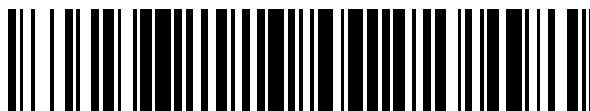


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 815**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2007 E 07841999 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2061488**

54 Título: **Péptidos antimicrobianos dirigidos selectivamente y el uso de los mismos**

30 Prioridad:

06.09.2006 US 842871 P

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

04.09.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US y
C3 JIAN, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ECKERT, RANDAL H.;
YARBROUGH, DANIEL K.;
SHI, WENYUAN;
ANDERSON, MAXWELL H.;
QI, FENGXIA;
HE, JIAN y
MCHARDY, IAN H.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 490 815 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos antimicrobianos dirigidos selectivamente y el uso de los mismos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere al campo de las composiciones antimicrobianas y el tratamiento.

10 **Antecedentes de la Invención**

10 La flora indígena encontrada en las superficies mucosas humanas son críticas para la adquisición de nutrientes y para proporcionar una colonización protectora contra microorganismos patógenos. Cuando se destruye la flora normal por varios factores, el resultado a menudo son infecciones microbianas en la superficie mucosa, muchas de las cuales afectan a poblaciones de todo el mundo. La falta de una fuerte respuesta inmunitaria en las superficies mucosas ha limitado la prescripción clínica de antibióticos convencionales o antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones de la mucosa. Desafortunadamente para la flora normal, la mayoría de los antibióticos de molécula pequeña tienen una actividad de amplio espectro, destruyendo los organismos patógenos y benignos indiscriminadamente. Este efecto a menudo da lugar a infecciones graves asociadas a antibióticos debidas al nicho vacío disponible para la colonización por patógenos. Clostridium difficile, Candida albicans y Staphylococcus aureus son ejemplos de agentes patógenos oportunistas que toman ventaja del aumento de tamaño del nicho después del tratamiento con antibióticos. Los problemas son consecuencia del uso de antibióticos de amplio espectro, en combinación con la aparición de cepas resistentes a los fármacos, lo que subraya la necesidad fundamental de nuevas terapias con antibióticos "dirigidos" para combatir los patógenos de la mucosa con un mínimo impacto sobre la microflora normal.

25 Los esfuerzos previos para conseguir una terapia antimicrobiana específica de la diana consistieron en antibióticos conjugados a anticuerpos monoclonales o la construcción de grandes proteínas de fusión con dominios de reconocimiento bacterianos y bactericidas (Qiu y col., 2005). Ningún método ha dado aún como resultado una terapia funcional, eficaz, debido a la baja eficacia de la conjugación química, la inestabilidad de las proteínas grandes, o el alto coste de producción.

30 Aunque se ha desarrollado el G10KHc, un péptido antimicrobiano dirigido específicamente (STAMP), y ha demostrado una potencia de destrucción aumentada, una selectividad y cinética contra las bacterias a las que se dirige (Eckert y col., 2006), existe una necesidad de desarrollar nuevos STAMP que sean capaces de destruir específicamente o selectivamente o que inhiban el crecimiento de los microorganismos indeseables a los que se dirigen. Fengxia y col., FEMS Microbiology Letters, 2005; 251(2): 321-326 desvela péptidos feromona que inducen la muerte celular de Streptococcus mutans, pero no desvela una composición o STAMP como se definen en las reivindicaciones. La Patente de EE. UU. N° 7.087.228 desvela composiciones que comprenden péptidos estimulantes de la competencia (CSP) y su uso en la presentación del deterioro dental y la endocarditis infecciosa, pero no desvela una composición o STAMP como se definen en las reivindicaciones.

35 **Sumario de la Invención**

45 Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido dirigido unido a un péptido microbiano por medio de su extremo amino o carboxilo, consistiendo la secuencia de aminoácidos de dicho péptido dirigido en la secuencia TFFRLFNRSFTQALGK (SEC ID N° 2), TFFRLFNR (SEC ID N° 5), o NIFEYFLE (SEC ID N° 10).

50 El péptido dirigido se selecciona de entre el grupo que consiste en C16 o CSP_{C16} (TFFRLFNRSFTQALG K, SEC ID N° 2), M8 o CSP_{M8} (TFFRLFNR, SEC ID N° 5), y péptido 1903 (NIFEYFLE, SEC ID N° 10).

55 En una realización, dicho péptido dirigido se une a dicho péptido antimicrobiano por un péptido enlazador. En otra realización, el péptido enlazador se selecciona de entre el grupo que consiste en GGG (SEC ID N° 17), AAA (SEC ID N° 18), SAT (SEC ID N° 19), ASA (SEC ID N° 20), SGG (SEC ID N° 21), PYP (SEC ID N° 22), SGS (SEC ID N° 23), GGS (SEC ID N° 24), SPS (SEC ID N° 25), PSGSP (SEC ID N° 26), PSPSP (SEC ID N° 27), GGSGGS (SEC ID N° 28) o una combinación (un multímero) de cualquiera de dos (dímero), tres (trímero), cuatro (tetramero), cinco (pentámero) o más de cinco de los mismos.

60 En otra realización el péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en G2 (un derivado de la novispirina G10, KNLRIRKGIHIIKKY* como se muestra en la SEC ID N° 3) (* denota la amidación del extremo C), S6L3-33 que tiene una secuencia de aminoácidos FKKFWKWFRRF (SEC ID N° 7) y BD2.21 que tiene una secuencia de aminoácidos KLFKFLRKHLL (SEC ID N° 11).

65 Otro aspecto de la invención es un péptido antimicrobiano dirigido selectivamente (STAMP) que comprende: a) un péptido dirigido, en donde el péptido dirigido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s 2, 5, y 10; y b) un péptido antimicrobiano, en donde el péptido antimicrobiano está

unido al péptido dirigido por medio de un péptido. En otra realización, el STAMP comprende un péptido dirigido y un péptido antimicrobiano, en donde el péptido dirigido está unido covalentemente al péptido antimicrobiano por medio de un enlace peptídico, donde el péptido dirigido se selecciona de entre el grupo que consiste en C16 (SEC ID N° 2), M8 (SEC ID N° 5), y 1903 (SEC ID N° 10); y donde el péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en G2 (SEC ID N° 3), S6L3-33 (SEC ID N° 7) y BD2.21 (SEC ID N° 11).

En otra realización, el STAMP comprende un péptido dirigido que está unido covalentemente a un péptido enlazador por medio de un enlace peptídico y un péptido antimicrobiano que está unido covalentemente al péptido enlazador por medio de un enlace peptídico, donde el péptido dirigido se selecciona de entre el grupo que consiste en C16 (SEC ID N° 2), M8 (SEC ID N° 5), y 1903 (SEC ID N° 10); donde el péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en G2 (SEC ID N° 3), S6L3-33 (SEC ID N° 7) y BD2.21 (SEC ID N° 11); y donde el péptido enlazador se selecciona de entre el grupo que consiste en GGG (SEC ID N° 17), AAA (SEC ID N° 18), SAT (SEC ID N° 19), ASA (SEC ID N° 20), SGG (SEC ID N° 21), PYP (SEC ID N° 22), SGS (SEC ID N° 23), GGS (SEC ID N° 24), SPS (SEC ID N° 25), PSGSP (SEC ID N° 26), PSPSP (SEC ID N° 27), y GGSGGS (SEC ID N° 28).

En otra realización, el STAMP se selecciona de entre el grupo que consiste en C16G2 (SEC ID N° 4); C16-33 (SEC ID N° 8); C16-BD2.21 (SEC ID N° 14); M8G2 (SEC ID N° 15); M8-33 (SEC ID N° 9); M8-BD2.21 (SEC ID N° 6); 1903-G2 (SEC ID N° 12); 1903-33 (SEC ID N° 16); y 1903-BD2.21 (SEC ID N° 13).

En otra realización, los aminoácidos en el STAMP son enantiómeros D-aminoácidos.

También se describe en el presente documento una composición de STAMP que comprende un STAMP y un antibiótico, donde la composición de STAMP muestra un efecto antimicrobiano sinérgico para destruir o reducir el crecimiento de organismo microbiano diana. En un caso, el STAMP es G10KHc (SEC ID N° 36). En otro caso el antibiótico es la tobramicina. En un caso preferido, la composición de STAMP comprende G10KHc (SEC ID N° 36) y tobramicina.

También se describe en el presente documento una composición de STAMP que comprende un STAMP y un agente que puede aumentar, mantener o facilitar la función o actividad del STAMP. En un caso, el agente es un inhibidor de proteasas o una rhdNasa. En un caso preferido la composición de STAMP comprende G10KHc (SEC ID N° 36) y un inhibidor de proteasas y/o rhdNasa.

También se describe en el presente documento un agente de diagnóstico que comprende un péptido dirigido y un agente detectable. En una realización, el péptido dirigido se conjuga con un agente detectable.

Una composición de la presente invención (por ejemplo, el STAMP o la composición de STAMP) se puede utilizar para destruir selectivamente, inhibir o reducir el crecimiento de un organismo microbiano diana en un sujeto o en una película biológica o tratar una enfermedad asociada con un organismo microbiano diana. Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición de la invención o el STAMP de la invención para su uso en un método para destruir o inhibir selectivamente un organismo microbiano diana en un sujeto o en una película biológica *in vivo*. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición de la invención o el STAMP de la invención para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en un método para destruir o inhibir selectivamente un organismo microbiano diana en un sujeto o en una película biológica *in vivo*. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición de la invención o el STAMP de la invención en un método para eliminar o destruir selectivamente un organismo microbiano diana en una película biológica *in vitro*.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Actividad de destrucción selectiva de C16G2 contra *S. mutans*. Se expusieron las células planctónicas de *S. mutans*, *S. sanguinis*, y *S. gordonii* a 25 μ M del STAMP C16G2, o su péptido antimicrobiano parental no dirigido G2, durante 1 min. Se detectaron las ufc/ml supervivientes y se compararon. Los datos representan las medias de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 2: Actividad inhibitoria de G2 y C16G2 contra películas biológicas de una única especie. Se cultivaron las películas biológicas monocultivo de *S. gordonii* (A), *S. sanguinis* (B) y *S. mutans* (C) y luego se expusieron durante 1 min con 25 μ M STAMP o componente de STAMP (como se indica en la figura), se lavaron y se recultivaron con medio reciente. La recuperación de la película biológica se controló durante el tiempo por DO₆₀₀. Los datos representan las medias de 3 experimentos independientes.

Figura 3: Actividad de C16G2 contra *S. mutans* en una película biológica multi-especie. Se permitió que cultivos mezclados de *S. mutans*, *S. sanguinis*, y *S. gordonii* formaran una película biológica en saliva y luego se expusieron a 25 μ M de C16G2, CSPC16, o G2. Después de lavarlas, se permitió que las películas biológicas se recuperaran en medio reciente/saliva. El recrecimiento de la película biológica se controló en un tiempo midiendo la absorbancia a una DO₆₀₀, mientras que la salud de *S. mutans* en la película biológica se medía por la actividad de la luciferasa (producción de RLU). Los datos se representaron como RLU/DO₆₀₀ y representan las medias de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 4: Actividad de M8G2 contra bacterias orales en películas biológicas. Se trataron falsamente o se expusieron las películas biológicas de una única especie de *S. mutans* (A) o *S. sanguinis* (B) a M8G2 25 μ M (especificado en la figura). Después de retirar el STAMP y de la adición de medio reciente, se controló la recuperación de la película biológica en un tiempo controlando la absorbancia a una DO_{600} . Los datos representan la media de 3 experimentos independientes.

Figura 5: Actividad inhibitoria de la película biológica de S6L3-33 y de STAMP que contenían S6L3-33. Se trataron películas biológicas de una única especie de *S. mutans* (A) o *S. sanguinis* (B) con M8-33, C16-33 o S6L3-33 solos (especificado en la figura) durante 1 min. Después de retirar el agente y del lavado estricto, se siguió el recrecimiento de las películas biológicas durante 4 horas midiendo la absorbancia a una DO_{600} tras la adición de medio reciente. Los datos representan la media del valor obtenido de al menos 3 ensayos independientes.

Figura 6: Espectros de HPLC y MALDI para G10KHc. Se evaluó la calidad de G10KHc purificado por HPLC (a) y espectrometría de masas MALDI (b). Controlando con UV 215, se detectó un único pico durante la HPLC (a 10,06 ml) que tenía la masa correcta para G10KHc (4267,44).

Figura 7: Cinética antimicrobiana de G10KHc, G10, y tobramicina. O bien se trató falsamente o se desafió la cepa ATCC 15692 de *P. aeruginosa* con el STAMP G10KHc, G10 no dirigido o tobramicina (10 μ M) y se cuantificó la supervivencia de ufc/ml tras 1 min, 5 min, 30 min y 2 h. El ensayo se llevó a cabo con suero de ratón al 30% y representa la media de al menos tres experimentos independientes.

Figura 8: Ensayo de tiempo de destrucción contra *P. aeruginosa* planctónica de alta densidad. Se expusieron los cultivos (1×10^8 ufc/ml) a G10KHc 5 μ M o G10 con y sin el co-tratamiento con tobramicina igual molar, así como a tobramicina administrada sola. Tras 24 h, se determinó la supervivencia de ufc/ml colocándolos en placas. Los puntos de datos representan las medias de tres experimentos independientes.

Figura 9: Aumento de la actividad antimicrobiana de G10KHc y tobramicina contra la película biológica de *P. aeruginosa*. Se cultivaron las películas biológicas en reactores de disco y se desafiaron con 100 μ g/ml del agente como se ha indicado. Tras 4 y 24 h, se recolectaron las bacterias supervivientes y se colocaron en placas para cuantificar al menos 3 experimentos independientes. * indica que el número de ufc/ml de los cultivos tratados con G10KHc/tobramicina era demasiado pequeño para aparecer en la escala log.

Figura 10: Captación de colorante mediada por concentraciones sub-inhibidoras de G10KHc. (a) Se trató *P. aeruginosa* con medio (columna de la izquierda) o G10KHc 2 μ M (columna de la derecha) durante 5 minutos y después se añadió el colorante PI. Las imágenes de campo brillante (panel superior) y fluorescencia (panel inferior) del mismo campo se recolectaron y se evaluaron en cuanto a la acumulación intracelular de colorante (fluorescencia roja). (b) Se cuantificó la supervivencia ufc/ml de los cultivos no tratados (solo colorante) y tratados con G10KHc tras la visualización y la colocación en placas como una dilución en serie de 5 veces.

Figura 11: Actividad y estabilidad de G10KHc y G10KHc-D en el esputo. (A) La *P. aeruginosa* añadida exógenamente se desafió con G10KHc 25 μ M (con o sin PMSF), G10KHc-D 25 μ M, o se dejó sin tratar (especificado en la figura), y se recuperaron las ufc/ml supervivientes y se cuantificaron 4 h después de la adición del agente. Las ufc/ml recuperadas se expresaron como la media de tres experimentos independientes con las desviaciones estándar. (B) Se añadió G10KHc (con y sin PMSF, especificado en la figura) al esputo para hallar las duraciones específicas y la estabilidad del péptido (unidades de mili-absorbancia, mAU) se controló con HPLC. El gradiente lineal del incremento de la fase móvil se muestra en negro. (**) G10KHc intacto identificado por espectrometría de masas MALDI a un volumen de retención de 10,29 ml. (*) Fracciones recolectadas del análisis antimicrobiano (Tabla 1).

Figura 12: Efecto de la rhDNasa sobre la actividad de G10KHc y G10KHc-D en el esputo concentrado. Se trataron muestras de esputo agrupado diluidas mínimamente y con *P. aeruginosa* añadida exógenamente con G10KHc 25 μ M (con PMSF) o G10KHc-D 50 μ M durante 1 h tras un pretratamiento con o sin rhDNasa. Las células recuperadas se cuantificaron y se expresaron como el porcentaje de ufc/ml introducidas. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos independientes con desviación estándar.

Figura 13: Destrucción de las películas biológicas maduras de especie única *Streptococcus mutans* con C16-BD2.21 y 1903-BD2.21. La figura indica que C16-BD2.21 y 1903-BD2.21 podían destruir el 33% y el 15% de *S. mutans* viables de la película biológica madura (crecimiento de 18-24 h) respectivamente, después de que la película biológica se tratara con los péptidos durante solo 20 min.

Figura 14: Impacto de C16-BD2.21 y 1903-BD2.21 en películas biológica multi-especie de *Streptococos* orales. (A) muestra que C16-BD2.21 no tiene impacto sobre la población total en ufc/ml y 1903-BD2.21 reducía la población aproximadamente un 30%. (B) muestra que la relación de la supervivencia de *S. mutans* con respecto a los *Streptococos* totales era de 0,075 bajo el tratamiento con C16-BD2.21 y la relación bajo el tratamiento con

1903-BD2.21 era aproximadamente de 0,2.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 5 Un aspecto de la presente invención se refiere a péptidos antimicrobianos selectivamente/específicamente dirigidos (STAMP) y el uso de los mismos.

La expresión “péptido antimicrobiano selectivamente/específicamente dirigido” o “STAMP” se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un péptido dirigido y un péptido antimicrobiano, donde el péptido dirigido está unido covalentemente o conjugado (por ejemplo por medio de un enlace peptídico) al péptido antimicrobiano bien por el extremo C o por el extremo N del péptido dirigido. Por ejemplo, un STAMP puede comprender una de las dos estructuras siguientes: 1) un péptido dirigido con su extremo C unido covalentemente al extremo N de un péptido antimicrobiano [extremo amino-péptido dirigido-enlace peptídico-péptido antimicrobiano-extremo carboxilo] y 2) un péptido antimicrobiano con su extremo C unido covalentemente al extremo N de un péptido dirigido [extremo amino-péptido antimicrobiano-enlace peptídico-péptido dirigido- extremo carboxilo].

