido de seda flageliforme de una araña de tela orbe (por ejemplo, *Araneidae* o *Araneoids*) La araña de tela orbe puede seleccionarse del grupo que consiste en *Araneus diadematus*, *Nephila clavipes*, y *Latrodectus hesperus* (*Latrodectus hesperus*).

Preferiblemente, el polipéptido de seda de araña (recombinante) comprende al menos dos unidades repetitivas idénticas. Se prefiere que las unidades repetitivas se seleccionen independientemente del grupo que consiste en el módulo A (SEQ ID NO: 1) o variantes del mismo, módulo C (SEQ ID NO: 2) o variantes del mismo, módulo C^{Cys} (SEQ ID NO: 3) y el módulo Q (SEQ ID NO: 4) o variantes de las mismas. Módulo C^{Cys} (SEQ ID NO: 3) es una variante del módulo C (SEQ ID NO: 2). En este módulo, el aminoácido S (Ser) en la posición 25 ha sido reemplazado por el aminoácido C (Cys).

Una variante del módulo A, C o Q difiere del módulo de referencia A, C o Q del que se deriva en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (es decir, sustituciones, adiciones, inserciones, deleciones, truncamientos N-terminales y/o truncamientos C-terminales).

Una variante de módulo de este tipo puede caracterizarse alternativa o adicionalmente por un cierto grado de identidad de secuencia con el módulo de referencia del que se deriva. Por lo tanto, una variante del módulo A, C o Q tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9 % con el respectivo módulo de referencia A, C o Q. Preferiblemente, la identidad de secuencia se extiende a lo largo de un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 27, 28, 30, 34, 35 o más aminoácidos, preferiblemente a lo largo de toda la longitud del respectivo módulo de referencia A, C o Q.

Se prefiere particularmente que la identidad de secuencia sea al menos 80 % en toda la longitud, sea al menos 85 % en toda la longitud, sea al menos 90 % en toda la longitud, sea al menos 95 % en toda la longitud, sea al menos 98 % en toda la longitud o sea al menos 99 % en toda la longitud del respectivo módulo de referencia A, C o Q. Además, se prefiere particularmente que la identidad de secuencia sea al menos 80 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 85 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, sea al menos 90 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, es al menos 95 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, es al menos 98 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos, o es al menos 99 % en un tramo continuo de al menos 5, 10, 15, 18, 20, 24, 28 o 30 aminoácidos del respectivo módulo de referencia A, C o Q.

Un fragmento (o variante de delección) del módulo A, C o Q tiene preferiblemente una delección de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en su extremo N y/o en su extremo C. La eliminación también puede ser interna.

Además, la variante o fragmento del módulo A, C o Q solo se considera una variante o fragmento del módulo A, C o Q dentro del contexto de la presente invención, si las modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos en donde se basa la variante o fragmento no afectan negativamente la capacidad del polipéptido de seda de araña para evitar o reducir la formación de una biopelícula. El experto en la técnica puede evaluar fácilmente si el polipéptido de seda de araña que comprende una variante o fragmento del módulo A, C o Q todavía es capaz de evitar o reducir la formación de una biopelícula, por ejemplo, recubriendo un sustrato con una composición que comprende un polipéptido de seda de araña que comprende una variante o fragmento del módulo A, C o Q y un disolvente, incubando el sustrato recubierto con una solución microbiana y realizando mediciones de recuento de células o mediciones de densidad óptica (OD) (véase el ejemplo descrito anteriormente y la sección experimental).

Preferiblemente, el polipéptido de seda de araña (recombinante) comprende al menos una unidad no repetitiva (NR). Se prefiere que la unidad NR se seleccione del grupo que consiste en NR3 (SEQ ID NO: 5) o variantes de la misma, NR4 (SEQ ID NO: 6) o variantes de la misma, NR5 (SEQ ID NO: 7) o variantes de la misma, y NR6 (SEQ ID NO: 8) o variantes de las mismas. La unidad NR3 (SEQ ID NO: 5) se basa en la secuencia de aminoácidos del ADF-3 de la araña. *Araneus diadematus* y la unidad NR4 (SEQ ID NO: 6) se basa en la secuencia de aminoácidos del ADF-4 de la araña *Araneus diadematus* (Documento WO 2006/008163). Además, la unidad NR5 (SEQ ID NO: 7) y la unidad NR6 (SEQ ID NO: 8) se deriva de *Latrodectus hesperus*.

Una variante de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 difiere de la unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 de referencia de la que se deriva en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 o 30 cambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos (es decir, intercambios, inserciones, deleciones, truncamientos N-terminales y/o truncamientos C-terminales). Una variante de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 de este tipo puede caracterizarse alternativa o adicionalmente por un cierto grado de identidad de secuencia con la unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 de referencia de la que se deriva. De este modo, una variante de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 tiene una identidad de secuencia de al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 99.9 % con la respectiva unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 de referencia. Preferiblemente, la identidad de secuencia se extiende a lo largo de un tramo continuo de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más aminoácidos, preferiblemente a lo largo de toda la longitud de la respectiva unidad de referencia NR3, NR4, NR5 o NR6.

Un fragmento (o variante de delección) de una unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 tiene preferiblemente una delección de hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 aminoácidos en su extremo N y/o en su extremo C. La eliminación también puede ser interna.

Además, la variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 solo se considera una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 dentro del contexto de la presente invención, si las modificaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos en donde se basa la variante o fragmento no afectan negativamente la capacidad de un polipéptido de seda de araña para evitar o reducir la formación de una biopelícula. El experto en la técnica puede evaluar fácilmente si el polipéptido de seda de araña que comprende una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 todavía es capaz de evitar o reducir la formación de una biopelícula, por ejemplo, recubriendo un sustrato con una composición que comprende un polipéptido de seda de araña que comprende una variante o fragmento de unidad NR3, NR4, NR5 o NR6 y un disolvente, incubando el sustrato recubierto con una solución microbiana y realizando mediciones de recuento de células o mediciones de densidad óptica (OD) (véase el ejemplo descrito anteriormente y la sección experimental).

Más preferiblemente, el polipéptido de seda de araña (recombinante) se selecciona del grupo que consiste en $(C)_m$, $(C^{Cys})_m$, $(C)_m C^{Cys}$, $(C)_m NR_z$, $NR_z(C)_m$, $NR_z(C)_m NR_z$, $(AQ)_m$, y $(AQ)_m NR_z$, en donde m es un número entero de 8 a 96, es decir, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96, z es un número entero de 1 a 3, es decir, 1, 2 o 3, y NR representa una unidad no repetitiva.

Lo más preferible es que el polipéptido de seda de araña (recombinante) se seleccione del grupo que consiste en $C_{16}NR_4$, $C_{32}NR_4$, $(AQ)_{12}NR_3$, $(AQ)_{24}NR_3$, $(AQ)_{12}$, $(AQ)_{24}$, C_{16} , C_{32} , C_{48} , $C_{16}C^{Cys}$, $C_{32}C^{Cys}$, y $C_{48}C^{Cys}$.

El polipéptido de seda de araña se utiliza en el presente documento para hacer que un sustrato, en particular una superficie de sustrato sea repelente de biopelículas.

También se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un sustrato que evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato que comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- (ii) recubrir la composición sobre la superficie de dicho sustrato.

En una realización, el método comprende además el paso de:

- (iii) secar la superficie del sustrato recubierto con la composición.

Un experto en la técnica entenderá que, al llevar a cabo el método anterior, en particular el paso (ii), o el paso (ii) y el paso (iii), se produce un sustrato recubierto con un biopolímero.

El término "evita la formación de una biopelícula sobre una superficie de dicho sustrato", como se utiliza en el presente documento, significa que no se forma ninguna biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato no recubierto con un biopolímero. El término "reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato", como se utiliza en el presente documento, significa que se forma menos biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato no recubierto con un biopolímero. La formación de una biopelícula sobre una superficie de dicho sustrato puede reducirse en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, o en 100 % en comparación con una superficie de un sustrato que no comprende un biopolímero. Preferiblemente, la formación de una biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduce en al menos 10 %. Más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce en al menos 20 %. Aún más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce en al menos 30 %. Lo más preferible es que la formación de una biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduzca al menos 90 %, por ejemplo, 100 %. En caso de que el sustrato no esté recubierto con un biopolímero, es decir, un biopolímero que evite o reduzca la formación de una biopelícula, puede, sin embargo, estar recubierto con otro biopolímero que no tenga este efecto.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente de forma experimental si se evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato, por ejemplo, mediante mediciones del recuento de células o mediciones de densidad óptica (OD). En este sentido nos gustaría referirnos al apartado experimental. Preferiblemente se utilizan mediciones del recuento de células.

Por ejemplo, una superficie de dicho sustrato está recubierta con un biopolímero. A continuación, la superficie de dicho sustrato se pone en contacto con una solución microbiana. Como control se utiliza un sustrato sin recubrimiento. El sustrato recubierto y el sustrato no recubierto (control) se incuban con la solución microbiana en las mismas condiciones que permiten la formación de una biopelícula, por ejemplo, entre 5 a 36 horas y entre 20 °C (temperatura ambiente) y 35 °C. Después de retirar la solución microbiana del sustrato recubierto

y del sustrato no recubierto (control), se determina el número de microorganismos que crecen en la superficie del sustrato recubierto y del sustrato no recubierto (control) y se comparan entre sí.

El recubrimiento puede ser una película. El biopolímero que se va a recubrir puede estar en forma de aerosol, líquido, pasta, semisólido o sólido. El recubrimiento se consigue preferiblemente mediante inmersión y/o pulverización. Por ejemplo, el "recubrimiento por inmersión" puede realizarse de la siguiente manera: (i) sumergir un sustrato en un recipiente que contiene una composición que comprende un biopolímero y un solvente (ii) incubar el sustrato con la composición que comprende el biopolímero y el solvente en el tanque, por ejemplo, durante un período entre 0.1 seg a 10 min, (iii) retirar el sustrato que está recubierto en su superficie con el biopolímero de la composición. El sustrato que está recubierto en su superficie con el biopolímero se puede secar aún más, por ejemplo, mediante secado forzado, horneado, utilizando una cámara de calor, radiación o un ventilador (a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas). También se puede secar a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. Por ejemplo, el "recubrimiento por pulverización" puede realizarse de la siguiente manera: (i) transferir una composición que comprende un biopolímero y un disolvente a una lata de aerosol, un dispositivo de pulverización o un nebulizador, y (ii) distribuir la composición que comprende el biopolímero y el disolvente sobre el sustrato. El sustrato que está recubierto en su superficie con el biopolímero se puede secar aún más, por ejemplo, mediante secado forzado, horneado, utilizando una cámara de calor, radiación o un ventilador (a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas). También puede secarse a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. Además, el recubrimiento se puede aplicar como un hidrogel, un aerosol o un líquido y se solidifica formando un recubrimiento sólido.