En una realización de la presente invención, el STAMP comprende además un péptido enlazador por el que péptido dirigido está unido covalentemente o conjugado con el péptido antimicrobiano. En este caso, un STAMP puede comprender una de las siguientes dos estructuras: 1) un péptido dirigido con su extremo C unido covalentemente al extremo N de un péptido enlazador y un péptido antimicrobiano con su extremo N covalentemente unido al extremo C del péptido enlazador (extremo amino-péptido dirigido- enlace peptídico-péptido enlazador-péptido antimicrobiano-enlace peptídico- extremo carboxilo) y 2) un péptido dirigido con su extremo N unido covalentemente al extremo C de un péptido enlazador y un péptido antimicrobiano con su extremo C unido covalentemente al extremo C de un péptido enlazador (extremo amino- péptido antimicrobiano- enlace peptídico- péptido enlazador- enlace peptídico-péptido dirigido- extremo carboxilo).

Un péptido dirigido descrito en el presente documento puede ser cualquier péptido adecuado que reconozca o se una a una diana (por ejemplo, una célula diana, un tejido diana, un organismo microbiano diana). Particularmente, un péptido dirigido interactúa específicamente con o reconoce específicamente una diana, a través de, por ejemplo, un apéndice de la superficie de la célula tal como flagelos y pelos, y proteínas, lípidos y polisacáridos expuestos en la superficie de una diana. En una realización, el péptido dirigido reconoce específicamente o interactúa con solo una o unas pocas dianas mientras que reconoce o interactúa mínimamente con las no dianas. En otra realización, un péptido dirigido puede ser un péptido capaz de unirse específicamente a un microorganismo, por ejemplo, un organismo microbiano diana.

En un caso, el péptido dirigido descrito en el presente documento se puede identificar por medio de bibliotecas de selección de péptidos. Por ejemplo, una biblioteca de fagos de presentación de péptidos puede seleccionarse contra un organismo microbiano diana o un antígeno deseado o un epítipo de los mismos. En particular las bibliotecas de fagos de presentación de péptidos (por ejemplo, las bibliotecas Ph.D 7, Ph.D.12, Ph.D C7C de New England Biolabs) que contienen > 10⁹ clones de fagos que contienen secuencias de péptidos únicos aleatorios. La biblioteca Ph.D.-C7C muestra péptidos 7-meros con enlaces disulfuro, mientras que las bibliotecas Ph.D.-7 y Ph.D.-12 contienen restos completamente aleatorios 7-meros y 12-meros, respectivamente. El fago filamentoso M13 utilizado para el procedimiento lleva la inserción aleatoria como una fusión en el extremo N con la proteína pIII de recubrimiento menor. En la selección de un péptido dirigido que reconoce específicamente una diana o un organismo microbiano diana, se incubaron 10¹⁰ ufp/ml de la biblioteca de fagos con 10⁹ organismos microbianos (por ejemplo, células bacterianas) para los que se desean los péptidos dirigidos. Tras la centrifugación, se retiraron los fagos no unidos por aspiración. El aglomerado, que contenía los organismos microbianos diana con el fago unido, se lavó varias veces utilizando tampones que contenían un detergente suave para eliminar las partículas de fago unidas sin fuerza, y las partículas de fago unidas firmemente se eluyeron. Este proceso se llama “criba”. El fago eluido se amplificó infectando cepas de *E. coli* F⁺. Después de 3-4 rondas de criba y amplificación se obtuvo el grupo de fagos, que contenía clones con alta afinidad de unión para las bacterias contra las que se había hecho la criba. De diez a veinte clones de fago de este grupo se escogieron aleatoriamente para la secuenciación de ADN, de los que se determinó la secuencia de aminoácidos de la inserción peptídica. Alineando la secuencia de aminoácidos de múltiples clones del mismo grupo de fagos, se construyó una secuencia de consenso del péptido de unión/dirigido. Esta secuencia de consenso representa uno de los péptidos de unión /dirigidos específicos para un organismo microbiano particular. Para confirmar la especificidad de unión del péptido de consenso, el péptido se sintetizó químicamente y se conjugó con un colorante (por ejemplo, FITC, un colorante fluorescente verde). El péptido marcado se incubó con el organismo microbiano y se analizó por microscopía de fluorescencia para ver la unión específica con especies microbianas diana. Esta metodología aseguraba que los péptidos seleccionados del fago de presentación mostraban la misma especificidad de unión que un péptido independiente de la partícula de fago M13.

El péptido dirigido descrito en el presente documento también puede ser un péptido obtenido basándose en un diseño racional. Por ejemplo, se puede diseñar un péptido dirigido basándose en las características bioquímicas y biofísicas de los aminoácidos y las superficies de los microorganismos. En general, los péptidos cargados positivamente se unen probablemente a componentes de la superficie celular cargados negativamente y viceversa. De manera similar, los péptidos hidrófobos se pueden unir a bolsillos hidrófobos de la superficie celular basándose

en las interacciones hidrófobas mientras que la estructura secundaria o terciaria de un péptido se puede ajustar en ciertas estructuras de la superficie de un microorganismo.

Un péptido identificado por medio de un método de selección o diseño se puede utilizar como un péptido dirigido para que reconozca específicamente un organismo microbiano diana. Ejemplos de tales péptidos dirigidos se desvelan en la Solicit. de Pat. de EE. UU. N° 10/706.391 (Pub. EE. UU. N° 20040137482), que incluye, por ejemplo, 1) péptidos dirigidos capaces de unirse específicamente o reconocer *Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa* (por ejemplo los péptidos dirigidos 12:1, 12:2, 12:3, 12:4, 12:5, 12:6, 12:7, 12:8; 12:9, y 12:10); 2) péptidos dirigidos capaces de unirse específicamente a *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus* (por ejemplo, los péptidos dirigidos SA5:1, SA5:3, SA5:4, SA5:5, SA5:6, SA5:7, SA5:8, SA5:9, SA5:10, SA2:2, SA2:4, SA2:5, SA2:6, SA2:7, SA2:8, SA2:9, SA2:10, y SA2:11); y 3) péptidos dirigidos capaces de unirse específicamente a *E. coli* (por ejemplo, los péptidos dirigidos DH5.1, DH5.2, DH5.3, DH5.4, DH5.5, DH5.6, DH5.7, DH5.8, y DH5.9).

Los péptidos dirigidos que se unen específicamente o reconocen *Pseudomonas*, especialmente *P. aeruginosa*, incluyen, por ejemplo, el dominio cat-1 (o KH), KKHRKHKRKH (SEC ID N° 31). Los péptidos dirigidos que se unen específicamente o reconocen estreptococos incluyen, por ejemplo, feromonas bacterianas tales como CSP (SGSLSTFFRLFNRSFTQALGK, SEC ID N° 1), CSP 1 (EMRLSKFFRDFILQRKK, SEC ID N° 29) y CSP2 (EMRISRIILDFLFRKK, SEC ID N° 30) y fragmentos de los mismos. Además, los péptidos dirigidos que se unen específicamente o reconocen *S. pneumoniae* incluyen, por ejemplo, CSP1 y CSP2. Los péptidos dirigidos que se unen específicamente o reconocen *S. mutans* incluyen por ejemplo, CSP, C16 o CSP_{C16} (TFFRLFNRSFTQALGK, SEC ID N° 2), M8 o CSP_{M8} (TFFRLFNRSFTQALGK, SEC ID N° 5), y el péptido 1903 (NIFEYFLE, SEC ID N° 10).

Los péptidos dirigidos utilizados en la presente invención pueden ser péptidos que se encuentran naturalmente o no. Por ejemplo, los péptidos dirigidos utilizados en la presente invención se pueden hacer recombinantemente, sintetizarse químicamente, o existen naturalmente. En un caso, el péptido dirigido contiene una secuencia de aminoácidos que existe naturalmente (por ejemplo CSP, CSP 1 y CSP2). En una realización, el péptido dirigido contiene una secuencia de aminoácidos que constituye una parte interna de un polipéptido que se encuentra naturalmente (por ejemplo, C16 y M8 en la presente invención). En otra realización, el péptido dirigido contiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia que existe naturalmente en un genoma y es tal que la secuencia de aminoácidos no es adyacente a cualquier secuencia de aminoácidos naturalmente adyacente a la misma, por ejemplo, tal secuencia de aminoácidos es adyacente a una secuencia heteróloga en el péptido dirigido.

El péptido dirigido descrito en el presente documento también puede incluir un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que se deriva o está modificada de una secuencia de aminoácidos dirigida específicamente ilustrada en la presente invención, siempre y cuando la secuencia derivada o modificada mantenga aún o tenga especificidad aumentada con respecto a su organismo microbiano diana. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos dirigida puede modificarse estructuralmente por medio de eliminación, mutación, adición de aminoácidos u otras entidades estructurales, o cualquier otro cambio estructural siempre que estos cambios no alteren o afecten negativamente la capacidad de unión de la secuencia de aminoácidos dirigida a su organismo microbiano diana.

El péptido dirigido utilizado en la presente invención interactúa específicamente o se une al organismo diana (por ejemplo, por medio de la superficie externa del organismo) gracias a diferentes interacciones moleculares tales como por interacción iónica, fuerzas de Van der Waals, interacción ligando-receptor, o interacción hidrófoba. Por ejemplo, el péptido dirigido descrito en el presente documento puede ser también un ligando peptídico, receptor, o fragmento del mismo que reconoce un organismo microbiano diana. En un ejemplo, el péptido dirigido descrito en el presente documento puede ser una proteína que se une a glucanos de *Streptococcus mutans*, que puede unirse específicamente a glucanos insolubles en la superficie de *S. mutans*. En otro ejemplo, los péptidos dirigidos pueden ser feromonas bacterianas o un fragmento de las mismas.

El péptido dirigido descrito en el presente documento comprende de aproximadamente 4 a aproximadamente 40 aminoácidos, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30, o desde aproximadamente 6 a aproximadamente 20. En un caso preferido, el péptido dirigido descrito en el presente documento tiene una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos.

Se contempla que los péptidos dirigidos incluyen péptidos que se unen específicamente a una célula o tejido diana (por ejemplo, una célula vegetal, una célula animal, o un organismo fúngico). Los ejemplos de estos péptidos dirigidos incluyen Quitinasa, Lectinas, y fragmentos dirigidos de las mismas.

El péptido dirigido de la presente invención puede producirse por cualquier método conocido adecuado por un experto en la técnica por sí mismo o en combinación con un péptido enlazador y un péptido antimicrobiano. Por ejemplo, los péptidos dirigidos se pueden sintetizar químicamente por medio de un sintetizador o hacerse de manera recombinante utilizando un sistema de expresión, por ejemplo, sistema de expresión bacteriano, de levaduras, o de células eucariotas. En la síntesis química, el péptido dirigido puede hacerse con enantiómeros L-aminoácidos o enantiómeros D-aminoácidos. Se observa que el péptido dirigido que consiste en D-enantiómeros aumenta la estabilidad sin comprometer la actividad del péptido dirigido.

El péptido enlazador utilizado en la presente invención es un péptido que se puede utilizar para conectar un péptido dirigido a un péptido antimicrobiano sin interferir o reducir la actividad del péptido dirigido o el péptido antimicrobiano. El péptido enlazador tiene aproximadamente de 2 a 20 aminoácidos, de 2 a 12 o de 3 a 12 aminoácidos. Ejemplos de péptidos enlazadores incluyen, por ejemplo, GGG (SEC ID N° 17), AAA (SEC ID N° 18), SAT (SEC ID N° 19), ASA (SEC ID N° 20), SGG (SEC ID N° 21), PYP (SEC ID N° 22), SGS (SEC ID N° 23), GGS (SEC ID N° 24), SPS (SEC ID N° 25), PSGSP (SEC ID N° 26), PSPSP (SEC ID N° 27), o una combinación (un multímero) o cualquiera de dos (dímero), tres (trímero), cuatro (tetramero), cinco (pentámero) o más de cinco de los péptidos enlazadores enumerados. En una realización, el péptido enlazador es GGG (SEC ID N° 17). En otra realización el péptido enlazador es un dímero de GGS (SEC ID N° 24), que es GGSGGS (SEC ID N° 28).

El péptido enlazador que se utiliza en la presente invención se puede producir por cualquier método adecuado conocidos por los expertos en la técnica en sí mismo o en combinación con un péptido dirigido y un péptido antimicrobiano. Por ejemplo, los péptidos enlazadores se pueden sintetizar químicamente por medio de un sintetizador o se puede hacer de manera recombinante utilizando un sistema de expresión, por ejemplo, un sistema de expresión bacteriano, de levaduras, o de células eucariotas. En la síntesis química, el péptido enlazador se puede producir por enantiómeros L-aminoácidos o enantiómeros de D-aminoácidos. Se observa que los péptidos que consisten en enantiómeros D aumentan la estabilidad sin comprometer la actividad de los péptidos.

El péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención es un péptido capaz de destruir un organismo microbiano o de inhibir su crecimiento. Las actividades antimicrobianas de los péptidos antimicrobianos utilizados en la presente invención incluyen, sin limitación, actividades antibacterianas, antivíricas o antifúngicas. Los péptidos antimicrobianos incluyen varias clases de péptidos, por ejemplo péptidos aislados originalmente de plantas así como animales. En los animales, los péptidos antimicrobianos se expresan habitualmente en varias células, que incluyen los neutrófilos y las células epiteliales. En los mamíferos, incluyendo los seres humanos, los péptidos antimicrobianos generalmente son moléculas anfipáticas que contienen unos 100 aminoácidos. Muchos de estos péptidos generalmente tienen una carga neta positiva (es decir, son catiónicos) y la mayoría forman estructuras helicoidales.

En una realización, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 50, o desde aproximadamente 7 a aproximadamente 20. En una realización preferida, el péptido dirigido tiene una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 aminoácidos.

En otra realización, el péptido antimicrobiano tiene una actividad antimicrobiana con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de no más de aproximadamente 40 μM , no más de aproximadamente 30 μM , no más de 20 μM , o no más de 10 μM .

En otra realización, los péptidos antimicrobianos incluyen los enumerados en la Tabla 7 (SEC ID N°s 34-35 y 54-97). En otra realización, el péptido antimicrobiano contiene uno o más péptidos antimicrobianos que incluyen, sin limitación, alexomicina, andropina, apidaecina, bacteriocina, bacteriocina de hoja β plegada, bactenecina, buforina, catelicidina, clavanina α -helicoides, cecropina, dodecapéptido, defensina, β -defensina, α -defensina, gaegurina, histatina, indolicidina, magainina, melitina, nisina, novispirina G10, protegrina, ranalexina, taquiplesina, y derivados de los mismos.

Entre estos péptidos antimicrobianos conocidos, se sabe que las taquiplesinas tienen actividades antibacterianas y antifúngicas. La andropina, apidaecina, bactencina, clavanina, dodecapéptido, defensina, e indolicidina son péptidos antimicrobianos con actividades antibacterianas. Se ha demostrado que los péptidos buforina, nisina, y cecropina tienen efectos antimicrobianos sobre *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha demostrado que los péptidos magainina y ranalexina tienen efectos antimicrobianos sobre los mismos organismos, y además tiene tales efectos sobre *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida krusei*, y *Helicobacter pylori*. También se ha demostrado que la magainina tiene efectos antimicrobianos sobre el virus del herpes simple. Se ha demostrado que los péptidos alexomicina tienen efectos antimicrobianos sobre *Campylobacter jejuni*, *Moraxella catarrhalis* y *Haemophilus influenzae* mientras que se ha demostrado que los péptidos defensina y defensina de hoja β plegada tienen efectos antimicrobianos sobre *Streptococcus pneumoniae*. Los péptidos histatina y los derivados de los mismos son otra clase de péptidos antimicrobianos, que tienen actividades antifúngicas y antibacterianas contra una variedad de organismos incluyendo el *Streptococcus mutans* (MacKay, B. J. y col., *Infect. Immun.* 44:695-701 (1984); Xu, y col., *J. Dent. Res.* 69:239 (1990)).

En una realización, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención contiene uno o más péptidos antimicrobianos de una clase de péptidos histatina y derivados de los mismos. Por ejemplo, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención contiene uno o más derivados de histatina incluyendo, sin limitación, histatina 5 que tiene una secuencia de aminoácidos DSHAKRHHGY KRKFHEKHHS HRGY (SEC ID N° 32) o dhvar-1 que tiene una secuencia de aminoácidos KRLFKELKFS LRKY (SEC ID N° 33).

En otra realización, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención contiene uno o más péptidos antimicrobianos de una clase de protegrinas y derivados de las mismas. Por ejemplo, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención contiene protegrina PG-1 que tiene una secuencia de aminoácidos RGGRLCYCRRRFCVCVGR (SEC ID N° 34). Se ha demostrado que los péptidos protegrina tienen efectos antimicrobianos sobre *Streptococcus mutans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y *Haemophilus influenzae*. Los péptidos protegrina se describen en las Pat. de EE. UU. N°s 5.693.486, 5.708.145, 5.804.558, 5.994.306, y 6.159.936.