Como se mencionó anteriormente, el recubrimiento está formado por una composición que comprende un biopolímero y un disolvente. La composición puede ser una solución, una suspensión o una emulsión. La composición también puede ser un hidrogel. La solución puede ser una solución acuosa o una solución acuosa tamponada. El disolvente puede ser agua (H₂O), un tampón acuoso o un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido fórmico y hexafluorisopropanol (HFIP). La concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, la solución, puede estar en el rango de 0.1 % (p/v) a 30 % (p/v). Preferiblemente, la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 20 % (p/v). Más preferiblemente, la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 10 % (p/v). Lo más preferible es que la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, la solución, esté en el rango de 0.8 % (p/v) a 5 % (p/v).

En cuanto a la definición del término "biopelícula", el término "biopolímero", las realizaciones preferidas del "biopolímero", la definición del término "superficie", la definición del término "sustrato", las realizaciones preferidas del "sustrato", y la definición del término "recubrimiento", se hace referencia al primer aspecto de la presente invención.

El método se utiliza para producir un sustrato que repele la biopelícula. Dicho método comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- (ii) recubrir la composición sobre la superficie de dicho sustrato.

En una realización, el método comprende además el paso de:

- (iii) secar la superficie del sustrato recubierto con la composición.

Es en particular la superficie del sustrato la que se vuelve repelente de biopelículas.

También se describe en el presente documento, pero no está abarcado por la presente invención, un método para producir un sustrato que evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato que comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- (ii) formar dicho sustrato a partir de la composición.

En una realización, el método comprende además el paso de:

- (iii) secar el sustrato formado a partir de la composición.

Un experto en la técnica entenderá que, al llevar a cabo el método anterior, en particular el paso (ii), o el paso (ii) y el paso (iii), se produce un sustrato que comprende un biopolímero.

El término "evita la formación de una biopelícula sobre una superficie de dicho sustrato", como se utiliza en el presente documento, significa que no se forma ninguna biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato, en donde el sustrato no comprende un biopolímero. El término "reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato", como se utiliza en el presente documento, significa que se forma menos

biopelícula en comparación con una superficie de un sustrato, en donde el sustrato no comprende un biopolímero. La formación de una biopelícula sobre una superficie de un sustrato puede reducirse en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, o en 100 % en comparación con una superficie de un sustrato que no comprende un biopolímero. Preferiblemente, la formación de una biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduce en al menos 10 %. Más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce en al menos 20 %. Aún más preferiblemente, la formación de una biopelícula se reduce en al menos 30 %. Lo más preferible es que la formación de una biopelícula sobre una superficie de un sustrato se reduzca al menos 90 %, por ejemplo, 100 %. En caso de que el sustrato no comprenda un biopolímero, es decir, un biopolímero que evite o reduzca la formación de una biopelícula, puede, sin embargo, comprender otro biopolímero que no tenga este efecto.

El experto en la técnica puede determinar fácilmente de forma experimental si se evita o reduce la formación de una biopelícula en una superficie de dicho sustrato, por ejemplo, mediante mediciones de recuento de células, mediciones de densidad óptica (OD) u otros métodos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este sentido nos gustaría referirnos al apartado experimental. Preferiblemente se utilizan mediciones del recuento de células. Por ejemplo, se produce un sustrato que comprende un biopolímero. Luego, la superficie del sustrato que comprende el biopolímero se pone en contacto con una solución microbiana. Como control, se utiliza un sustrato que no comprende un biopolímero. El sustrato que comprende el biopolímero y el sustrato que no comprende el biopolímero (control) se incuban con la solución microbiana en las mismas condiciones que permiten la formación de una biopelícula, por ejemplo, entre 5 a 36 horas y/o entre 20 °C (temperatura ambiente) y 35 °C. Después de la eliminación de la solución microbiana del sustrato que comprende el biopolímero y el sustrato que no comprende el biopolímero (control), se determina el número de microorganismos que crecen en la superficie del sustrato que comprende el biopolímero y el sustrato que no comprende el biopolímero (control) y se comparan entre sí.

En una realización, el sustrato se forma mediante extrusión, prensado y/o vertido. El sustrato formado puede seleccionarse del grupo que consiste en una fibra, un hilo que comprende la fibra, un hilo retorcido que comprende la fibra y un tejido que comprende la fibra.

Como se mencionó anteriormente, el sustrato está formado por una composición que comprende un biopolímero y un disolvente. La composición puede ser una solución, una suspensión o una emulsión. La composición también puede ser un hidrogel. La solución puede ser una solución acuosa, una solución acuosa tamponada o una solución orgánica. El disolvente puede ser agua (H₂O), un tampón acuoso o un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido fórmico y hexafluorisopropanol (HFIP). La concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, la solución, puede estar en el rango de 0.1 % (p/v) a 30 % (p/v). Preferiblemente, la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 20 % (p/v). Más preferiblemente, la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, solución, está en el rango de 0.5 % (p/v) a 10 % (p/v). Lo más preferible es que la concentración del biopolímero en la composición, por ejemplo, la solución, esté en el rango de 0.8 % (p/v) a 5 % (p/v).

Como se mencionó anteriormente, el sustrato está formado por una composición que comprende un biopolímero y un disolvente. El sustrato formado puede comprender al menos 0.1 % (p/v), 1 % (p/v), 10 % (p/v), 20 % (p/v), 30 % (p/v), 40 % (p/v), 50 % (p/v), 60 % (p/v), 70 % (p/v), 80 % (p/v), 90 % (p/v), 95 % (p/v), 98 % (p/v), 99 % (p/v) o 100 % (p/v) del biopolímero. Preferiblemente, el sustrato comprende al menos 1 % (p/v) del biopolímero. Más preferiblemente, el sustrato comprende al menos 2 % (p/v) del biopolímero. Aún más preferiblemente, el sustrato comprende al menos 10 % (p/v) del biopolímero. Lo más preferible es que el sustrato comprenda al menos 90 % (p/v), por ejemplo 100 % (p/v), del biopolímero. En este último caso, el sustrato está constituido por el biopolímero.