En otra realización más, el péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención contiene uno o más péptidos antimicrobianos de una clase de novispirina y derivados de la misma para el tratamiento de organismos cariogénicos, por ejemplo, *Streptococcus mutans* o *Pseudomonas aeruginosa*. Por ejemplo, el péptido utilizado en la presente invención incluye la novispirina G10 que tiene una secuencia de aminoácidos KNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEC ID N° 35) y G2 (un derivado de la novispirina G10) que tiene una eliminación en el aminoácido del extremo C, y una eliminación interna respecto a G10 y un extremo C amidado que tiene la secuencia de aminoácidos KNLRIIRKGIHIIKKY* (SEC ID N° 3) (* señala la amidación del extremo C).

En otra realización más, el péptido utilizado en la presente invención contiene péptidos diseñados racionalmente y ensayados en cuanto a si poseen actividad antimicrobiana contra organismos microbianos (por ejemplo, *Streptococcus mutans*). Los ejemplos de estos péptidos incluyen, sin limitación, S6L3-33 que tiene una secuencia de aminoácidos FKKFWKWFRRF (SEC ID N° 7) y BD2.21 que tiene una secuencia de aminoácidos KLFKFLRKHLL (SEC ID N° 11).

El péptido antimicrobiano utilizado en la presente invención se puede producir por cualquier método adecuado conocido por un experto en la técnica en sí mismo o en combinación con un péptido dirigido y un péptido enlazador. Por ejemplo, los péptidos antimicrobianos se pueden sintetizar químicamente por medio de un sintetizador o se pueden hacer de manera recombinante utilizando un sistema de expresión, por ejemplo un sistema de expresión bacteriano, de levaduras, o de células eucariotas. En la síntesis química, el péptido antimicrobiano se puede hacer por enantiómeros L-aminoácidos o enantiómeros D-aminoácidos.

En otra realización más, el STAMP comprende un péptido dirigido y un péptido antimicrobiano, en donde el péptido dirigido está unido covalentemente al péptido antimicrobiano por medio de un enlace peptídico, donde el péptido dirigido se selecciona de entre el grupo que consisten en C16 (SEC ID N° 2), M8 (SEC ID N° 5), y 1903 (SEC ID N° 10); y donde el péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consisten en G2 (SEC ID N° 3), S6L3-33 (SEC ID N° 7) y BD2.21 (SEC ID N° 11).

En otra realización más, el STAMP comprende un péptido dirigido que está unido covalentemente a un péptido enlazador por medio de un enlace peptídico y un péptido antimicrobiano que está unido covalentemente al péptido enlazador por medio de un enlace peptídico, donde el péptido dirigido se selecciona de entre el grupo que consiste en C16 (SEC ID N° 2), M8 (SEC ID N° 5), y 1903 (SEC ID N° 10); donde el péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en G2 (SEC ID N° 3), S6L3-33 (SEC ID N° 7) y BD2.21 (SEC ID N° 11). En otra realización más, el péptido enlazador se selecciona de entre el grupo que consiste en GGG (SEC ID N° 17), AAA (SEC ID N° 18), SAT (SEC ID N° 19), ASA (SEC ID N° 20), SGG (SEC ID N° 21), PYP (SEC ID N° 22), SGS (SEC ID N° 23), GGS (SEC ID N° 24), SPS (SEC ID N° 25), PSGSP (SEC ID N° 26), PSPSP (SEC ID N° 27), y GGSGGS (SEC ID N° 28). Ejemplos de tales STAMP incluyen pero no se limitan a los STAMP enumerados en la Tabla 1: C16G2 (SEC ID N° 4); C16-33 (SEC ID N° 8); C16-BD2.21 (SEC ID N° 14); M8G2 (SEC ID N° 6); M8-33 (SEC ID N° 9); M8-BD2.21 (SEC ID N° 15); 1903-G2 (SEC ID N° 12); 1903-33 (SEC ID N° 16); y 1903-BD2.21 (SEC ID N° 13).

También se describe en el presente documento una composición que comprende una pluralidad de STAMP, donde la composición comprende un primer STAMP y un segundo STAMP y el primer STAMP es diferente del segundo STAMP. En un caso, el primer STAMP comprende un primer péptido dirigido unido covalentemente a un primer péptido antimicrobiano por medio de un enlace peptídico. El segundo STAMP comprende un segundo péptido dirigido unido covalentemente a un segundo péptido antimicrobiano por medio de un enlace peptídico. La diferencia entre el primer STAMP y el segundo STAMP es tal que al menos un resto correspondiente de los dos STAMP son diferentes entre ellos. Por ejemplo, en un caso, el primer péptido dirigido es diferente del segundo péptido dirigido o el primer péptido antimicrobiano es diferente del segundo péptido antimicrobiano. En otro caso, el primer péptido dirigido es diferente del segundo péptido dirigido y el primer péptido antimicrobiano es diferente del segundo péptido antimicrobiano.

En otro caso, el primer STAMP comprende un primer péptido dirigido que está unido covalentemente a un primer péptido enlazador por medio de un enlace peptídico y un primer péptido antimicrobiano que está unido covalentemente al primer péptido enlazador por medio de un enlace peptídico. El segundo STAMP comprende un segundo péptido dirigido que está unido covalentemente a un segundo péptido enlazador por medio de un enlace peptídico y un segundo péptido antimicrobiano que está unido covalentemente a un segundo péptido enlazador por medio de un enlace peptídico. La diferencia entre el primer STAMP y el segundo STAMP es tal que al menos un resto correspondiente a los dos STAMP es diferente entre ellos. Por ejemplo, en un caso, el primer péptido dirigido es diferente del segundo péptido dirigido (el primer péptido enlazador es el mismo que el segundo péptido enlazador

- y el primer péptido antimicrobiano es el mismo que el segundo péptido antimicrobiano); o el primer péptido enlazador es diferente del segundo péptido enlazador; o el primer péptido antimicrobiano es diferente del segundo péptido antimicrobiano. En otro caso, el primer péptido dirigido es el mismo que el segundo péptido dirigido (el primer péptido enlazador es diferente del segundo péptido enlazador y el primer péptido antimicrobiano es diferente del segundo péptido antimicrobiano); o el primer péptido enlazador es el mismo que el segundo péptido enlazador; o el primer péptido antimicrobiano es el mismo que el segundo péptido antimicrobiano. En otro caso, el primer péptido dirigido es diferente del segundo péptido dirigido, el primer péptido enlazador es diferente del segundo péptido enlazador; y el primer péptido antimicrobiano es diferente del segundo péptido antimicrobiano.
- 5
- 10 El STAMP de la presente invención se puede producir por cualquier método apropiado conocido por un experto en la técnica. En una realización, una secuencia de nucleótidos que codifica el STAMP se puede sintetizar por medio de un sintetizador de ADN o una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido dirigido se puede unir a una secuencia de nucleótidos que codifica un resto peptídico antimicrobiano, sea directamente o por medio de una secuencia de nucleótidos que codifican un péptido enlazador. El nucleótido se puede expresar en un sistema de expresión apropiado, por ejemplo, un sistema de expresión bacteriano, de levaduras, o de células eucariotas disponible comercialmente. En la síntesis química, el STAMP se puede hacer por enantiómeros L-aminoácidos o enantiómeros D-aminoácidos. Se observa que el STAMP constituido por D-enantiómeros aumenta la estabilidad sin comprometer la actividad del STAMP.
- 15
- 20 También se describe en el presente documento una composición de STAMP que comprende un STAMP y un antibiótico. Se ha observado inesperadamente un efecto antimicrobiano sinérgico cuando se co-administra un STAMP con un antibiótico en la destrucción o reducción del crecimiento de un organismo microbiano diana. Los antibióticos adecuados para la co-administración con el STAMP incluyen sustancias producidas natural o sintéticamente, lo que puede inhibir el crecimiento o destruir los organismos microbianos. Tales antibióticos incluyen,
- 25 sin ninguna limitación, antibióticos β -lactámicos (por ejemplo, ampicilina, aziocilina, actreonomo, carbenicilina, cefoperazona, ceftriaxona, cefaloridina, cefalotina, cloxacilina, moxalactamo, penicilina, piperacilina, y tricarcilina), amoxicilina, bacitracina, cloranfenicol, clindamicina, capreomicina, colistimetato, ciprofloxacina, doxiciclina, eritromicina, ácido fusídico, fosfomicina, fusidato sódico, gramicidina, gentamicina, lincomicina, minociclina, macrólidos, monobactamos, ácido nalidíxico, novobiocina, ofloxacina, rifamicinas, tetraciclinas, vancomicina, tobramicina, y trimetoprim. En un ejemplo, la composición de STAMP comprende el STAMP G10KHc (SEC ID N° 36) y tobramicina y muestra un aumento sinérgico de actividad microbiana contra *P. aeruginosa* tanto en cultivos de películas biológicas como cultivos planctónicos.
- 30
- También se describe en el presente documento una composición de STAMP que comprende un STAMP y un agente que mejora, mantiene o facilita la función o actividad del STAMP. En un caso, el agente químico es un inhibidor de proteasas. La composición de STAMP está expuesta a las proteasas presentes en el medio donde la presencia de proteasa puede reducir la actividad microbiana del STAMP, por medio, por ejemplo, de la degradación enzimática. La combinación de un inhibidor de la proteasa y un STAMP estabiliza el STAMP de la degradación por proteasas y por tanto aumenta la actividad del STAMP. El medio ambiente en el que está presente la proteasa incluye, por ejemplo, fluidos corporales (por ejemplo, orina, sangre, saliva, esputo, fluidos mucosos). Las proteasas incluyen, por ejemplo, neutrófilo elastasa, proteinasa -3, cisteína proteasa, metaloproteasa, serina proteasa, u otras proteasas derivadas de bacterias y/o huéspedes. El inhibidor de proteasas incluye, por ejemplo, BMF, EDTA, PMFS, benzamidina, y/o anti-tripsina α -1 recombinante (rAAT).
- 35
- 40
- 45 En otro caso más, el agente es la DNasa humana, un ejemplo de composición de STAMP es la combinación de un STAMP (G10KHc (SEC ID N° 36) y una DNasa. La composición se utilizó para reducir la *P. aeruginosa* en el esputo y mostraba un aumento de la actividad de G10KHc, ya que la DNasa reducía la viscosidad del esputo y aumentaba la difusión del STAMP.
- 50
- También se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un STAMP y un vehículo farmacéutico adecuado. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en el presente documento significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptables, tales como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicados en la portabilidad o transporte de un STAMP de una localización, fluido corporal, tejido, órgano o parte del cuerpo a otra localización, fluido corporal, tejido órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo tiene que ser "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que sea compatible con los otros ingredientes de la formulación, por ejemplo, el STAMP, y sea adecuado para su uso en el tejido y órgano de seres humanos y animales sin una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, inmunogenidad, u otros problemas o complicaciones, con una relación riesgo/beneficio razonable proporcionada. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa, o sacarosa; (2) almidones tales como el almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa, y acetato de celulosa; (4) tragacanto potenciado; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semillas de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido magnésico e hidróxido de aluminio; (15) ácido
- 55
- 60
- 65

algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tampón de fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas que se emplean en las formulaciones farmacéuticas.

- 5 También se describen en el presente documento un agente diagnóstico que comprende un péptido dirigido y un agente detectable. El agente diagnóstico de la presente invención puede ser útil en ensayos diagnósticos, por ejemplo, para detectar la presencia de una diana u organismo microbiano diana en un lugar donde el organismo diana es susceptible de existir (por ejemplo, tejidos, órganos, fluidos corporales, esputo, superficie de un cuerpo u órgano, superficie mucosa, implante, película biológica, o suero, dispositivo, aire, fluido, cultivo celular, superficie de un artículo industrial o dispositivo), o para detectar la aparición, desarrollo, o remisión de una afección (por ejemplo, una infección o una enfermedad) asociada con el microorganismo diana.

En un caso, el péptido dirigido típicamente se marcará o se conjugará con un agente detectable. Hay disponibles muchos agentes detectables que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

15 (a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{13}C , ^{15}N , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I . El péptido se puede marcar con un radioisótopo utilizando las técnicas conocidas en la técnica y se puede medir la radioactividad utilizando recuento de centelleo; además, el péptido se puede marcar con spin por resonancia paramagnética de electrón por marcado de carbono y nitrógeno.

20 (b) Agentes fluorescentes tales como BODIPY, análogos de BODIPY, quelados de tierras raras (quelados de europio), fluoresceína y sus derivados, FITC, 5, 6, carboxifluoresceína, rodamina y sus derivados, dansilos, lisamina, ficoeritrina, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente amarilla, proteína fluorescente roja y Rojo Texas. La fluorescencia se cuantifica utilizando un fluorómetro.

25 (c) Varios agentes sustratos de enzimas, tales como luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnagas y luciferasa bacteriana), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano rusticano (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Ejemplos de combinaciones de sustratos de enzimas incluyen, por ejemplo: (i) peroxidasa de rábano rusticano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en la que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor de colorante (por ejemplo, la ortofenileno diamina (OPD) o 3,3', hidrocloreuro de 5,5'-tetrametil bencidina (TMB); (ii) fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

40 En otro caso, el agente detectable no se conjuga necesariamente con el péptido dirigido pero es capaz de reconocer la presencia del péptido dirigido y el agente se puede detectar. Por ejemplo, el agente detectable es un anticuerpo que se une específicamente al péptido dirigido. El anticuerpo puede ser detectado entonces o se puede cuantificar por medio de varios métodos conocidos en la técnica (Véase Harlow & Lane, *Antibodies- A Laboratory Manual* (1988)).

45 En otro caso, el agente diagnóstico se puede proporcionar en un kit, es decir, una combinación envasada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para llevar a cabo el ensayo diagnóstico. Cuando el péptido dirigido se marca con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores necesarios para la enzima (por ejemplo, un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizantes, tampones (por ejemplo, un tampón bloqueante o un tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los varios reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar las concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos se pueden proporcionar como un polvo seco, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que al disolverse proporcionarán la solución de reactivo que tenga la concentración apropiada.

55 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, las composiciones (por ejemplo, los STAMP o las composiciones de STAMP) de la presente invención se pueden utilizar para destruir, inhibir o reducir el crecimiento de un organismo microbiano diana al que se une específicamente el péptido dirigido.

60 En otra realización, las composiciones de la presente invención proporcionan un efecto antimicrobiano frente un organismo microbiano diana y se pueden utilizar para tratar una enfermedad o infección asociada con el organismo microbiano diana. Un efecto antimicrobiano incluye la inhibición del crecimiento o la destrucción de los organismos microbianos diana, o la interferencia de cualquier función biológica de los organismos microbianos diana. En general, las composiciones de la presente invención se pueden utilizar para tratar una enfermedad o infección en cualquier lugar de un huésped, por ejemplo, en cualquier tejido incluyendo las superficies de cualquier tejido o implante. En una realización, las composiciones se utilizan para destruir específicamente o inhibir organismos microbianos diana planctónicos en fluidos corporales (por ejemplo, sangre, esputo). En una realización, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar una enfermedad o infección en una superficie mucosa

o una superficie que contiene una película biológica.

La expresión "película biológica" se refiere a una acumulación de organismos microbianos que producen un material extracelular polisacárido o proteínico que actúa como un pegamento natural para inmovilizar o embeber los organismos. Las películas biológicas se pueden formar sobre superficies sólidas biológicas o superficies no biológicas. Una película biológica que consiste esencialmente en organismos microbianos no patógenos, comensales es esencial para el mantenimiento de una flora microbiana saludable y normal para evitar la invasión y establecimiento de otros organismos microbianos patógenos, por ejemplo, una infección por levaduras. Sin embargo, si la población de microorganismos en una película biológica se altera por sobrepoblación de organismos microbianos patógenos (por ejemplo, organismos cariogénicos tales como *Streptococcus mutans*), la película biológica resultante puede dar lugar a una infección microbiana asociada con una película biológica. Ejemplos de infecciones microbianas asociadas a una película biológica incluyen las infecciones de los tejidos blandos orales, dientes e implantes dentales, del oído medio, tracto gastrointestinal; tracto urogenital; tejido pulmonar/vías aéreas; ojo; prótesis del tracto urinario; membrana peritoneal y catéteres de diálisis peritoneal, catéteres permanentes para hemodiálisis y para la administración crónica de agentes quimioterápicos (catéteres de Hickman); implantes cardíacos, tales como marcapasos, válvulas cardíacas protésicas, dispositivos de asistencia ventricular, e implantes vasculares sintéticos y endoprótesis vasculares; prótesis, dispositivos de fijación interna, y suturas percutáneas; y tubos traqueales y ventiladores. Tanto los implantes biomédicos o dispositivos permanentes y subcutáneos son sitios potenciales para las infecciones microbianas o basadas en películas biológicas y representan dianas importantes para el control de la infección, inflamación y respuesta inmunitaria. Los sistemas biomédicos tales como oxigenadores de la sangre, lavados traqueales, unidades de agua dentales, y dializadores también son susceptibles de contaminación bacteriana y formación de películas biológicas.

En otra realización más, la composición de la presente invención se puede utilizar para alterar el equilibrio de una película biológica que contiene patógenos (por ejemplo, una película biológica con sobre población de organismos microbianos patógenos) tal que los organismos microbianos patógenos indeseables (organismos microbianos diana) se eliminan, inhiben o reducen selectivamente, y las poblaciones microbianas deseables, no patógenas (organismos microbianos no diana) sufren un impacto mínimo. La composición puede utilizarse en muchos sitios del cuerpo de un animal o ser humano que tenga las superficies mucosas colonizadas por películas biológicas de múltiples especies microbianas. Ejemplos de estos lugares incluyen, boca, vagina, tracto gastrointestinal (GI), tracto esofágico, tracto respiratorio, implantes. Por ejemplo, en la boca humana existen normalmente muchos microbios diferentes que incluyen levaduras y bacterias. La mayoría de las bacterias son bacterias comensales no perjudiciales. La administración de la composición de la presente invención se dirige específicamente, por ejemplo a los organismos cariogénicos (por ejemplo, *Streptococcus mutans*) y tendrán un efecto mínimo en los organismos microbianos no diana, y por tanto no tendrán un efecto no deseable sobre los organismos microbianos no diana.

La composición de la presente invención se puede utilizar también para inhibir organismos microbianos diana o para aplicarla a varias superficies de películas biológicas fuera de un cuerpo humano, por ejemplo, artículos industriales o aplicaciones. Por ejemplo, en la industria de procesamiento de alimentos se puede administrar la composición de la presente invención en equipos de procesamiento de alimentos o en el mismo alimento para prevenir infecciones relacionadas con el consumo de alimentos, por ejemplo, *Salmonella* en instalaciones de procesamiento de aves.

El organismo microbiano diana de la presente invención puede ser cualquier bacteria, *Rickettsia*, hongos, levaduras, protozoos o parásitos. En una realización el organismo microbiano diana es un organismo cariogénico, por ejemplo *Streptococcus mutans*. En otra realización, los organismos microbianos diana incluyen sin limitación, *Escherichia coli*, *Candida*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium difficile*, *Cryptococcus neoformans*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus pneumoniae*.

Por ejemplo, la infección por *S. mutans* comúnmente se encuentra en la boca y causa caries dental. *Porphyromonas gingivalis*, varias especies de *Actinomyces*, espiroquetas, y *Bacteroides pigmentados negros* se asocian comúnmente con infecciones de las encías y los tejidos conectivos que las rodean, lo que produce enfermedades periodontales. Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, o *Moraxella catarrhalis* se encuentran comúnmente en la otitis media aguda (OMA) y en el derrame de otitis media (OME) como complicaciones de infecciones de vías respiratorias altas en niños jóvenes.

La bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) se encuentra en la capa de la mucosa gástrica o adherido en la capa epitelial del estómago, y produce más del 90% de las úlceras duodenales y hasta un 80% de las úlceras gástricas. Otras infecciones del tracto GI incluyen sin limitación, infección bacteriana por *Campylobacter*, en principio el *Campylobacter jejuni* se asocia con diarrea, el cólera producida por serogrupos de *Vibrio cholerae*, la salmonelosis producida por bacterias de *Salmonella* tales como *S. typhimurium* y *S. enteritidis*, shigeliosis producida por la bacteria *Shigella*, por ejemplo, *Shigella dysenteriae* y diarrea del viajero producida por *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). La infección por *Clostridium difficile* también se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal y el tracto esofágico.

65

Los organismos *Pseudomonas* se habían asociado como la fuente más común de brotes nosocomiales; además, se les ha incriminado en la bacteriemia, endocarditis y osteomielitis de adictos a narcóticos. Las infecciones por *Pseudomonas* también se pueden producir en el oído, pulmón, piel, o tracto urinario de pacientes; a menudo después de que el agente patógeno primario se haya erradicado con antibióticos. Las infecciones graves se asocian casi invariablemente con daños en el tejido local o con disminución de la resistencia del huésped. Los pacientes comprometidos con fibrosis quística y los que tienen neutropenia muestran un riesgo particular a infecciones graves por *P. aeruginosa*. Tienen probabilidad de desarrollar infecciones por *Pseudomonas* los bebés prematuros; los niños con anomalías congénitas y los pacientes con leucemia; los pacientes con quemaduras; y los pacientes geriátricos con enfermedades debilitantes. El organismo prevalece en receptáculos urinarios y en catéteres, y en las manos del personal de hospitales.

Los estafilococos, de los que el *Staphylococcus aureus* es el más importante patógeno para los seres humanos, son bacterias resistentes, Gram positivas que colonizan la piel de la mayoría de los seres humanos. Si la piel o las membranas mucosas se alteran por una cirugía o un traumatismo, los estafilococos pueden acceder y proliferar en los tejidos subyacentes, dando lugar a abscesos típicamente localizados superficialmente. Aunque estas infecciones cutáneas normalmente no son graves, los organismos en multiplicación pueden invadir el sistema linfático y la sangre, dando lugar a complicaciones potencialmente graves de bacteriemia estafilocócica.

Estas complicaciones incluyen choque séptico e infecciones metastáticas graves, incluyendo endocarditis, artritis, osteomielitis, neumonía y abscesos prácticamente en cualquier órgano. Ciertas cepas de *S. aureus* producen toxinas que producen erupciones cutáneas o que median en una disfunción multisistémica, como el síndrome de choque tóxico. Los estafilococos coagulasa negativos, particularmente *S. epidermidis*, son importantes patógenos nosocomiales, con una predilección particular para infectar los catéteres vasculares y los dispositivos protésicos. El *S. saprophyticus* es causa común de infecciones del tracto urinario.

Las infecciones por levaduras o *Candida* (Candidiasis) se producen típicamente oralmente (candidiasis orofaríngea u OPC) o vaginalmente (candidiasis vulvovaginal o VVC). Las candidiasis se producen por un cambio en el ambiente local que permite a las cepas de *Candida* (más comúnmente *Candida albicans*) que ya están presentes en la piel y en las superficies mucosas tales como las de la boca y vagina que se multipliquen sin control. La gonorrea, clamidias, sífilis y tricomoniasis son infecciones del aparato reproductor, que dan lugar a enfermedades de transmisión sexual, por ejemplo, enfermedad pélvica inflamatoria.

Administración de composiciones de acuerdo con la presente invención, El STAMP o la composición de STAMP se puede administrar a un sujeto por cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo sin limitación, la administración vía oral, enteral, bucal, nasal, tópica, rectal, vaginal, por aerosol, transmucosa, epidérmica, transdérmica, oftálmica, pulmonar, y/o parenteral. Una administración parenteral se refiere a una vía que típicamente se relaciona con una inyección que incluye pero no se limita a la inyección y/o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intramedular y/o intraesternal.

El STAMP o la composición de STAMP se pueden dar a un sujeto en forma de formulaciones o preparaciones adecuadas para cada vía de administración. Las formulaciones útiles en la presente invención incluyen uno o más STAMP, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables de los mismos, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitarias y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. La cantidad del principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se va a tratar y el modo de administración particular. La cantidad de un STAMP que se puede combinar con un material vehículo para producir una dosis eficaz farmacéuticamente será generalmente la cantidad de STAMP que produce un efecto terapéutico. Generalmente aparte del cien por cien, esta cantidad variará desde aproximadamente el 1 por ciento a aproximadamente el noventa y nueve por ciento del STAMP, preferentemente desde aproximadamente el 5 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento.

Los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un STAMP con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan por la asociación uniforme e íntima de un STAMP con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración vía oral pueden estar en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (utilizando una base de saborizante, normalmente de sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (que utilizan una base inerte, tal como la gelatina y glicerina, o sacarosa, y goma arábica) y/o como enjuagues bucales y similares, que contienen cada uno una cantidad predeterminada de STAMP como principio activo. Un compuesto se puede administrar también como un bolo, electuario, o pasta. Por ejemplo, en una realización, las composiciones de la presente invención se utilizan para tratar o prevenir las infecciones por organismos cariogénicos, por ejemplo, la infección por *S. mutans* que se asocia con caries dentales y se preparan como aditivos alimentarios o cualquiera de

los productos que tienen un contacto directo con el ambiente oral, especialmente un ambiente oral susceptible de caries dentales. Para tratar o prevenir las caries dentales se pueden formular una o más de las composiciones de la presente invención en una leche maternizada, un enjuague bucal, grageas, gel, laca, pasta de dientes, palillo de dientes, cepillo de dientes y otros dispositivos de limpieza dental, dispositivos de suministro localizado tales como

5 polímeros de liberación sostenida y microcápsulas, soluciones de irrigación oral y cualquier tipo de suministro sea mecánico o como enjuagues orales, chupetes, y cualquier alimento incluyendo sin limitación, chicles, golosinas, bebidas, panes, galletas, y leche.

En las formas de dosificación sólidas para su administración vía oral (por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el STAMP se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetil celulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como el glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o

10 tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes tales como el caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como el talco, el estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos y

15 píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina duras y blandas utilizando excipientes tales como la lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido se puede producir por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos se pueden preparar utilizando un aglutinante (por ejemplo, gelatina, o hidroxipropil metilcelulosa), lubricantes, diluyentes inertes, conservantes, desintegrantes (por ejemplo, glicolato almidón sódico o carboximetil celulosa sódica reticulada), agentes dispersantes o activos de superficie. Los comprimidos moldeados se pueden producir moldeando en una máquina adecuada una mezcla del péptido en polvo o el peptidomimético

20 humedecido con un diluyente inerte líquido. A los comprimidos, y otras formas sólidas de dosificación tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, se les puede opcionalmente hacer una muesca o se pueden preparar con revestimientos o cápsulas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También se pueden formular de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada de un STAMP utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil deseado de liberación, otras matrices de polímeros, liposomas y/o microsferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retenga las bacterias, o por la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algunos otros

25 medios inyectables estériles, inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones pueden también contener opcionalmente agentes calmantes y pueden estar en una composición que libera el STAMP solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de forma demorada. Ejemplos de composiciones embebidas que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El STAMP también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas para administración vía oral incluyen las emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del STAMP, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes que se utilizan comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como etil alcohol, alcohol isopropílico, etil carbonato, etil acetato, alcohol bencílico, benzoato bencílico, propilenglicol, 1,3-butilen glicol, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol

30 tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes suspensores, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, aromatizantes y conservantes.

Las suspensiones, además del STAMP, pueden contener agentes suspensores como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitán polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más STAMP con uno o más excipientes o vehículos adecuados no irritantes que comprenden, por ejemplo, manteca de coco, polietilén glicol, cera de supositorio o un salicilato, que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirán en la cavidad rectal o vaginal y liberarán el principio activo. Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen, pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o formulaciones en aerosol que contienen tales vehículos y

60 que se sabe en la técnica que son apropiados.

Las formulaciones para la administración tópica o transdérmica o epidérmica de una composición de STAMP incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El principio activo se puede mezclar bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con conservantes, tampones o propelentes que se puedan necesitar. Los ungüentos, pastas, cremas, y geles pueden
 5 contener, además de la composición de STAMP, excipientes tales como grasas animales o vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y aerosoles pueden contener, en adición a la composición del STAMP, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente los
 10 propelentes comunes, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

De manera alternativa, la composición de STAMP se puede administrar por aerosol. Esto se consigue preparando un aerosol acuoso, una preparación de liposomas o partículas sólidas que contienen los STAMP. Se puede utilizar
 15 una suspensión no acuosa (por ejemplo, con un propelente fluorocarbonado). También se pueden utilizar nebulizadores sónicos. Un aerosol acuoso se puede hacer formulando una solución acuosa o suspensión del agente junto con vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables y estabilizantes. Los vehículos y estabilizantes varían con las necesidades del compuesto particular, pero incluyen típicamente tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic, o polietilenglicol), proteínas inocuas como la seroalbúmina, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

También se pueden utilizar parches transdérmicos para suministrar composiciones de STAMP en un sitio de infección. Tales formulaciones se pueden hacer disolviendo o dispersando el agente en un medio apropiado. Se
 25 pueden utilizar también potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del peptidomimético a través de la piel. La tasa de tal flujo se puede controlar sea proporcionando una membrana de control de la tasa o dispersando el peptidomimético en una matriz de polímero o gel.

Se contempla que las formulaciones oftálmicas, ungüentos oftálmicos, polvos, soluciones y similares también están
 30 en el ámbito de la presente invención.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral comprenden un STAMP en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles farmacéuticamente
 35 aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en soluciones o emulsiones inyectables estériles inmediatamente antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que dan lugar a una formulación isotónica con la sangre del presunto receptor o agentes suspensores o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen agua, etanol, poliol (por ejemplo, tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como el etil oleato. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por el
 40 uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño necesario de partículas en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar incluyendo varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, ácido sórbico fenol, y similares. También es deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además se puede inducir una absorción prolongada de
 50 la forma farmacéutica inyectable incluyendo agentes que retardan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

Las formas inyectables de depósito se hacen formando matrices microencapsuladas de un STAMP o polímeros biodegradables tales como poliláctico-poliglicólico. Dependiendo de la relación de STAMP respecto al polímero, y la
 55 naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación del fármaco. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli (ortoésteres) y poli (anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan encerrando el STAMP en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con el tejido corporal.

En una realización preferida de la invención, una composición de STAMP se suministra en el sitio de la enfermedad o infección en una dosis terapéuticamente eficaz. Como se sabe en la técnica de la farmacología, la cantidad precisa de una dosis farmacéuticamente eficaz de un STAMP, que produzca los resultados más eficaces en términos de eficacia de tratamiento en un paciente determinado, dependerá por ejemplo, de la actividad, la naturaleza particular, la farmacocinética, la farmacodinámica y la biodisponibilidad de un STAMP en particular, el estado fisiológico del
 60 sujeto (incluyendo la raza, edad, sexo, peso, dieta, tipo de enfermedad y estado, estado físico general, respuesta a una dosificación determinada y tipo de medicación), la naturaleza de los vehículos farmacéuticamente aceptables en

una formulación, la vía y la frecuencia de administración que se utiliza, y la gravedad o la propensión de una enfermedad causada por organismos microbianos patógenos diana, por nombrar algunos. Sin embargo, los directrices anteriores se pueden utilizar como base para afinar el tratamiento, por ejemplo, determinando la dosis óptima de administración, que no necesitará más que una experimentación de rutina que consista en controlar al sujeto y ajustar la dosificación. Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20ª. sup. edición, Williams & Wilkins PA, EE. UU.) (2000).

Ejemplos

10 Ejemplo 1. Destrucción dirigida de *Streptococcus mutans* por una lista de péptidos antimicrobianos

1.1 Diseño y construcción de STAMP utilizados en el ejemplo y componentes de STAMP (por ejemplo, péptidos/dominios dirigidos selectivamente, péptidos antimicrobianos, y péptidos enlazadores). Los STAMP y sus componentes diseñados y sintetizados en los ejemplos se enumeran en la Tabla 1. Se construyó un STAMP inicial sintetizando un péptido de longitud completa que estimula la competencia específica contra *S. mutans* (CSP, 21 aminoácidos, SEC ID N° 1, feromona producida por *S. mutans*) con el péptido antimicrobiano G2 (SEC ID N° 3) (16 aminoácidos, derivado del péptido antimicrobiano de amplio espectro novispirina G10 (SEC ID N° 35) (Eckert y col., 2006) sea en el extremo C o en el extremo N. El ensayo biológico de esos STAMP no reveló ninguna actividad microbiana. Los 16 aminoácidos del extremo C de CSP llamados CSP_{C16} (SEC ID N° 2), que en estudios previos había mostrado tener aún una actividad feromona (Qi y col., 2005), se utilizó como un sustituto del CDP. Se sintetizaron entonces péptidos que contenían CSP_{C16} tanto en el extremo N o el C de G2, con diferentes regiones de enlazador de aminoácidos flexibles entre ellos, y se seleccionaron por sus actividades antimicrobianas (datos no mostrados). De entre los potenciales STAMP, se seleccionó para posteriores estudios el C16G2 (SEC ID N° 4) que consistía (del extremo N al extremo C) en CSP_{C16}, un péptido enlazador corto (GGG; SEC ID N° 17) y G2 (Tabla 1), debido a su concentración inhibitoria mínima (CIM) mejorada, con cinéticas de destrucción mucho mayores y selectividad contra *S. mutans* (cuando se comparaba con G2 solo), como se desvela en detalle posteriormente.