En cuanto a la definición del término "biopelícula", el término "biopolímero", las realizaciones preferidas del "biopolímero", la definición del término "superficie", la definición del término "sustrato", y las realizaciones preferidas del "sustrato", se hace referencia al primer aspecto de la presente invención.

El método se utiliza para producir un sustrato que repele la biopelícula. Dicho método comprende los pasos de:

- (i) proporcionar una composición que comprende un biopolímero y un disolvente, y
- (ii) formar dicho sustrato a partir de la composición.

En una realización, el método comprende además el paso de:

- (iii) secar el sustrato formado a partir de la composición.

Es en particular la superficie del sustrato la que se vuelve repelente de biopelículas.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 muestra la reducción de la formación de biopelículas debido al recubrimiento con un biopolímero. Se muestra en particular la reducción de la formación de biopelículas en diferentes sustratos (poliestireno, silicona de textura rugosa, politetrafluoroetileno (PTFE) y acero inoxidable/cromado) recubiertos con una solución de seda acuosa, un hidrogel de seda o una solución de seda de ácido fórmico. Se logró una reducción de la formación de biopelículas del 75 % (poliestireno recubierto con una solución de seda de ácido fórmico), 35 % (poliestireno recubierto con un hidrogel de seda), 41 % (silicona de textura rugosa recubierta con una solución de seda acuosa), 13 % (politetrafluoroetileno (PTFE) recubierto con una solución de seda acuosa), 40 % (politetrafluoroetileno (PTFE) recubierto con una solución de seda acuosa) y 66 % (acero inoxidable recubierto con una solución de seda de ácido fórmico). Para determinar la reducción de la formación de biopelículas, se midió el valor medio del número de células de 16 muestras de cada experimento (poliestireno, silicona de textura rugosa, politetrafluoroetileno (PTFE) y sustratos de acero inoxidable recubiertos con una solución acuosa de proteína C₁₆, una solución de ácido fórmico de proteína C₁₆ y un hidrogel de proteína C₁₆) se determinó y se calculó frente al valor medio del número de células de los sustratos no recubiertos. El sustrato no recubierto corresponde a una formación normal de biopelícula (valor de 0 %). Una reducción de la formación de biopelículas de, por ejemplo, 75 % se muestra como un valor de -75 %.

Ejemplos

Para determinar la formación de una biopelícula en la superficie de un sustrato, se aplicaron mediciones de recuento celular. La superficie de diferentes sustratos (poliestireno, politetrafluoroetileno, silicona y acero inoxidable) se recubrió con un biopolímero de seda. A continuación, la superficie de dichos sustratos se puso en contacto con una solución microbiana. Como control, se utilizó un sustrato sin recubrimiento. El sustrato recubierto y el sustrato no recubierto (control o blanco) se incubaron con la solución microbiana entre 5 a 10 horas a 30 °C, permitiendo la formación de una biopelícula. Después de retirar la solución microbiana del sustrato recubierto y del sustrato sin recubrimiento (control o blanco), se determinó la cantidad de microorganismos cultivados en la superficie del sustrato recubierto y se comparó con la cantidad de microorganismos cultivados en la superficie del sustrato sin recubrimiento (control o blanco).

Ejemplo 1: Preparación de la solución de recubrimiento/hidrogel

La proteína C₁₆ se preparó como se describe en el documento WO 2006/008163.

a) Elaboración de una solución acuosa de proteína C₁₆:

La proteína C₁₆ se disolvió en 6 M GdmSCN, se diluyó con 5 mM Tris/HCl pH 8.5 a 0.6 M GdmSCN. La solución se filtró de forma cruzada contra 4 M de urea (10-15x) y luego se filtró de forma cruzada contra 5 mM de Tris/HCl pH 8.5 (Crossflow; Vivaflow 10-20x) hasta que no se detectó urea.

Alternativamente, la proteína C₁₆ se disolvió en 6 M GdmSCN, se diluyó con 5 mM Tris/HCl pH 8.5 a 0.6 M GdmSCN. La solución de proteína se filtró de forma cruzada contra 5 mM Tris/HCl pH 8.5 (Crossflow Vivaflow 10-20x) hasta que no se detectó GdmSCN.

Se llenaron 14 ml de solución acuosa de proteína C₁₆ (solución de proteína C₁₆ en Tris 5 mM, pH 8.5; concentración de proteína 12.5 g/l) hasta un volumen final de 17 ml con agua desionizada hasta una concentración final de proteína de 10 g/l.

b) Elaboración de un hidrogel de proteína C₁₆:

Se llenaron 30 ml de una solución de proteína C₁₆ (solución de proteína C₁₆ en Tris 5 mM, pH 8.5; concentración de proteína 12.5 g/l) con 7.5 ml de Tris 5 mM hasta una concentración final de proteína de 10 g/l. A continuación, la solución de proteína C₁₆ se esterilizó en autoclave en un matraz Schott de 250 ml (autoclave Systec VX-100) para formar un hidrogel.

c) Preparación de solución de ácido fórmico proteico C₁₆:

Se mezclaron 212.9 mg de proteína C₁₆ (γ-esterilizada) con 21.2 ml de ácido fórmico al 98 % (Carl-Roth, #4742.2, lote 42422005) mediante rotación durante un período de 30 min a temperatura ambiente, lo que dio como resultado una concentración final de proteína de 10 g/l.