Tabla 1 – Secuencias de péptidos (código de aminoácidos de una letra) de los STAMP seleccionados, y componentes de STAMP

Péptido	Propiedades	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
CSP	Feromona	SGSLSTFFRLFNRSFTQALGK	1
C16 (CP _{C16})	Dirigido	TFFRLFNRSFTQALGK	2
G2	Antimicrobiano	KNLRRIIRKGIHIIKKY*	3
C16G2	STAMP	TFFRLFNRSFTQALGKGGGKNLRRIIRKGIHIIKKY*	4
M8 or CSP _{M8}	Dirigido	TFFRLFNR	5
M8G2	STAMP	TFFRLFNRRGGGKNLRRIIRKGIHIIKKY*	6
S6L3-33	Antimicrobiano	FKKFWKWFRRF	7
C16-33	STAMP	TRRRLFNRSFRQALGKSGGGFKKFWKWFRRF	8
M8-33	STAMP	TFFRLFNRRGGGFKKFWKWFRRF	9
1903	Dirigido	NIFEYFLE	10
BD2.21	Antimicrobiano	KLFKFLRKHLL	11
1903-G2	STAMP	NIFEYFLEGGGKNLRRIIRKGIHIIKKY	12
1903-BD2.21	STAMP	NIFEYFLEGGGKLFKFLRKHLL	13
C16-BD2.21	STAMP	TFFRLFNRSFTQALGKGGGKLFKFLRKHLL	14
M8-BD2.21	STAMP	TFFRLFNRRGGGKLFKFLRKHLL	15
1903-33	STAMP	NIFEYFLEGGGFKKFWKWFRRF	16

* Señala la amidación del extremo C del péptido

Están subrayadas las regiones de enlazador entre los péptidos dirigidos y antimicrobiano

Para determinar si había una región en la secuencia de CSP_{C16} que fuera la responsable de la unión específica con *S. mutans*, los inventores sintetizaron una serie de fragmentos de CSP_{C16} marcados con fluorescencia, y los analizaron para detectar su capacidad de unirse a *S. mutans*. Se utilizaron las siguientes estrategias para hacer una disección de la secuencia de CSP_{C16} (Tabla 2): Primero, se construyeron una serie de fragmentos generando eliminaciones de 3 o 4 aminoácidos, desde el extremo N al C, a lo largo de la secuencia de CSP_{C16} (C16-1 a C16-5). También se sintetizaron péptidos que carecían de partes más extensas del extremo C o N de CSP_{C16} (C16-6 a C16-12). Adicionalmente, se construyeron péptidos con sustituciones de Arg por Asn (un cambio de carga de positiva a negativa) (C16-4) o sustituciones de Phe por Gly (para un descenso general en la hidrofobicidad) (C16-3), así como péptidos que representaban un resto 4-Ala seleccionado de la secuencia C16 (C16-15 a C16-18). Se llevaron a cabo

5 ensayos de unión como se había descrito previamente (15), y los resultados se resumen en la Tabla 2. El CSP_{C16} y cualquiera de los péptidos que contienen de Thr6 hasta Arg13 (TFFRLFNR, SEC ID N° 5) de CSP se detectó que se unían a *S. mutans* UA159 o células ComD, mientras que cualquier interrupción en esta región por eliminación, sustitución o selección de Ala, reducía la detección fluorescente de la unión al compararse con CSP_{C16}. Algunos péptidos tales como C16-3, -11, -16 y -17, que contenían solo Thr6-Phe11 y Phe7-Phe11, mostraban unión pero con una intensidad más débil que CSP_{C16} o cualquiera de otros péptidos con la región Thr6-Arg13 completa. Además, los inventores observaron que las sustituciones de Arg por Asn o Phe por Gly eran perjudiciales para la unión celular, sugiriendo que estos restos con TFFRLFNR (SEC ID N° 5, llamado M8 o CSP_{M8}) son necesarios para unirse a *S. mutans*. CSP_{M8} mostraba poca o ninguna unión con los otros estreptococos listados en la Tabla 3, indicando que CSP_{M8} puede ser capaz también de unirse específicamente a las superficies de *S. mutans*. En general, los péptidos listados en la Tabla 2 que muestran unión positiva a *S. mutans* se pueden utilizar como péptidos dirigidos contra *S. mutans*. Estos péptidos incluyen C16 (SEC ID N° 2), C16-3 (SEC ID N° 39), C16-4 (SEC ID N° 40), C16-5 (SEC ID N° 41), C16-6 (SEC ID N° 42), C16-11 (SEC ID N° 47), C16-12 (SEC ID N° 5), C16-16 (SEC ID N° 51), C16-17 (SEC ID N° 52), y C16-18 (SEC ID N° 53).

15

Tabla 2 – Unión de péptidos fragmentos de CSP a *S. mutans*.
La unión relativa informada representa los resultados de UA159 y *ComD*.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Unión relativa a <i>S. mutans</i>
C16 (SEC ID N° 2)	T F F R L F N R S F T Q A L G K	+++
<u>Eliminaciones internas de 3 a 4 aminoácidos</u>		
C16-1 (SEC ID N° 37)	- - - R L F N R S F T Q A L G K	-
C16-2 (SEC ID N° 38)	T F F - - - N R S F T Q A L G K	-
C16-3 (SEC ID N° 39)	T F F R L F - - - - T Q A L G K	++
C16-4 (SEC ID N° 40)	T F F R L F N R S - - - A L G K	+++
C16-5 (SEC ID N041)	T F F R L F N R S F T Q - - - K	+++
<u>Eliminaciones terminales</u>		
C16-6 (SEC ID N° 42)	T F F R L F N R S - - - - - -	+++
C16-7 (SEC ID N° 43)	- - - R L F N R S F T Q A - - -	-
C16-8 (SEC ID N° 44)	- - - - - - - R S F T Q A L G K	-
C16-9 (SEC ID N° 45)	T F F - - - - - - - - - -	-
C16-10 (SEC ID N° 46)	T F F R - - - - - - - - - -	-
C16-11 (SEC ID N° 47)	T F F R L - - - - - - - - - -	+
C16-12 (SEC ID N° 5) (CSP _{M8})	T F F R L F N R - - - - - - -	+++
<u>Sustituciones</u>		
C16-13 (SEC ID N° 48)	T G G R L G N R S G T Q A L G K	-
C16-14 (SEC ID N° 49)	T F F N L F N N S F T Q A L G K	-

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Unión relativa a <i>S. mutans</i>
<u>Selección de Alanina</u>		
C16-15 (SEC ID N° 50)	A A A A L F N R S F T Q A L G K	-
C16-16 (SEC ID N° 51)	T F F R A A A S F T Q A L G K	+
C16-17 (SEC ID N° 52)	T F F R L F N R A A A A L G K	++
C16-18 (SEC ID N° 53)	T F F R L F N R S F T Q A A A A	+++

Los péptidos dirigidos específicos para *S. mutans* 1903 (SEC ID N° 10) y los péptidos antimicrobianos S6L3-33 (SEC ID N° 7) y BD2.21 (SEC ID N° 13) se desarrollaron en el laboratorio de los inventores (véase el Ejemplo 4). Los péptidos dirigidos se conjugaron con los péptidos antimicrobianos por medio de un enlazador GGG (SEC ID N° 17) para dar como resultado los STAMP C16-33 (SEC ID N° 8), M8-33 (SEC ID N° 9), 1903-BD2.21 (SEC ID N° 13), y C16-BD2.21 (SEC ID N° 14), todos los cuales se ensayaron de manera similar a C16G2 y M8G2.

Todos los péptidos enumerados en las Tablas 1 y 2 se sintetizaron utilizando ciclos de doble acoplamiento por los métodos de referencia de síntesis en fase sólida 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) (431A Peptide Synthesizer, Applied Biosciences o Apex396, Advanced Chemtech) como se había descrito anteriormente (Eckert y col., 2006). Los péptidos completados se escindieron en resina con un 95% de ácido trifluoroacético (TFA) con aceptores apropiados y se purificaron al 90-95% por cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa (RP-HPLC) (ACTA Purifier, Amersham). Se determinó la masa molecular del péptido por espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Los péptidos C16G2, G2, y M8G2 se sintetizaron con el extremo C amidado utilizando resina Fmoc-Tyr (tBu)-Rink Amide MBHA (Anaspec). Todos los otros péptidos se sintetizaron con resinas Wang sustituidas apropiadamente.

1.2 Marcado fluorescente de péptidos y microscopía de fluorescencia. Se marcaron alícuotas de CSP_{C16} (SEC ID N° 2), fragmentos de péptidos CSP (Tabla 2), y C16G2 (SEC ID N° 4) con carboxifluoresceína (Sigma) como se había descrito anteriormente (Eckert y col., 2006). Después de la escisión de los péptidos pero antes del ensayo de marcado bacteriano, se controló fluorimétricamente la intensidad de fluorescencia por μM ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, VersaFluor, BioRad) y se descubrió que era relativamente similar (datos no mostrados). Para evaluar el nivel de unión del péptido a las bacterias, se lavaron los estreptococos de un cultivo de una noche (DO₆₀₀ de 0,7-1,0) con solución salina tamponada de fosfato (1 x PBS), se diluyeron 1:2 en 1 x PBS, y se expusieron al péptido (16 μM) durante 5 min a 25 °C. Tras la incubación con el péptido, el agente no unido se retiró de las bacterias por tres ciclos de centrifugación (5 min, 16.000 x g) y se resuspendieron en 1 x PBS. Se evaluó el marcado de estreptococos orales utilizando el campo de brillo y el microscopio de fluorescencia (Nikon E400) a 40x aumentos. Las imágenes digitales utilizadas para la evaluación semicuantitativa de la unión se hicieron con el software suministrado por el fabricante (SPOT, Diagnostics).

1.3 Determinación de la actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana general de los péptidos contra bacterias planctónicas se determinó por un ensayo de CIM en caldo TH (todos los estreptococos orales) (Qi y col., 2005).

Se cultivaron cepas de *S. mutans*, *S. gordonii* Challis (DL1), y *S. sanguinis* NY101 en caldo de cultivo Todd Hewitt (TH, Fisher) a 37 °C en condiciones anaeróbicas (80% N₂, 10% CO₂ y 10% de H₂). Las cepas de *S. mutans* UA159 (Ajdic y col., 2002), ATCC 25175, y T8 (Rogers, 1975), son aislados clínicos del tipo silvestre, mientras que ComD es un mutante knockout que se construyó previamente basándose en el tipo silvestre UA140 (Qi y col., 2005). La cepa de *S. mutans* JM 11 que expresa luciferasa se construyó a partir de UA140 como se había descrito (Merritt y col., 2005). Las células bacterianas en crecimiento exponencial se diluyeron a $\sim 1 \times 10^5$ ufc/ml en TH y se colocaron en placas de 96 pocillos (Fisher). Los péptidos se diluyeron entonces seriadamente y se añadieron a las baterías. Se determinó la CIM identificando la concentración de péptido que inhibía completamente el crecimiento bacteriano en ~ 24 horas de incubación.

1.4 Determinación de cinéticas bactericidas. Para determinar la tasa de destrucción a corto plazo y la selectividad de C16G2 y G2 los inventores llevaron a cabo experimentos de destrucción en el tiempo, esencialmente como se había descrito anteriormente (Eckert y col., 2006). Se cultivaron *S. mutans* UA159, *S. gordonii*, o *S. sanguinis* hasta la fase log y se diluyeron a $\sim 1 \times 10^5$ ufc/ml en medio de crecimiento. Bajo condiciones anaeróbicas, se

añadieron 25 mM de G2 o C16G2 a la suspensión celular y se incubó a 25 °C. En 1 min, se retiraron 10 µl de suspensión celular, se recuperaron por dilución en medio de crecimiento (1:50) y se mantuvieron en hielo. Para colocarlas en placas, se diseminaron 20-500 µl de células recuperadas en medio de crecimiento en placas agar y se contaron las colonias tras una noche de incubación a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Los inventores consideraron que 60 ufc/ml era el límite de detección para este ensayo. Los valores de supervivencia en ufc/ml se expresaron como la relación de supervivencia de los cultivos tratados con C16G2 con respecto a las ufc/ml de las muestras expuestas a G2.

1.5 Examen de la actividad antimicrobiana contra películas biológicas de especie única. Para iniciar la formación de película biológica, se sembraron $\sim 1 \times 10^7$ bacterias por pocillo (de cultivos de una noche) en medio TH (100 µl) en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Para todos los estreptococos excepto *S. mutans*, el medio se suplementó con un 0,5% (p/v) de manosa y glucosa. Las películas biológicas de *S. mutans* UA159 se cultivaron con un 0,5% (p/v) de sacarosa. Las placas se centrifugaron entonces brevemente para aglomerar las células, y las bacterias se incubaron durante 3-4 horas a 37 °C para la formación de la película biológica. Tras la incubación, el sobrenadante se retiró cuidadosamente y se trataron las películas biológicas con 25 µM de péptido en 1 x PBS o 1 x PBS solo durante 1 minuto. La solución de péptidos se retiró entonces y se añadieron 100 µl de TH para diluir más cualquier remanente de péptido. Para minimizar la pérdida de película biológica, las células se centrifugaron brevemente después de la adición de TH, tras lo cual se retiraron los sobrenadantes y se volvió a añadir medio reciente más los azúcares apropiados. Las células se incubaron entonces anaeróticamente a 37 °C y el crecimiento de la película biológica se controló durante un tiempo midiendo la absorbancia a una DO_{600} con un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus, BioRad).

1.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana contra la película biológica bacteriana en saliva. Para estos experimentos, los inventores emplearon métodos similares a los que se habían descrito anteriormente (Bleher y col., 2003). Un día antes del ensayo, se recolectó y se agrupó la saliva de 5 voluntarios adultos en el laboratorio, se diluyó 1:4 en caldo TH y se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min. El sobrenadante se esterilizó entonces con un filtro (filtro de 0,2 µm, Nunc) y se almacenó a 4 °C. Una parte de la saliva agrupada se diluyó también 1:2 en 1 x PBS y se procesó como antes. El día del ensayo, se normalizaron cultivos de una noche de JM11 y otros estreptococos orales a una DO_{600} de 1,0 y se añadieron $\sim 3 \times 10^6$ ufc/ml de cada especie a 10 ml de la saliva diluida con TH. Se añadieron entonces la sacarosa, manosa y glucosa (1% p/v de cada) y se mezcló la solución. Se colocaron alícuotas (500 µl) de la mezcla de saliva y bacterias en tubos de Eppendorf de 1,5 ml (Fisher). Después de una breve centrifugación (4.000 x g, 2 min), los tubos se incubaron durante 3-4 horas a 37 °C para formar películas biológicas multi-especie. Los sobrenadantes se retiraron entonces y el medio gastado se reemplazó con 100 µl de saliva diluida en PBS (1:2) más 25 µM de péptido (añadido reciente). Después de que las películas biológicas se expusieran al agente durante 5 minutos, se retiró la saliva-PBS, las células se centrifugaron brevemente, y se volvió a añadir 500 µl de saliva-TH reciente con azúcares. A cada punto de tiempo, se midió el total de crecimiento de la película biológica leyendo la absorbancia a una DO_{600} , y se examinó la salud de *S. mutans* en la población por expresión relativa de luciferasa (producción de unidades de luz relativa, (RLU)), como se había descrito anteriormente (Merritt y col., 2005). En resumen, las películas biológicas se resuspendieron por agitación y aspiración y 100 µl de cada muestra se transfirió a un nuevo tubo de Eppendorf con 25 µl de una solución de D-luciferina 1 mM (Sigma) suspendida en tampón citrato 0,1 M, pH 6,0. Para el punto de tiempo de 2 horas, las películas biológicas se estimularon tras resuspensión con la adición de sacarosa 1% 30 min antes de registrar la actividad de luciferasa. La producción de RLU se midió utilizando un luminómetro TD 20/20 (Turner Biosystems) y los valores se obtuvieron de la media de 3 muestras independientes. Los datos se representaron como RLU/ DO_{600} en el tiempo.

1.7 C16G2 tenía una actividad antimicrobiana y especificidad aumentadas contra células de *S. mutans* planctónicas. Para evaluar la actividad antimicrobiana y especificidad general de C16G2, se llevaron a cabo ensayos de concentración inhibidora mínima (CIM) contra un panel de especies bacterianas que incluyen varias cepas de *S. mutans* y estreptococos orales relacionados estrechamente (Gilmour y col., 1987). Como se muestra en la Tabla 3, los valores de CIM de C16G2 varían de 3-5 µM para todas las cepas de *S. mutans* ensayadas, un aumento de 4-5 veces la actividad antimicrobiana del péptido antimicrobiano parenteral G2 (12-20 µM). En comparación, los inventores observaron pocas diferencias en la susceptibilidad entre G2 y C16G2 (2 veces o menos) contra *S. gordonii* y *S. sanguinis*.

G10KHc (SEC ID N° 36) no mostró mucha mejoría en la CIM después de 24 h de incubación, pero mostraba unas cinéticas de destrucción muy aumentadas y una especificidad contra las bacterias diana durante una exposición corta (cuando se comparaban con el péptido antimicrobiano no dirigido parental (Eckert y col., 2006). Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos comparativos para examinar la capacidad de destrucción de C16G2 y G2 contra sus bacterias diana y no diana tras una exposición corta. Como se muestra en la Figura 1, con una exposición de 1 min, C16G2 era unas 20 veces más activo contra su bacteria *S. mutans* diana, en comparación con G2, mientras que mostraba un nivel de actividad similar a G2 contra otros estreptococos orales ensayados. Estos hallazgos proporcionan las primeras indicaciones de que la adición de un dominio de dirección CPS_{C16} a G2 había dado como resultado una actividad antimicrobiana selectiva contra *S. mutans*, y no contra otros estreptococos relacionados estrechamente.

Tabla 3 – CIM de STAMP que contienen G2 y componentes de STAMP contra bacterias. Las CIM representan medias de al menos 3 experimentos independientes con desviaciones estándar.

Cepas	CSP	CSP _{C16}	CIM (μM) de:			
			G2	C16G2	CSP _{M8}	M8G2
<i>S. mutans</i>						
UA159	50,8±9,3	>60	12,1±4,5	3,0±1,6	>60	3,25±1,9
25175	>60	>60	14,8±2,0	3,8±0,3	>60	3,5±0,5
T8	>60	>60	14,2±1,5	3,7±0,2	>60	n.e.
<i>ComD</i>	>60	>60	15,3±4,2	5,1±2,4	>60	4,0±2,0
Estreptococos no mutans						
<i>S. gordonii</i>	>60	>60	41,3±14,0	23,5±7,8	>60	20±5,0
<i>S. sanguinis</i>	>60	>60	33,6±7,5	19,1±4,0	>60	15±2,5

5 1.8 C16G2 también es activo contra las células en una película biológica. El *S. mutans* existe en una película biológica predominantemente en estado de crecimiento *in vivo*. Se sabe en la técnica que las células asociadas a una película biológica son de 100 a 1.000 veces más resistentes a los antibióticos (Donlan y col., 2002). Para ensayar si C16G2 tenía aún actividad contra películas biológicas de *S. mutans in vitro*, se trataron *S. mutans*, *S. gordonii* o *S. sanguinis* asociados a películas biológicas con 25 μM de C16G2, G2, CSP, CSPC16, o 1 x PBS, durante 1 minuto, se lavaron y se controló el re-crecimiento durante el tiempo. Como se muestra en la Figura 2, las películas biológicas de *S. gordonii* o *S. sanguinis* expuestas a cualquiera de los péptidos ensayados crecían igual que las películas biológicas sin tratar tras la adición y retirada del péptido (Fig. 2 A-B). Por el contrario, las cepas de *S. mutans* UA159 (Fig. 2C) así como T8 y 25175 (datos no mostrados) se inhibían estrictamente por el tratamiento con C16G2, pero no se afectaban por tratamientos con los otros péptidos. Estos resultados indican que C16G2 pueden funcionar como un STAMP anti-*S. mutans* en un entorno de película biológica con solo un corto periodo de exposición (1 min), una ventana de tiempo que es relevante para tratamientos clínicos en la cavidad oral (Axelsson & Lindhe, 1987).

20 1.9 C16G2 puede eliminar selectivamente *S. mutans* en una película biológica de especies mezcladas. Además de crecer como una película biológica *in vivo*, *S. mutans* también está constantemente bañado en saliva y se adhiere a la superficie del diente. Para examinar si C16G2 podría eliminar selectivamente *S. mutans* bajo estas condiciones, se mezclaron 2 especies de estreptococos orales no cariogénicos (*S. gordonii* y *S. sanguinis*), con *S. mutans* JM 11, una cepa que alberga una fusión transcripcional entre luciferasa (*luc*) y el promotor para el gen constitutivamente activo lactato deshidrogenasa (*ldh*), que tiene la misma susceptibilidad a C16G2 que el tipo silvestre UA159. JM11 se ha utilizado previamente para medir el estado de las poblaciones de *S. mutans*, y mostraba un descenso de producción de unidades relativas de luz (RLU) fuertemente correlacionada con la reducción de la viabilidad celular (Merritt y col., 2005). Las películas biológicas de especies mezcladas se formaron con saliva, y luego se añadieron los péptidos (25 μM) suspendidos en saliva durante 5 min y se retiraron, y se controló el crecimiento post-tratamiento de la película biológica. Se cuantificó el número de células de *S. mutans* viables en la película biológica en paralelo con la expresión de luciferasa. Se descubrió que C16G2 era capaz de reducir drásticamente la población de *S. mutans* en la mezcla (que se refleja en la baja actividad de luciferasa) tras 5 min de exposición, al compararse con CSP_{C16} y G2 (Fig. 3). Es interesante, que incluso 120 min tras el tratamiento, el número total de *S. mutans* en la mezcla permanecía baja (Fig. 3). En conjunto, estos resultados indican que una corta exposición a C16G2 es capaz de inhibir el crecimiento selectivamente de *S. mutans* en una película biológica multi-especie y en presencia de saliva durante un mínimo de 2 h sin dañar las bacterias concomitantes o afectar la salud de la película biológica total.

40 1.10 El aumento de la actividad antimicrobiana de C16G2 está relacionado con la unión dirigida de CSP_{C16} independiente de ComD a *S. mutans*. Para explorar más el mecanismo del aumento de la actividad de C16G2 contra *S. mutans*, se marcaron con fluorescencia CSP_{C16} y C16G2 y se ensayó su capacidad para unirse a *S. mutans* y otros estreptococos. Acorde con la actividad destructora observada, se encontró que CSP_{C16} y C16G2 podían unirse específicamente a *S. mutans* con un tiempo muy corto de exposición (1-2 min), pero no con otros estreptococos orales (datos no mostrados). Estudios genéticos previos sugerían que CSP puede interactuar con ComD para activar la competencia de ADN en *S. mutans* (Li y col., 2001). Era inesperado encontrar que se observara una CIM similar para las cepas UA159 y ComD (Tabla 3). De acuerdo con esta observación, se encontró también que CSP_{C16} y C16G2 marcados con fluorescencia se unían a UA159 y la ComD mutante de manera similar, indicando que la capacidad de unión específica de CSP a *S. mutans* es independiente de ComD.

50 1.11 M8G2 tiene una actividad anti *S. mutans* similar a C16G2. Basándose en los datos anteriores, se hizo la hipótesis de que CSP_{M8} sería suficiente para funcionar como un dominio de dirección alternativo para un STAMP anti *S. mutans*. Para ensayar esta hipótesis CSP_{M8} y G2 se sintetizaron juntos para formar el STAMP M8G2 (Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 3, M8G2 presentaba CIM similares contra *S. mutans* y otros

estreptococos orales al compararse con C16G2. Además, los ensayos de inhibición de la película biológica de una especie mostraron que M8G2, al igual que C16G2, era capaz de inhibir la recuperación de películas biológicas de *S. mutans* (Fig. 4A), pero no las de *S. sanguinis* (Fig. 4B), tras una exposición de 1 min. Como el dominio CSP_{M8} es mucho más pequeño que CSP_{C16} y por lo tanto más fácil de sintetizar químicamente, estos resultados proporcionaban una base para un diseño futuro de STAMP anti *S. mutans* más cortos basados en CSP_{M8}.

1.12 STAMP dirigidos por CSP_{C16}/CSP_{M8} son funcionales con un dominio de destrucción alternativo. Como la dirección y los componentes antimicrobianos de un STAMP son funcionalmente independientes, además de sintetizarse como un péptido (Eckert y col., 2006), se pensó que una combinación de CSP_{C16} o CSP_{M8} con un péptido antimicrobiano general diferente también podía dar como resultado un aumento de la actividad destructora y selectividad hacia *S. mutans* cuando se comparaban con un péptido destructor no dirigido solo. Por lo tanto, ambos péptidos dirigidos se conjugaron con S6L3-33, un péptido antimicrobiano de amplio espectro modelo, con una disposición similar a C16G2 y M8G2, dando lugar a los STAMP C16-33 y M8-33 (Tabla 1). Como se muestra en la Tabla 4, se observó una diferencia de la CIM de 2-3 veces entre S6L3-33 y los STAMP derivados contra *S. mutans* y los otros estreptococos orales ensayados. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo estudios en la película biológica de una especie sola (mostrado en la Fig. 5), la actividad de los STAMP selectivos para *S. mutans* era fácilmente aparente: tanto C16-33 como M8-33 eran capaces de retardar el crecimiento de *S. mutans* en la película biológica tras una exposición corta (Fig. 5A), mientras que los cultivos de *S. sanguinis* no se afectaban por la administración del STAMP (Fig. 5B). Estos resultados indican un claro aumento de la actividad selectiva del STAMP para las películas biológicas de *S. mutans*.

Tabla 4 – CIM de los STAMP construidos con la región antimicrobiana S6L3-33.
Las CIM representan las medias de al menos 3 experimentos independientes con desviaciones estándar.

Péptido	CIM (μM)			
	UA159	<i>ComD</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. gordonii</i>
S6L3-33	7,0±3,0	6,5±2,5	40±7,5	20±5,0
C16-33	2,5±2,1	2,2±0,5	13,3±5,8	14,6±5,0
M8-33	2,5±2,0	2,5±2,0	20±2,0	10±2,5

En general, se sintetizaron y se evaluaron una serie de STAMP que mostraban especificidad para *S. mutans* y no para otros estreptococos orales. Los STAMP se diseñaron para que tuvieran una actividad selectiva frente a *S. mutans* incorporando partes de una feromona natural producida por estas bacterias cariogénicas (CSP) como dominio de dirección en el péptido STAMP lineal. Utilizando exclusivamente péptidos lineales cortos (< 3 kD) para las regiones de dirección y antimicrobiana, los inventores fueron capaces de sintetizar rápidamente y aislar la molécula completa de STAMP en una pieza por medio de métodos químicos en fase sólida, una ventaja distintiva sobre la expresión recombinante y las difíciles rutas de purificación para construir antimicrobianos dirigidos basados en proteínas grandes (> 70 kD) que se habían descrito (Qiu y col, 2005). Adicionalmente, la flexibilidad proporcionada por las rutas sintéticas les permitieron aumentar fácilmente la diversidad de STAMP cambiando entre diferentes combinaciones de dominios de dirección (CSP_{M8} y CSP_{C16}) y dominios de destrucción (G2 y S6L3-33) cuando se construyeron STAMP contra *S. mutans*, una tarea que de otra manera necesitaría procedimientos de clonación tediosos.

Como se muestra en la Figura 5, CSP_{C16} y CSP_{M8} eran capaces de conjugarse a un péptido antimicrobiano alternativo (S6L3-33) sin pérdida de la capacidad de eliminar selectivamente *S. mutans*. Este hallazgo además valida la noción de que los dominios de destrucción y dirección del STAMP funcionan independientemente, son capaces de unirse en diferentes combinaciones sin pérdida de actividad. Esto sugiere que la construcción futura de STAMP será un proceso "ajustable" sin limitación, gracias a una miríada de combinación de dominios antimicrobianos, enlazadores y dirigidos que se pueden sintetizar con el fin de seleccionar un STAMP con la mejor actividad específica. Además, la resistencia bacteriana al STAMP (que podría desarrollarse) (Perron y col., 2006) se podría superar fácilmente cambiando componentes alternativos, funcionalmente análogos del STAMP, y se hizo con G2 y S6L3-33 en este estudio. Adicionalmente, los péptidos feromona son ampliamente utilizados por las bacterias patógenas especialmente organismos gram-positivos, y por tanto representan un gran grupo en crecimiento a partir del cual se podrían seleccionar péptidos dirigidos para la construcción de STAMP.

C16G2, M8G2, C 16-33 y M8-33 muestran una actividad fuertemente específica contra las bacterias *S. mutans* diana en cultivos planctónicos y en películas biológicas tanto multi-especie como de una sola especie, sugiriendo que se puede ser capaz de construir un grupo de STAMP funcionales que pueden discriminar entre *S. mutans* y otros estreptococos orales no cariogénicos. Esta actividad selectiva, combinada a la baja citotoxicidad de estos péptidos (Eckert, y col., datos no publicados) indica que son útiles para el desarrollo de la terapia anti-caríes. Actualmente los tratamientos para la infección por *S. mutans* incluyen la abstinencia de alimentación con azúcares, retirada mecánica de la placa dental, y enjuagues orales con un biocida general. Aunque todo esto es eficaz temporalmente en varios grados, la pérdida inevitable de flora normal que se produce con la retirada mecánica o con el tratamiento antibiótico

general permite a *S. mutans* re-establecerse sin dificultad en un nicho en la cavidad oral (Caufield y col., 2000). Por lo tanto un STAMP con una capacidad de destrucción selectiva del agente patógeno (por ejemplo selectiva para *S. mutans*) es una solución ideal que destruye o reduce selectivamente el agente patógeno (por ejemplo, *S. mutans*) en la flora y permite que la flora normal no deje crecer las poblaciones de *S. mutans* afectadas. Tal terapia “antibiótica-probiótica” ayudará a prevenir la progresión de la caries dental y los altos costes en sanidad que se asocian con esta enfermedad (Anderson y Shi, 2006).

Ejemplo 2. Aumento de la actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* por la co-administración de G10KHc y tobramicina.

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* es un agente patógeno oportunista común en seres humanos que se asocia con infecciones agudas que amenazan la vida y colonización crónica de vías aéreas en la fibrosis quística. En la Publicación de la Solicitud de Patente de EE. UU. N° 20040137482, la novispirina G10, un péptido antimicrobiano de amplio espectro se convierte en un péptido antimicrobiano dirigido selectivamente (STAMP), G10KHc. Comparado con la novispirina G10, el STAMP G10KHc tiene un aumento de la capacidad de destrucción contra *Pseudomonas mendocina*. En este experimento, los inventores exploran la actividad antimicrobiana de G10KHc contra *P. aeruginosa* y un aumento sinérgico de la actividad de destrucción cuando se co-administra el STAMP G10KHc con tobramicina.

2.2 El STAMP G10KHc y sus componentes. El STAMP G10KHc tiene la siguiente secuencia y componentes:

G10KHc [péptido dirigido- péptido enlazador- péptido antimicrobiano, el enlazador está subrayado]:

KKHRKHKRKHGGSGGSKNLRRIIRKGIHIIKKYG (SEC ID N° 36)

Péptido antimicrobiano G10 (Novispirina): KNLRRRIIRKGIHIIKKYG (SEC ID N° 35)

Péptido dirigido Cat-1 (también llamado KH): KKHRKHKRKH (SEC ID N° 31)

Péptido enlazador: GGSGGS (SEC ID N° 28).

Se llevó a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida de G10 (KNLRRRIIRKGIHIIKKYG, SEC ID N° 35) y G10KHc (KKHRKHKRKHGGSGGSKNLRRIIRKGIHIIKKYG, SEC ID N° 36) utilizando la metodología Fast-Fmoc ((9-fluorenilmetoxicarbonilo) en un Sintetizador de Péptidos 431A (Applied Biosciences). Los péptidos completados se escindieron a partir de la resina utilizando un 95% de TFA con los aceptores adecuados. Se confirmó la masa del péptido con espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (Voyager System 4291, Applied Biosystems) y los péptidos en crudo se purificaron por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC, ACTA Purifier, Amersham) mientras se controlaba por UV215. La fase móvil durante la HPLC consistía en agua/acetonitrilo (con un 0,1% de ácido trifluoroacético) a una tasa de flujo de 0,5 ml/min (columna Source 15 RPC, Amersham). Los perfiles de HPLC y MALDI para G10KHc purificado se muestran en la Figura 6. Específicamente, después de la purificación, se observó un único pico de G10KHc y un volumen de retención de 10,05 ml (Fig. 6A), que se encontró que tenía la masa esperada para G10KHc (predicha 4267,08, observada 4267,44) como se muestra en la Figura 6B.

2.3 Actividades antimicrobianas. Se evaluaron las actividades antimicrobianas de G10KHc, G10, y tobramicina contra aislados clínicos de *P. aeruginosa* por el ensayo de la concentración inhibidora mínima (CIM) como se había descrito anteriormente (Eckert y col., 2006) y se muestra en la Tabla 5. Las CIM se presentan en μM , aunque por familiaridad, $1 \mu\text{M}$ de tobramicina = $0,468 \mu\text{g/ml}$. La *P. aeruginosa* se cultivó hasta la fase log y se ajustó a $\sim 1 \times 10^5$ ufc/ml en caldo Mueller-Hinton (MH) y se añadieron a placas de 96 pocillos. Se añadieron entonces diluciones seriadas de dos veces de péptido a las bacterias y se incubaron las placas durante 18-24 horas a 37°C . Se determinó la CIM como la concentración de péptido presente en el último pocillo transparente (sin crecimiento). Como se esperaba, el G10KHc era significativamente más activo contra aislados clínicos de *P. aeruginosa* al compararse con G10 solo (ensayo de Student, $p = 0,001$): Las CIM para G10KHc variaban de $0,5$ a $29 \mu\text{M}$ (media $6,22 \mu\text{M}$), comparándose con las CIM para G10, que variaban de 10 a $60 \mu\text{M}$ (media $23,4 \mu\text{M}$). Como el dominio KH (o el péptido Cat-1) no tiene por sí mismo actividad antimicrobiana, el aumento de la actividad anti-*P. aeruginosa* de G10KHc probablemente se debe a la capacidad de unión dirigida de KH a *Pseudomonas* spp., como se había informado anteriormente (Eckert y col., 2006). Al contrario que para la tobramicina, el G10KHc era también eficaz contra *P. aeruginosa* resistente a aminoglucósidos y múltiples antibióticos que se aislaba de pacientes con FQ (AGR10, MR15). Adicionalmente, como *P. aeruginosa* mucoide se asocia a menudo con susceptibilidad a los agentes antimicrobianos, los inventores se han esforzado para encontrar que el G10KHc fuera activo contra una de tales cepas, PDO300. En total, G10KHc no era tan activo como la tobramicina contra los aislados sensibles examinados (típicamente 1-2 etapas de dilución menos eficaz).