Alternativamente, se disolvieron 100 mg de proteína C₁₆ en 10 ml de ácido fórmico al 98 % (Carl-Roth, #4742.2, lote 42422005) mediante rotación durante un período de 30 min a temperatura ambiente, dando como resultado una concentración final de proteína de 10 g/l.

Ejemplo 2: Preparación de los sustratos

Los diferentes sustratos se prepararon de la siguiente manera:

- a) Preparación de los sustratos de politetrafluoretileno (PTFE): Se perforaron parches de PTFE con un diámetro de 5 mm utilizando un perforador comercial y se pegaron al fondo de una placa de 96 pocillos utilizando silicona Sylgard 184 (compuesto suizo).
- 5 b) Preparación de los sustratos de acero inoxidable: se perforaron parches de acero inoxidable (número de producto FK110250/1, 300649549, GoodFellow) con un diámetro de aproximadamente 5 mm utilizando un perforador comercial, se aplanaron con un martillo y se pegaron al fondo de una placa de 96 pocillos utilizando silicona Sylgard 184 (compuesto suizo).
- c) Preparación de sustratos de poliestireno: se utilizaron como sustrato los pocillos sin tratar de una placa de 96 pocillos de poliestireno.
- 10 Para recubrir los sustratos de politetrafluoretileno, acero inoxidable y poliestireno con un hidrogel de proteína C₁₆, se pipetearon 75 µl de un hidrogel de proteína C₁₆ al 1 % en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se secaron durante la noche. Al día siguiente, se pipetearon 50 µl de metanol en cada pocillo y se secaron a 60 °C en el horno. Los pocillos resultantes se recubrieron homogéneamente con una película fina. Se utilizaron pocillos no tratados como control.
- 15 Para recubrir los sustratos de politetrafluoretileno, acero inoxidable y poliestireno con una solución acuosa de proteína C₁₆, se pipetearon 120 µl de una solución acuosa de proteína C₁₆ al 1 % en los pocillos de la placa y se secaron durante la noche. Al día siguiente, se pipetearon 50 µl de metanol en cada pocillo y se secaron a 60 °C en el horno. Los pocillos resultantes se recubrieron homogéneamente con una fina película transparente. Se utilizaron pocillos no tratados como control.
- 20 Para recubrir los sustratos de politetrafluoretileno, acero inoxidable y poliestireno con una solución de ácido fórmico de proteína C₁₆, se pipetearon 70 µl de solución de ácido fórmico de proteína C₁₆ al 1 % en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se secaron durante la noche. Los pocillos resultantes se recubrieron homogéneamente con una fina película transparente. Se utilizaron pocillos no tratados como control.
- d) Preparación de sustratos de silicona (textura rugosa):
- 25 Para el recubrimiento de parches de silicona texturizados con una solución acuosa de proteína C₁₆, se cortaron parches de silicona de una lámina de silicona texturizada hasta un diámetro que encajaba en los pocillos y posteriormente se lavaron con etanol. Los parches de silicona se unieron a un portaobjetos de vidrio y se recubrieron por inmersión en la solución acuosa de proteína C₁₆. Por lo tanto, los portaobjetos de vidrio con parches de silicona adheridos se sumergieron en la solución acuosa de proteína C₁₆ al 1 % durante un período de 2 minutos y posteriormente se secaron durante un período de 5 minutos. Este paso de inmersión y secado se repitió tres veces. Los portaobjetos de vidrio con parches de silicona adheridos se secaron durante un período de 5 minutos a 60 °C. Luego, los portaobjetos de vidrio con parches de silicona adheridos se sumergieron en un tampón de fosfato (0,5 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ durante un período de 30 s y se seca durante un período de 30 s. Después de un paso de lavado con H₂O desionizada (10 s) y un paso de secado (30 s), los sustratos de silicona se retiraron de los portaobjetos de vidrio y se pegaron al fondo de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos usando silicona Sylgard 184 (compuesto suizo). Los parches de silicona sin tratar sirvieron como control.
- 30
- 35
- 40 Para el recubrimiento de parches de silicona texturizados con una solución de ácido fórmico de proteína C₁₆, se unieron parches de silicona a un portaobjetos de vidrio y se recubrieron por inmersión en la solución de ácido fórmico de proteína C₁₆. Por lo tanto, los portaobjetos de vidrio con parches de silicona adheridos se sumergieron en la solución de ácido fórmico de proteína C₁₆ al 1 % durante un período de 2 minutos y posteriormente se secaron durante un período de 5 minutos. Este paso de inmersión y secado se repitió tres veces. Los portaobjetos de vidrio con parches de silicona adheridos se secaron durante un período de 5 minutos a 60 °C. Luego, los sustratos de silicona se retiraron de los portaobjetos de vidrio y se pegaron al fondo de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos utilizando silicona Sylgard 184 (compuesto suizo). Los parches de silicona sin tratar sirvieron como control.
- 45
- 50 Para el recubrimiento de parches de silicona texturizados con un hidrogel de proteína C₁₆, se cortaron parches de silicona de una lámina de silicona texturizada hasta un diámetro que encajaba en los pocillos y posteriormente se lavaron con etanol. Los parches de silicona se pegaron al fondo de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pocillos utilizando silicona Sylgard 184 (compuesto suizo). Los parches de silicona se recubrieron pipeteando 75 µl de un hidrogel de proteína C₁₆ al 1 % sobre un parche de silicona y se secaron durante la noche. Al día siguiente, se pipetearon 50 µl de metanol en cada parche y se secaron en un horno a 60 °C. Los pocillos resultantes se recubrieron homogéneamente con una película fina. Los parches de silicona sin tratar pegados al fondo de la placa de 96 pocillos sirvieron como control.
- 55 **Ejemplo 3: Determinación de la formación de biopelículas sobre diferentes sustratos recubiertos**

Para comprobar la formación de biopelículas, se recubrieron placas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner bio-one, PS, fondo plano) ensambladas con diferentes sustratos (poliestireno, silicona de textura rugosa,

politetrafluoroetileno (PTFE) y acero inoxidable) con el biopolímero de seda de acuerdo con el ejemplo 2. Como control se utilizaron sustratos sin recubrimiento. Las placas de 96 pocillos se incubaron con un cultivo bacteriano adherente de bacterias formadoras de biopelículas (*Staphylococcus aureus*). Después de la incubación, se determinó la cantidad de células bacterianas cultivadas en las placas de 96 pocillos y se comparó con la cantidad de células bacterianas cultivadas en los respectivos sustratos sin recubrimiento de biopolímero de seda.

En particular, se añadió a las placas de 96 pocillos un inóculo de 200 µl de *Staphylococcus aureus* en medio de cultivo (TSB (caldo de soja triptico) al 0,5 % con peptona dextrosa de levadura). Como control se utilizó medio de cultivo (TSB (caldo de soja triptico) al 0,5 % con peptona dextrosa de levadura sin *Staphylococcus aureus*. Después de la incubación en un agitador de microplacas (100 rpm, 6 h), se eliminó el sobrenadante y los pocillos se lavaron cuidadosamente tres veces con solución fisiológica de NaCl. Después de eliminar el sobrenadante, se agregaron 150 µl de solución de NaCl a cada pocillo y la placa se mezcló completamente (10 min, Vortex) para eliminar las células bacterianas adherentes. Después de una serie de diluciones, las células se colocaron en placas cuadradas de agar tripsídico de soja y se cultivaron durante un período de 16 a 24 horas a 33 °C. La determinación del número de células se realizó contando las colonias con la ayuda de un binocular.

Para determinar la reducción de la formación de biopelículas, se determinó el valor medio del número de células de 16 muestras de cada experimento (poliestireno, silicona de textura rugosa, politetrafluoroetileno (PTFE) y sustratos de acero inoxidable recubiertos con una solución acuosa de proteína C₁₆, solución de ácido fórmico de proteína C₁₆ e hidrogel de proteína C₁₆) y se calculó frente al número de células del valor medio de los sustratos no recubiertos. La Figura 1 muestra la reducción de la formación de biopelículas en diferentes sustratos (poliestireno, silicona de textura rugosa, politetrafluoroetileno (PTFE) y acero inoxidable) recubiertos con una solución acuosa de seda (solución acuosa), un hidrogel de seda (hidrogel) y una solución de seda de ácido fórmico (ácido fórmico). Se logró una reducción de la formación de biopelículas del 75 % (poliestireno recubierto con una solución de seda de ácido fórmico; columna 1), 35 % (poliestireno recubierto con un hidrogel de seda; columna 2), 41 % (silicona de textura rugosa recubierta con una solución de seda acuosa; columna 3), 13 % (politetrafluoroetileno (PTFE) recubierto con una solución de seda acuosa; columna 4), 40 % (politetrafluoroetileno (PTFE) recubierto con una solución de seda acuosa; columna 5) y 66 % (acero inoxidable recubierto con una solución de seda de ácido fórmico; columna 6).

Ejemplo 4: Determinación de la formación de biopelículas sobre un sustrato textil de biopolímero en comparación con un sustrato textil de poliéster y una lámina de silicona recubierta de seda en comparación con una lámina de silicona no recubierta

En este ejemplo, se determinó la formación de biopelículas en un sustrato textil de biopolímero en comparación con un sustrato textil de poliéster. El sustrato textil de biopolímero era un sustrato textil de biopolímero de seda. El biopolímero de seda estaba compuesto 100 % de proteína de seda C₃₂NR4. La proteína de seda se preparó como se describe en el documento WO 2006/008163. Luego, la proteína se procesó en fibras como se describe en el documento WO 2014/037453. Se torcieron tres multifilamentos para formar un hilo utilizando una máquina de torsión de anillos. Este hilo se utilizó para el proceso de tejido. A partir de este material de hilo se tejó un patrón 2D. El tejido de biopolímero de seda resultante se cortó en tres muestras de 5 cm × 5 cm y se esterilizó en autoclave.

Además, se determinó la formación de biopelícula en una lámina de silicona recubierta de seda en comparación con una lámina de silicona no recubierta. Se recubrieron tres muestras de lámina de silicona (5 cm × 5 cm) con 1 % de hidrogel de seda C₁₆. Por lo tanto, las muestras esterilizadas en autoclave se incubaron en 20 ml de hidrogel de seda C₁₆ al 1 % durante 5 minutos. El hidrogel de seda se preparó como se describe en el ejemplo 2. Después de la incubación, las muestras se secaron durante la noche a RT en condiciones estériles. Se utilizaron como control tres muestras de lámina de silicona sin recubrimiento (5 cm × 5 cm esterilizada en autoclave).

Se utilizaron tres muestras de poliéster sin recubrimiento como tejido de prueba PES. Para ello se procesaron tres multifilamentos de poliéster (TWD Fibras GmbH, Deggendorf) para obtener un tejido de punto. El tejido de poliéster resultante se cortó en tres muestras de 5 cm × 5 cm.