Tabla 5 – CIM de tobramicina, G10 y G10KHc contra aislados clínicos y de laboratorio de *P. aeruginosa*. Se muestra la CIM media de 3 experimentos independientes. El dominio de dirección KH solo no tiene ninguna actividad antimicrobiana (datos no mostrados). Por referencia 1 μM = 0,468 $\mu\text{g/ml}$

Cepa	CIM (μM)		
	G10KHc	novispirina G10	tobramicina
PAO1	6	23	2,5
PA14	5,5	10	0,7
PAK	5,5	13	2,12
PDO300*	6	45	n.e.
ATCC 15692	6	16	3,05
ATCC 27583	6	16	1,75
ATCC 10145	4,5	14,5	1,75
ATCC 9027	5,5	15	2,12
AGR10	1,1	18	55
MR15	0,5	14	55
S40	29	60	0,4
S60	3,13	30	0,4
S100	1,1	30	3,5

*fenotipo mucoide, n.e.: no ensayado

- 5 Los experimentos de destrucción en el tiempo (cinéticas de destrucción) se llevaron a cabo como se habían descrito anteriormente (Eckert y col., 2006). En resumen, se cultivó *P. aeruginosa* hasta la fase log y se diluyó hasta $\sim 1 \times 10^5$ ufc/ml (cultivos planctónicos de densidad moderada) en medio LB con un 30% de suero de ratón (MP Biomedicals) antes de la adición de tobramicina, G10, o G10KHc 10 μM a las suspensiones celulares. En cada punto de tiempo se retiraron 10 μl del cultivo y se recuperaron las células de *P. aeruginosa* por dilución con 500 μl de LB y se
- 10 mantuvieron en hielo hasta colocarlas en placas. Se cuantificaron las ufc/ml supervivientes tras la colocación en placas con LB agar y la incubación durante una noche a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Como se muestra en la Fig. 7, el ensayo de cinéticas de destrucción reveló que G10KHc era obviamente mejor en destrucción frente a G10 contra *P. aeruginosa*: el tratamiento de los cultivos con G10KHc 10 μM se asoció con un descenso de *P. aeruginosa* viables (por debajo de 100 ufc/ml a los 30 min), mientras que el G10 era ineficaz en todo el curso de tiempo examinado. La tasa de la actividad antimicrobiana de G10KHc era similar a una dosificación equimolar de tobramicina (4,68 $\mu\text{g/ml}$). Estos resultados sugieren que el G10KHc y la tobramicina tienen una potencia similar contra los aislados clínicos así como cepas de laboratorio, y que G10KHc puede inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* resistente a fármacos. Además, los datos indican que parece que G10KHc necesita el dominio diana KH de *Pseudomonas* spp. para la destrucción eficaz de las células de *P. aeruginosa*: el G10 solo mostraba una actividad pobre a menos que se incubara 18-24 h (Tabla 5).
- 15 2.4 Efecto de destrucción sinérgico de G10KHc y tobramicina. Para evaluar el aumento de la actividad entre G10KHc y tobramicina contra cultivos planctónicos de alta densidad, se cultivó ATCC 15692 una noche y se ajustó a $\sim 1 \times 10^8$ ufc/ml en ddH₂O (pH 7,4) y se expusieron a 5 μM de tobramicina, 5 μM de G10KHc o una combinación de ambos agentes (una combinación de 5 μM de tobramicina (2,34 $\mu\text{g/ml}$) y 5 μM de G10KHc o G10). Se recuperaron
- 20 10 μl de los cultivos tratados por dilución después de 24 h y se colocaron las ufc/ml supervivientes en placas con LB y se contaron tras el crecimiento sobre LB agar. Como se muestra en la Figura 8, se observó un claro aumento de la actividad de destrucción cuando se co-administraban la tobramicina y el STAMP (pero no con G10). Las ufc/ml supervivientes de los cultivos co-tratados ($\sim 1 \times 10^3$ ufc/ml) eran 5 log₁₀ menores que el nivel recuperado de los cultivos sin tratar ($\sim 1 \times 10^8$ ufc/ml) o los expuestos o bien a tobramicina o bien a G10KHc ($\sim 1 \times 10^7$ ufc/ml y $\sim 1 \times 10^8$ ufc/ml, respectivamente). Estos resultados sugieren que cuando se aplican juntos, estos agentes son marcadamente más eficaces contra *P. aeruginosa* que cualquiera de los componentes solos y pueden eliminar prácticamente todas en un cultivo de alta densidad celular en 24 horas, incluso cuando el G10KHc se administraba a una concentración por debajo de la CIM para la cepa ensayada.
- 25 2.5 Efecto de destrucción sinérgico de G10KHc y tobramicina sobre la película biológica. También se ha observado un efecto de destrucción sinérgico entre la tobramicina y G10KHc contra *P. aeruginosa* asociada a una película biológica. En este experimento, se utilizó un sistema reactor de película biológica de disco rotatorio para generar datos cuantitativos de la susceptibilidad de la película biológica a la tobramicina, G10 y G10KHc. El sistema consistía en un vaso reactor que contenía 250 ml de caldo de medio tripticasa de soja diluida (TSB) (1:100). Los reactores se inocularon con cultivos de una noche (1%, v/v). Tras el cultivo estático de una noche en TSB, se inició
- 30 un flujo de medio reciente (tasa de dilución, 0,7 h⁻¹). Tras 24 h en un flujo de medio, los chips de policarbonato con las bacterias fijadas a la película biológica se retiraron aseptícamente de los discos giratorios y se lavaron tres veces en ddH₂O (pH 7,4) y se incubaron en 1 ml de ddH₂O. Se añadieron como se ha indicado G10 (100 $\mu\text{g/ml}$), G10KHc (100 $\mu\text{g/ml}$), tobramicina (100 $\mu\text{g/ml}$), o una combinación de los dos. Entonces se incubaron los chips durante 4 o 24 h en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Falcon n° 353047; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Para
- 35 40

estimar el número de *P. aeruginosa* remanente, se colocaron los discos en 1 ml de PBS y se dispersaron las células utilizando un homogeneizador tisular (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) y se determinó el número total de ufc por chip por dilución seriada y colocación en placas en LB agar.

5 Como se muestra en la Figura 9, 100 µg/ml de G10KHc o 100 µg/ml de tobramicina solos tenían efectos de destrucción muy limitados contra las películas biológicas de *P. aeruginosa* después de 4 h e incluso de 24 h. Sin embargo, la combinación de 100 µg/ml de G10KHc y 100 µg/ml de tobramicina reducían drásticamente el nivel de ufc/ml supervivientes tras 4 h, una mejoría en la capacidad de destrucción de 4 log₁₀ al compararse con cualquier agente solo. Más sorprendentemente, no se recuperó ninguna ufc/ml cuando los agentes combinados se co-incubaban con *P. aeruginosa* durante 24 h (un descenso de casi 5 log₁₀ sobre aplicaciones individuales). Estos datos
10 indican un fuerte aumento de la actividad de destrucción cuando se utilizaba G10KHc y tobramicina contra las películas biológicas de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, estos resultados estaban de acuerdo con la Figura 8, sugiriendo que G10KHc y tobramicina pueden ser sinérgicos contra *P. aeruginosa* en formas de crecimiento planctónico y en película biológica, aunque son necesarios más experimentos para establecer totalmente la actividad sinérgica.

15 2.6 Permeabilidad de membrana mediada por G10KHc. Los resultados de las Figuras 8 y 9 sugieren que la tasa de destrucción celular de la tobramicina se podría aumentar por el co-tratamiento con G10KHc. En ausencia del péptido, la fuerte captación bacteriana de la tobramicina es un proceso activo que necesita un gradiente $\Delta\Psi$ (potencial eléctrico de la fuerza protón motriz) que se maximiza en la respiración aeróbica. Este proceso se puede enlentecer o eliminar en entornos anóxicos, (tal como en el interior de las películas biológicas), sugiriendo que la
20 difusión de la tobramicina a través de las membranas de *P. aeruginosa* (o la falta de la misma) es crítica para al menos un mecanismo de tolerancia a los aminoglucósidos en estas bacterias (14, 33, 40). Por lo tanto, debido al dominio AMP de alteración de membrana en G10KHc y su actividad anti membrana externa previamente descrita (11), se contempló que G10KHc permeabilizaba las membranas externa e interna de *P. aeruginosa*, haciendo posible un aumento de captación de la tobramicina y dando lugar a la sinergia observada.

25 Con el fin de confirmar que la alteración de la membrana por G10KHc podría mediar en la acumulación celular de una molécula pequeña, los cultivos de *P. aeruginosa* de una noche se diluyeron 1:50 en LB y se cultivaron hasta la fase log (3-4 h, ~ 1x10⁵ ufc/ml) antes del falso tratamiento o el tratamiento con 2 µM de G10KHc. Después de 5 min, las células con la membrana afectada se tiñeron con yoduro de propidio (PI) (LIVE/DEAD BacLight Viable Stain, Invitrogen) en presencia o ausencia de concentraciones sub-letales de G10KHc (2 µM) de acuerdo con el protocolo
30 del fabricante. El PI es un colorante de molécula pequeña que se une al ADN de doble cadena y tiene una fluorescencia roja en excitación y se utilizó como sustituto de tobramicina debido a que la internalización de un aminoglucósido no es fácilmente ensayable. El colorante no puede cruzar una membrana citoplasmática intacta y normalmente se utiliza para análisis de viabilidad celular. La intercalación del colorante en el ADN (tinte rojo), se detectaba por microscopía de fluorescencia (Nikon E400) con una magnificación de 40 x aumentos. Se recolectaron
35 las imágenes del campo brillante y la fluorescencia roja utilizando los ajustes por defecto de fábrica (SPOT, Diagnostics). Para determinar la actividad bactericida tras el tratamiento con el péptido y la tinción con PI, las muestras que se habían preparado en paralelo para los cultivos visualizados se pusieron en placas sobre LB agar tras diluciones seriadas 1:5. Las imágenes de las ufc/ml supervivientes se tomaron con GelDoc (BioRad) utilizando el software QuantityOne.

40 Se esperaba que la alteración de la membrana inducida por G10KHc diera lugar a un aumento de la tinción del ácido nucleico en comparación con PI solo. Como se muestra en la Figura 10, las bacterias tratadas con PI solo permanecían sin teñir. En comparación, la tinción con PI intracelular era claramente visible en los cultivos expuestos a PI y G10KHc. Adicionalmente, la cantidad de fluorescencia roja observada era proporcional a la cantidad y longitud del tratamiento con G10KHc (datos no mostrados). Para asegurar que los inventores no teñían simplemente
45 células de *P. aeruginosa* destruidas por G10KHc, se evaluaron las ufc/ml viables en los cultivos visualizados. A partir de las diluciones en serie mostradas en la parte inferior de las imágenes de la Figura 10, estaba claro que el número de *P. aeruginosa* viables recuperadas era similar entre los cultivos tratados con PI solos o con PI/G10KHc. En total, estos datos sugieren que una dosificación sub-letal de G10KHc puede inducir una alteración en la membrana y promueve la captación de moléculas pequeñas, tales como la tobramicina o PI en las células de *P. aeruginosa* metabólicamente activas.

50 2.7 Conclusión. En general, en este estudio, los inventores exploraron la actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*. Se descubrió que el G10KHc era altamente activo (al igual que la tobramicina) contra aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Lo más interesante es que los inventores observaron un aumento como si fuera sinérgico en la actividad de destrucción cuando los cultivos planctónicos y de película biológica de *P. aeruginosa* se co-trataban con
55 G10KHc y tobramicina. Los datos indican que los mecanismos del aumento de la actividad puede implicar el aumento de la captación de tobramicina debido a una alteración de la membrana celular mediada por G10KHc. Estos resultados sugieren que G10KHc puede ser útil contra *P. aeruginosa* durante los estados de infección aguda y crónica, especialmente cuando se co-administra con tobramicina.

60

La *P. aeruginosa* es un agente patógeno oportunista persistente y recurrente, responsable de infecciones recurrentes que amenazan la vida durante la FQ. El aislamiento frecuente de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos sugiere que es crítico que se desarrollen nuevas terapias para inhibir y tratar la colonización de las superficies mucosas de las vías aéreas por *P. aeruginosa*, antes de que las opciones de tratamiento prescritas actualmente ya no sean eficaces.

Este experimento muestra que G10KHc mejora marcadamente en comparación con su péptido parental de amplio espectro, el G10, y es similar a la tobramicina. Adicionalmente, el G10KHc es eficaz contra los cultivos de *P. aeruginosa* planctónicos y en películas biológicas *in vitro* (Fig. 3-4). Cuando se compara con la tobramicina, el G10KHc es casi 10 veces más eficaz por μM en reducir la viabilidad de la película biológica ($100 \mu\text{g/ml}$ tobramicina = $213 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{g/ml}$ de G10KHc = $23,5 \mu\text{M}$). Contra las células planctónicas de alta densidad, sin embargo $5 \mu\text{M}$ ($2,34 \mu\text{g/ml}$) de tobramicina sola fue marcadamente más bactericida que $5 \mu\text{M}$ de G10 o G10KHc tras 24 horas (una mejoría de $1-2 \log_{10}$). La diferencia en la actividad de la tobramicina se puede asociar al ambiente anaeróbico encontrado en el interior de las películas biológicas de *P. aeruginosa*, que inhibe la fuerte captación celular de aminoglucósidos.

El nivel más alto de actividad anti-*P. aeruginosa* observado en cultivos planctónicos o de películas biológicas se producía cuando se aplicaron ambos agentes juntos. La co-administración de tobramicina y G10KHc daba como resultado un aumento marcado de la actividad de destrucción: se eliminaban casi 10.000 veces más de bacterias con el co-tratamiento que con cualquiera de los agentes solos en cultivos planctónicos o de películas biológicas. Aunque la actividad aditiva y sinérgica anti *P. aeruginosa* se había descrito entre un péptido antimicrobiano y la tobramicina (Saiman y col., 2001), así como con la tobramicina más otros muchos antibióticos convencionales de molécula pequeña (Bonacorsi y col., 1999), el presente documento representa el primer ejemplo documentado de que la *P. aeruginosa* asociada a una película biológica se eliminaba sinérgica o aditivamente por una combinación aminoglucósido/péptido.

Se ha aprobado la tobramicina en aerosol para el control de infecciones de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ, y no inesperadamente, se han aislado cepas resistentes de *P. aeruginosa* y otros organismos a la tobramicina y aminoglucósidos en el esputo de pacientes con FQ. Este hecho, combinado con la tasa relativamente alta de disnea desagradable, broncoespasmo, y aumento de la tos tras el tratamiento, sugiere que la tobramicina se podía utilizar mejor con una dosificación menor combinándola con otro agente. Se concluye que G10KHc puede ser un candidato para la co-administración debido a su selectividad para *Pseudomonas* modificadas, y los potentes efectos antimicrobianos contra las películas biológicas de *P. aeruginosa* y las cepas resistentes a aminoglucósidos y a múltiples fármacos.

Ejemplo 3. Aumento de la estabilidad y actividad del STAMP G10KHc utilizando enantiómero D-aminoácido para sintetizar el STAMP y/o antagonistas químicos (por ejemplo, rhDNasa).

3.1 Preparación del material y métodos. Se sintetizaron el G10KHc (KKHRKHKHRKH-GGSGGS-KNLRRRIIRKGIHII KKYG, SEC ID N° 36, [dominio de dirección-enlazador- dominio antimicrobiano], y el enantiómero D G10KHc-D por metodología Fast-Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) en un Sintetizador de Péptidos 431A (Applied Biosciences), como se había descrito anteriormente (Eckert y col., 2006), utilizando D-aminoácidos para G10KHc-D en Anaspec (San Jose, CA).

Ocho muestras de esputo expectoradas de diferentes pacientes que se obtuvieron de pacientes con FQ en el Hospital Infantil Los Angeles (Los Angeles, CA, EE. UU.) durante la práctica clínica de rutina y se almacenaron a -80°C en 1 hora tras su recolección. La colección de muestras de esputo para el presente estudio se aprobó por la oficina de revisión institucional del Hospital Infantil Los Angeles (CCI n° 05-00040). Los identificadores personales, incluyendo edad, género y pronóstico eran desconocidos para el laboratorio de los inventores.

3.2 Actividad y estabilidad de G10KHc y G10KHc-D en el esputo. La determinación de los efectos o la actividad del péptido antimicrobiano en el esputo se investigó de manera similar a informes previos (Sajjan y col., 2001). Para ensayar la actividad de G10KHc y G10KHc-D contra *P. aeruginosa* exógena en el esputo, las muestras de esputo recolectadas se diluyeron 1:10 en 10 mM de PBS (PBS) y se agruparon (designándolo como esputo agrupado). En $100 \mu\text{l}$ de esputo agrupado, se añadió ATCC 15692 a una concentración final de $\sim 5 \times 10^6$ ufc/ml antes de la adición de $25 \mu\text{M}$ de péptido.

Examinando el efecto en las muestras de los inhibidores de la proteasa sobre la actividad del péptido, las muestras de esputo agrupado se pre-trataron durante 20 minutos con un inhibidor de proteasa 1 mM , bien fluoruro de felilmetilsulfonilo (PMSF), beta-mercaptoetanol (BME), o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), (todos adquiridos en Sigma-Aldrich), y luego se añadieron $25 \mu\text{M}$ de G10KHc y ATCC 15692 ($\sim 5 \times 10^6$ ufc/ml).

Se recuperaron las bacterias supervivientes al tratamiento con péptidos por dilución 1:50 en medio de crecimiento durante 4 h y se dejaron en hielo antes de la dilución apropiada y la colocación en placas en LB agar suplementado con ampicilina ($25 \mu\text{g/ml}$). Tras incubación durante una noche a 37°C , se contaron las colonias y se cuantificaron las ufc/ml supervivientes. Se consideró un límite contable de 100 ufc/ml para todos los procedimientos de placa. Se observaron organismos endógenos que estaban presentes en el esputo, pero eran una minoría de la población en comparación con las células añadidas exógenamente (menos del 1%, datos no mostrados). En consecuencia, no se diferenciaron las ufc/ml endógenas y exógenas en estos cultivos.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de G10KHc en las muestras de esputo de los pacientes con FQ por el ensayo de cinéticas de destrucción. Como se muestra en la Figura 11A, a las 4 h de la adición, el péptido G10KHc no era activo contra la *P. aeruginosa* añadida exógenamente cuando se mezclaron con muestras de esputo agrupado. Este hallazgo contrastaba con la actividad de G10KHc en medio de cultivo, donde se encontró que el STAMP G10KHc reducía las ufc/ml recuperables en más del 90% después de 30 min de exposición, y eliminaba todas las ufc/ml de *P. aeruginosa* a las 2 h de tratamiento (véase el Experimento 2).