Para determinar la reducción de la formación de biopelículas, se aplicó una película líquida delgada (400 µl) que contenía la bacteria *Staphylococcus epidermidis* DSM 18857 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ($1,25 \times 10^4$ células/cm²) a cuatro muestras de sustrato diferentes (5 cm × 5 cm, por triplicado): poliéster sin recubrimiento (textil de prueba PES), textil de biopolímero de seda, lámina de silicona texturizada sin recubrimiento, lámina de silicona texturizada recubierta con biopolímero de seda. Las muestras de sustrato recubiertas con la película líquida que contenía las bacterias se cubrieron posteriormente con una lámina ("Stomacher-Bags") para evitar la desecación. Inmediatamente después de la aplicación de la película líquida que contiene las bacterias, se recogió una muestra cero de la superficie de los sustratos y la lámina de cobertura mediante agitación en vórtex o sonificación en PBS para determinar el recuento bacteriano (UFC) (valor t₀). Las muestras cero y las muestras de sustrato (poliéster sin recubrimiento,

biopolímero textil, lámina de silicona texturizada sin recubrimiento, lámina de silicona texturizada recubierta con biopolímero de seda) se incubaron nuevamente en la película líquida que contenía las bacterias en condiciones húmedas a 37 °C. Después de 24 h, las bacterias se recogieron de la superficie de las muestras de sustrato y la lámina de recubrimiento mediante agitación en vórtex o sonicación en PBS. Las células bacterianas se sembraron para determinar el recuento bacteriano (CFU) (t_{24} -valor). Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1:

Muestra	t_0 [células/cm ²]			t_{24} [células/cm ²]		
Poliéster sin recubrimiento	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
Tejido de biopolímero de seda				$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$	$< 1 \times 10^1$
Lámina de silicona sin recubrimiento	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$7,9 \times 10^2$
Lámina de silicona recubierta con biopolímero de seda				$9,6 \times 10^1$	$4,8 \times 10^1$	$7,2 \times 10^1$

La Tabla 1 muestra que el tejido de biopolímero da como resultado una reducción de la formación de biopelículas de más del 99,99 % en comparación con el poliéster sin recubrimiento. En otras palabras, se evitó casi por completo la formación de una biopelícula sobre el tejido de biopolímero. Con la lámina de silicona recubierta de seda se pudo determinar una reducción de la formación de biopelícula del 93,16 % en comparación con la lámina de silicona sin recubrimiento.

Ejemplo 5: Determinación de la formación de biopelículas en tejidos de algodón y poliéster en comparación con tejidos de biopolímero de seda (*in vitro* e *in vivo*).

En este ejemplo, la formación de biopelículas en tela de algodón y tela de poliéster en comparación con la tela de biopolímero de seda (*in vitro* e *in vivo*) se determinó. La muestra de tejido de biopolímero de seda estaba compuesta 100 % de proteína de seda C₃₂NR4. La proteína de seda se preparó como se describe en el documento WO 2006/008163. Luego, la proteína se procesó en fibras como se describe en el documento WO 2014/037453. Se torcieron tres multifilamentos para formar un hilo utilizando una máquina de torsión de anillos. Este hilo se tomó para el proceso de tejido. El hilo se utilizó en dirección de urdimbre y trama mientras se tejía una tela de tamaño A4. La tela se cortó en muestras de 1,5 cm × 1,5 cm.

Para determinar la reducción de la formación de biopelículas en el tejido de algodón y el tejido de poliéster en comparación con el tejido de biopolímero *in vitro*, se incubaron dos muestras de cada tejido (1,5 cm × 1,5 cm, esterilizadas en autoclave) en 10 ml ($4,3 \times 10^4$ células/ml en solución bacteriana CASO-caldo que contenía *Staphylococcus arlettae* DSM 30634 (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) a temperatura ambiente (RT) durante 5-6 horas con agitación. Después de la incubación, las muestras de tela se lavaron dos veces en PBS (primer paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación a 60 rpm durante 5 min, segundo paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación durante 1 min). Después del primer y segundo paso de lavado, se eliminó el PBS de las muestras frotando las muestras de tela sobre papel tisú esterilizado. Las muestras de tela se aplicaron a placas de agar CASO. Después de la incubación de las placas durante 48 h a 37 °C y durante 36 h a RT (temperatura ambiente), se determinó el número de colonias bacterianas mediante inspección óptica. La muestra con mayor crecimiento bacteriano se estableció en 100 %. La muestra con menor/nulo crecimiento bacteriano se estableció en 0 %. Se utilizaron muestras de tela esterilizadas en autoclave como control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Formación de biopelículas en diferentes muestras de tejidos:

	Muestra 1	Muestra 2
Algodón	4	4
Poliéster	4	4
Biopolímero de seda	0	0
Control negativo	0	0

La Tabla 2 muestra que no se pudo detectar formación de biopelícula en tejido de seda, mientras que el tejido de algodón y el tejido de poliéster exhiben una fuerte formación de biopelícula. Los siguientes símbolos representan la formación de biopelícula: 4: 100 %, 3: 75 %, 2: 50 %, 1: 25 %, 0: 0 % (sin formación de biopelículas).

Para determinar la reducción de la formación de biopelículas en tejidos de algodón y poliéster en comparación con tejidos de biopolímeros de seda *in vivo*, se aplicaron cinco muestras de cada tejido (1,5 cm × 1,5 cm, esterilizadas en autoclave) a la piel humana. Para ello, las muestras de tejido se fijaron con ayuda de un yeso durante un periodo de ocho horas a la piel humana de cinco sujetos de prueba diferentes. Después de retirar los yesos con las muestras de tela de la piel de las personas de prueba, las muestras de tela se lavaron dos veces en PBS (primer paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación a 60 rpm durante 5 min, segundo paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación durante 1 min). Después del primer y segundo paso de lavado, se eliminó el PBS de las muestras secándolas sobre papel tisú esterilizado. La cara de las muestras de tela que daba a la piel se colocó en placas de agar CASO. Después de la incubación a RT durante 36 h, se determinó el número de colonias bacterianas mediante inspección óptica. La muestra con mayor crecimiento bacteriano se estableció en 100 %. La muestra con menor/nulo crecimiento bacteriano se estableció en 0 %. Se utilizaron muestras de tela esterilizadas en autoclave como control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Formación de biopelículas en diferentes sujetos (in vivo):

	Tema 1	Tema 2	Tema 3	Tema 4	Tema 5
Algodón	3	1	3	4	2
Poliéster	4	3	1	2	3
Biopolímero de seda	0	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0	0

La Tabla 3 muestra que no se pudo detectar formación de biopelícula después de la aplicación sobre la piel humana en tela de biopolímero de seda, mientras que la tela de algodón y la tela de poliéster exhiben una formación de biopelícula débil a fuerte. Los siguientes símbolos representan la formación de biopelícula: 4: 100 %, 3: 75 %, 2: 50 %, 1: 25 %, 0: 0 % (sin formación de biopelículas)

Ejemplo 6: Determinación de la formación de biopelículas en tejido de poliéster no recubierto en comparación con tejido de poliéster recubierto con biopolímero de seda

En este ejemplo, se comparó la formación de biopelícula en tejido de poliéster sin recubrimiento con tejido de poliéster recubierto con biopolímero de seda. Las muestras de tejido de poliéster utilizadas para la prueba comparativa se recubrieron con hidrogel de seda C₁₆ al 1 %. Por lo tanto, las muestras esterilizadas en autoclave se incubaron en 20 ml de hidrogel de seda C₁₆ al 1 % durante 5 minutos. El hidrogel de seda se preparó como se describe en el ejemplo 2. Después de la inmersión, las muestras se secaron durante la noche a RT en condiciones estériles.

Para determinar la reducción de la formación de biopelículas en tejidos de poliéster no recubiertos en comparación con tejidos de poliéster recubiertos con biopolímero *in vivo*, se aplicaron a la piel humana dos muestras de tejidos de poliéster sin recubrimiento (1,5 cm × 1,5 cm, esterilizados en autoclave) y dos muestras de tejidos recubiertos de seda. Para ello, las muestras de tejido se fijaron con ayuda de un yeso durante un periodo de 8 horas a la piel humana de cuatro sujetos de prueba diferentes. Después de retirar los yesos con la tela, las muestras de piel de las personas de prueba se lavaron dos veces con PBS (primer paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación a 60 rpm durante 5 min, segundo paso de lavado: 10 ml de PBS con agitación durante 1 min). Después del primer y segundo paso de lavado, se eliminó el PBS de las muestras de tela frotando las muestras sobre papel tisú esterilizado. La cara de las muestras de tela que daba a la piel se colocó en placas de agar CASO. Después de una incubación de 48 h a 37 °C y de 36 h a RT, se determinó el número de colonias bacterianas mediante inspección óptica. La muestra con mayor crecimiento bacteriano se estableció en 100 %. La muestra con menor/nulo crecimiento bacteriano se estableció en 0 %. Se utilizaron muestras de tela esterilizadas en autoclave como control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Formación de biopelículas en tejido de poliéster sin recubrimiento en comparación con tejido de poliéster recubierto con biopolímero (in vivo):

	Tema 1	Tema 2	Tema 3	Tema 4
Poliéster no recubierto	4	3	1	2
Poliéster recubierto	0	0	0	0
Control negativo	0	0	0	0

La Tabla 4 muestra que no se pudo detectar formación de biopelícula en el tejido de poliéster recubierto de seda después de su aplicación sobre la piel humana, mientras que el tejido de poliéster sin recubrimiento presenta una formación de biopelícula débil a fuerte. Los siguientes símbolos representan la formación de biopelícula: 4: 100 %, 3: 75 %, 2: 50 %, 1: 25 %, 0: 0 % (sin formación de biopelículas).

REIVINDICACIONES

1. Uso no terapéutico, *ex vivo* o *in vitro* de un polipéptido de seda de araña para reducir la formación de una biopelícula.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en donde se reduce la formación de la biopelícula en una superficie de un sustrato.
3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la biopelícula es un agregado de microorganismos en donde las células se adhieren entre sí y/o a la superficie del sustrato.
4. El uso de la reivindicación 3, en donde los microorganismos se seleccionan del grupo que consiste en bacterias, hongos, algas y protozoos, o cualquier combinación de los mismos.
- 10 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el polipéptido de seda de araña está en forma de recubrimiento.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde el sustrato es un dispositivo.
7. El uso de la reivindicación 6, en donde el dispositivo se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo médico, un dispositivo de tratamiento de aguas residuales, un dispositivo de calefacción, un dispositivo de ventilación y un dispositivo de aire acondicionado.
- 15 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el sustrato se selecciona del grupo que consiste en un sustrato inerte sintético, un sustrato inerte inorgánico y un sustrato de origen natural.
9. El uso de la reivindicación 8, en donde la
- 20 (i) el sustrato inerte sintético se selecciona del grupo que consiste en poliéster, poliestireno, poliamida (PA), poliaramida, politetrafluoroetileno (PTFE), polietileno (PE), polipropileno (PP), poliuretano (PU), silicona, una mezcla de poliuretano y polietilenglicol (elastano), polietileno de peso molecular ultra alto (UHMWPE) y polietileno de alto rendimiento (HPPE),
- (ii) el sustrato inerte inorgánico se selecciona del grupo que consiste en vidrio, carbono, cerámica, metal, zafiro, diamante y semiconductor, o
- 25 (iii) el sustrato natural se selecciona del grupo que consiste en queratina, colágeno, celulosa, dientes, huesos, piel y tejido.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en donde el sustrato comprende el polipéptido de seda de araña.

Figura 1