Considerando la probabilidad de que la pérdida de actividad se debía a la degradación, se examinó la estabilidad del STAMP G10KHc a lo largo del tiempo. La estabilidad de los péptidos en el esputo se controló por HPLC. En resumen, las muestras de esputo agrupado se diluyeron 1:10 en PBS y se centrifugaron repetidamente para eliminar los materiales insolubles. Entonces, se añadió G10KHc o G10KHc-D (100 μ M) a 100 μ l de esputo agrupado diluido (con o sin pretratamiento de PMSF 1 mM durante 1 h) y se mezclaron a temperatura ambiente. A los puntos de tiempo indicados se añadieron 20 μ l de HCl al 10% para parar la degradación del péptido y la muestra se filtró dos veces (nylon 0,2 μ m, Nunc) antes de la inyección en la columna (Source 15 RPC, Amersham). Se utilizó Agua/acetonitrilo con ácido trifluoroacético 0,1% como fase móvil y se eluyeron las muestras con un gradiente lineal de aumento de composición de acetonitrilo (del 10% a ~ 35%) con una tasa de flujo de 0,25 ml/min, 11,5 ml de fase móvil por proceso. Se controló el G10KHc intacto y los productos de degradación por UV (215 nm) y se recolectaron las fracciones como se había indicado. Las fracciones recolectadas de los sucesivos procesos se agruparon y se liofilizaron durante una noche antes de la evaluación de la actividad antimicrobiana por el ensayo de la CIM descrito anteriormente. Se obtuvieron los perfiles de la HPLC utilizando el protocolo del fabricante (Unicorn, Amersham), y se colorearon diferencialmente y se procesaron utilizando Photoshop 7.0 (Adobe) para la construcción de la Figura 11B. Como se muestra en la Figura 11B, el pico de señal (volumen de retención 10,29) para G10KHc estaba casi totalmente degradado después de los 30 min de exposición al esputo. Varias de las fracciones resultantes se recolectaron y se identificaron los posibles productos de degradación por espectrometría de masas, ninguno de los cuales mostraba una CIM por debajo de 100 μ M contra varios aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Tabla 6).

Tabla 6 – CIM (μ M) de G10KHc, G10KHc-D y productos digeridos en el esputo

	CIM (μ M) ^a		
Péptidos Sintetizados:	ATCC 15692	ATCC 9027	ATCC 27853
G10KHc ^b	6	5,5	6
G10KHc-D	15	15	10
Fracciones de HPLC recolectadas ^c :			
10,29 (G10KHc)	6	6	6
8,50	>100	>100	>100
7,49	>100	>100	>100
4,04	>100	>100	>100

^a Intervalo de CIM de 3 experimentos independientes

^b datos comunicados previamente incluidos para comparación (6)

^c Fracciones mostradas en la Figura 11B

Se sabe en la técnica que existen niveles aumentados de serina proteasa presentes en el esputo en la FQ. Por lo tanto, se contempló la hipótesis que hicieron los inventores de que esta clase de proteasas era la responsable de la rápida degradación de G10KHc que se observaba, y que los inhibidores de proteasas podrían estabilizar al G10KHc en el esputo y se restauraría la función antimicrobiana. Para examinar esta posibilidad, se añadieron la *P. aeruginosa* y G10KHc a las muestras de esputo agrupado pretratados con una variedad de inhibidores de las proteasas, y se cuantificaron las bacterias supervivientes. Las muestras tratadas con BME (un inhibidor de la cisteína proteasa) o EDTA (inhibidor de las proteasas) eran ineficaces para recuperar la actividad o estabilidad de G10KHc (datos no mostrados). Como se muestra en la Figura 11 A, sin embargo, la *P. aeruginosa* se destruía eficazmente (una reducción de unos 3 log₁₀ en las ufc/ml supervivientes) por el STAMP G10KHc en las muestras pre-tratadas con el inhibidor general de serina proteasa PMSF. El inhibidor solo tenía solamente un pequeño efecto en la viabilidad de *P. aeruginosa*. En consecuencia la señal de G10KHc del esputo tratado con PMSF permanecía alta hasta las 4 h cuando se examinó por HPLC (Figura 11B). El total de estos datos indican que G10KHc es activo contra *P. aeruginosa* en el esputo cuando se protege de la degradación por la serina proteasa.

3.3 STAMP G10KHc D-enantiómero y su actividad. Debido a las necesidades quirales de la mayoría de las serina proteasas (Milton y col., 1992), se sintetizó un enantiómero de D-aminoácido de G10KHc total, el G10KHc-D, como un medio alternativo para evitar la actividad proteasa sin el uso de inhibidores. El G10KHc-D se sintetizó por métodos de fase sólida de referencia como se mencionó y se confirmó por espectrometría de masas.

Como se muestra en la Figura 11A, el G10KHc-D reducía el nivel de *P. aeruginosa* recuperada 3-4 log₁₀ (comparado con el de las muestras sin tratar) después de 4 h de exposición al péptido, indicando que G10KHc-D tiene un nivel de actividad en el esputo similar al del L-G10KHc cuando se estabiliza. Sin embargo el enantiómero era menos efectivo contra *P. aeruginosa* en medio de cultivo tras 24 h (como se evaluó por la CIM, Tabla 6), sugiriendo que

G10KHc-D y L-G10KHc no tienen actividades completamente idénticas.

3.4 Efecto de la rhDNasa sobre la actividad del STAMP en el esputo. La DNasa recombinante humana, que se utiliza comúnmente durante el tratamiento de FQ para reducir la viscosidad del esputo y despejar las vías aéreas (Fuchs y col., 1994) se añadió a unas muestras de esputo agrupado concentrado para determinar si podía mejorarse la actividad de G10KHc/PMSF y G10KHc-D con el co-tratamiento en estas condiciones. Para determinar el efecto de la rhDNasa (Genentech, San Francisco, CA) sobre la capacidad de destrucción del STAMP, se diluyeron muestras de esputo individuales 1:2 en 100 µg/ml de rhDNasa, se removieron brevemente, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces se agruparon las muestras tratadas, y a continuación se añadió 1 mM de PMSF, si era apropiado, y se incubaron durante 1 h. Entonces se añadieron 35 µM de G10KHc o G10KHc-D con $\sim 5 \times 10^6$ ufc/ml de ATCC 15692 y se incubaron 4 h. Las supervivientes se recuperaron y cuantificaron colocándolas en placas como se describió anteriormente.

Como se muestra en la Figura 12, los inventores observaron un claro aumento de la actividad antimicrobiana cuando se utilizaba rhDNasa junto con G10KHc/PMSF o G10KHc-D (menos del 5% de ufc/ml permanecían sin tratar), cuando se comparaban con las muestras no tratadas con rhDNasa ($\sim 30\%$ de ufc/ml permanecían sin tratar). La P. aeruginosa no se afectaba por el tratamiento con rhDNasa sola. Estos resultados sugieren que los efectos de destrucción del G10KHc/PMSF o G10KHc-D en el esputo aumentaban más con el co-tratamiento con un agente mucolítico del esputo, que reduce la viscosidad del esputo y aumenta la difusión del péptido.

3.5 Conclusiones. En general, la actividad de G10KHc se puede extender en el esputo expectorado cuando se protege de la escisión proteolítica, sea por la construcción de péptidos versión-D y/o por la co-administración de un inhibidor de proteasas y/o en combinación con rhDNasa. En particular, se encontró que la fuerte actividad del STAMP G10KHc se podría mantener en el esputo expectorado si se inhibiera la digestión dependiente de la serina proteasa que se asocia con este fluido, sea por antagonistas químicos o por la construcción de un enantiómero D-aminoácido del G10KHc. Además se ha revelado que la actividad del STAMP en el esputo puede aumentarse más cuando las muestras se trataban con una combinación de péptido y rhDNasa. Los resultados ilustran la importancia de la exploración de una terapia de combinación para el tratamiento de FQ, especialmente si se utilizan agentes basados en péptidos sensibles a la proteasas, tal como el G10KHc, como alternativos, o en conjunción con antibióticos de molécula pequeña convencionales.

Experimento 4. Identificación del péptido 1903 y BD2.21 y los STAMP de los mismos.

El péptido dirigido 1903 se obtuvo por selección de la secuencia de S. mutans UA140. Se examinaron las fases de lectura abiertas (ORF) predichas del genoma disponible públicamente y las ORF que codificaban proteínas de menos de 50 aminoácidos se anotaron y se re-examinaron después de explorar el genoma entero. Se seleccionaron varios péptidos que se había predicho que eran codificados por estas ORF, se sintetizaron con marcadores fluorescentes, se ensayó su unión a películas biológicas de S. mutans. El péptido 1903 mostraba actividad de unión a S. mutans y entonces se utilizó para sintetizar STAMP basados en el 1903.

El BD2.21 se diseñó racionalmente como parte de la biblioteca de péptidos antimicrobianos "beta-eliminación 2". Un resto con una conformación común alfa helicoidal, HHCCHHCHH(n), se sustituyó utilizando principalmente restos positivos (C) e hidrófobos (H) en las posiciones indicadas. Existe cierta variabilidad en el patrón de restos utilizados por los inventores, y se incorporaron algunos restos no hidrófobos o sin carga. La sustitución se limitaba a 3-5 aminoácidos catiónicos por péptido, y 4-7 restos hidrófobos (9 a 12 en total). Se ensayaron los efectos antimicrobianos de los péptidos modificados y BD2.21 mostraba una CIM de 5,5 µM contra S. mutans planctónico. Se utilizó entonces el BD2.21 para sintetizar un STAMP basado en BD2.21 tal como 1903-BD2.21 que tiene una secuencia de aminoácidos NIFEYFLE-GGG-KLFKFLRKHLL como se muestra en la SEC ID N° 13 y C16-BD2.21 que tiene una secuencia de aminoácidos TFFRLFNRSFTQALGK-GGGKLFKFLRKHLL como se muestra en la SEC ID N° 14.

Destrucción de películas biológicas maduras de especie única de Streptococcus mutans. Se sembraron las películas biológicas de S. mutans a 10^5 células/pocillo y se cultivaron durante una noche con un 1% sacarosa (medio TH) en placas de 48 pocillos (volumen final de 400 µl). Tras la incubación, se retiró el sobrenadante de las películas biológicas y se reemplazó con 200 µl de PBS con 50 µM de STAMP. El PBS solo se utilizó como control negativo (100% de supervivencia) con etanol como control de destrucción completa de las películas biológicas (0% de supervivencia). Las películas biológicas se trataron con péptido durante 20 min, luego se lavaron 1x con PBS. Para medir la supervivencia en la película biológica, se añadieron 20 µl de CellTiterBlue diluidos en 160 µl de medio TH por pocillo. Después de 3-5 min, se retiraron los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 570 nm. La alta absorbancia a 570 indicaba más reducción de sustrato por las células viables remanentes en la película biológica. Como se muestra en la Figura 13, los resultados indican que C16-BD2.21 y 1903-BD2.21 pueden destruir el 66% y el 85% de S. mutans viables en la película biológica, respectivamente, tras un tiempo de tratamiento de solo 20 min.

Selectividad de STAMP contra películas biológicas multi-especie de estreptococos orales. Para medir la selectividad de STAMP, las películas biológicas mezcladas se sembraron en placas de 48 pocillos. Se mezclaron Streptococcus mitis, S. sobrinus, S. gordonii, y S. sanguinis con la cepa JM11 de S. mutans (resistente a la espectinomicina) con una relación de 1:1:1:1:10, con un total de 10^5 células/pocillo. Las películas biológicas se cultivaron durante una

5 noche en medio TH con un 1% de sacarosa, 1% de dextrosa, y un 1% de manosa, durante 18-24 h. Las películas biológicas maduras se trataron con PBS más STAMP como se ha descrito en el ensayo de películas biológicas de una especie, con los mismos controles. Después del tratamiento, las películas biológicas se lavaron 2 x con PBS y luego se rompieron físicamente con una punta de pipeta estéril en 100 μ l de PBS por pocillo. Las suspensiones celulares se diluyeron entonces seriadamente 10 veces a 10^{-6} . Las suspensiones diluidas se colocaron en placas en medio TH y TH suplementado con espectinomicina, 800 μ g/ml. La cantidad de destrucción total de la película biológica (todos los estreptococos) se determinó por recuento de colonias de las placas con TH solo. Controles: 100% de no tratados corresponde al número de ufc/ml registrado de las películas biológicas sin tratar, el 0% de supervivencia se obtenía de las muestras esterilizadas con etanol. La destrucción de *S. mutans* se determinó cuantificando las colonias de las placas con TH-espectinomicina, y el total combinado de ufc/ml, se utilizó para calcular la relación *S. mutans*: oblación total. Una relación 1:1 indica que no había selectividad.

15 Como se muestra en la Figura 14, el C16-BD2.21 no tenía impacto en el total de población ufc/ml, sugiriendo que el STAMP no afectaba a ningún estreptococo *S. mutans* en un grado significativo (véase la Figura 14(A)). Esto se confirma por la relación observada de *S. mutans* con respecto a los estreptococos totales, que es de 0,075 (Véase la Figura 14 (B)). El 1903-BD2.21 también tenía una relación selectiva (por debajo de 1, véase la Figura 14 (B)), aunque tenía algún impacto sobre otros estreptococos orales (véase la Figura 14 (A)).

20 Tabla 7. Péptidos Antimicrobianos

Andropina (SEC ID N° 54)	VFIDILDKMENAIHKAAQAGIGIAKPIEKMILPK
Apidaecina (SEC ID N° 55)	GMRPVYIPPRPPHPRL
Bacteriocina leucocina A (SEC ID N° 56)	KYYGNGVHCTKSGCSVNWGEAFSAGVHRLANGGNGFW
bactenecina (SEC ID N° 57)	RLCRIVVIRVCR
Buforina II (SEC ID N° 58)	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK
Catelicidina (humana LL-37) (SEC ID N° 59)	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES
Clavanina A (SEC ID N° 60)	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHFV
Cecropina (SEC ID N° 61)	RWKIFKKIEKVGQNIRDGIVKAGPAVAVVGQAATI
Dodecapéptido Cíclico (SEC ID N° 62)	RICRIIFLRVCR
β -defensina I (humana) (SEC ID N° 63)	DFASCHTNGGICLPNRCPGHMIQIGICFRPRVKCCRSW
α -defensina (HNP-1) (SEC ID N° 64)	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC
Gaegurina (SEC ID N° 65)	SLFSLIKAGAKFLGKNLLKQGACYAACKASKQC
Histatina (SEC ID N° 66)	DSHEERHHGRHGHKHYGRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN

Indolicidina (SEC ID N° 67)
ILPWKWPWWPWRR

Magainina II (SEC ID N° 68)
GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS

Melitina B (SEC ID N° 69)
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ

Nisina A (SEC ID N° 70)
ITSISLCTPGCKTGALMGCNMKTATCHCSIHVSK

novispirina G10 (SEC ID N° 35)
KNLRRIIRKGIHIIKKYG

Protegrina (SEC ID N° 34)
RGGRLCYCRRRFCVVCVGR

Ranalexina (SEC ID N° 71)
LGGLIKIVPAMICAVTKKC

Taquiplesina (SEC ID N° 72)
KWCFRVCYRGICYRRCR

Maximina H5 (anfibios) (SEC ID N° 73)
ILGPVLGLVSDTLDDVLGIL

Extracto Tensioactivo 1 (SEC ID N° 74)
DDDDDD

DCD-1 (SEC ID N° 75)
SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAHVHDVKDVLDSV

SSL-25 (SEC ID N° 76)
SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDA

SSL-23 (SEC ID N° 77)
SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGK

Dermaseptina DS5 (SEC ID N° 78)
GLWSKIKTAGKSVAKAAAKAAVKAVTNAV

Moricina (insectos) (SEC ID N° 79)
AKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIASTANDVFNFLKPKKRKA

Bombinina (rana) (SEC ID N° 80)
GIGALSAKGALKGLAKGLAEHFAN

Pleurocidina (platija americana) (SEC ID N° 81)
GWGSFFKKAHVGHVGHVKAALHTYL

SMAP29 (oveja) (SEC ID N° 82)
RGLRRLGRKIAHGKVKYGPVLRHRIAG

PMP-23 (cerdo) (SEC ID N° 83)
RIIDLLWRVRRPQKPKFVTWVVR

VCP-5h (avispa) (SEC ID N° 84)
FLPIIGKLLSGLL-NH₂

Abaecina (abeja melífera) (SEC ID N° 85)
YVPLPNVPQPGRRRPFPTFGQGPFNPKIKWPQGY

Drosocina (mosca de la fruta) (SEC ID N° 86)
GKPRPYSRPTSHRPIRV

Pirrocoricina (chinche rojo) (SEC ID N° 87)
VDKGSYLPRPTPPRPIYNRN

L₁₅K₇ (SEC ID N° 88)
KLLKLLKLLKLLKLLKLLKLLK

KLApép (SEC ID N° 89)
KLALKLALKAWKAALKLA-NH₂

D₂A₂₁ (SEC ID N° 90)
FAKKFAKKFKKFAKKFAKFAFAF

Modelin-1 (SEC ID N° 91)
KLWKKWAKKWLKLWKAW

LARL (SEC ID N° 92)
Ac-LARLLARLLARL-Ac

YLK-P (SEC ID N° 93)
YKLLKLLLPKLGLLFKL-NH₂

KSL2 (SEC ID N° 94)
KKVVFKFKFK-NH₂

CAM 135 (SEC ID N° 95)
GWRLIKILRVFKGL-NH₂

PGAa (SEC ID N° 96)
GILSKLGKALKKAAKHAACA-NH₂

PGYa (SEC ID N° 97)
GLLRRLRDFLKKIGEFKFKIGY-NH₂

Las referencias en las divulgaciones se enumeran a continuación.

- 5 Ajdic, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savic, J. Chang, M. B. Carson, C. Primeaux, R. Tian, S. Kenton, H. Jia, S. Lin, Y. Qian, S. Li, H. Zhu, F. Najjar, H. Lai, J. White, B. A. Roe, y J. J. Ferretti. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 99:14434-9.
- Anderson, M. H., y W. Shi. 2006. A probiotic approach to caries management. *Pediatric Dentistry In Press.*
- 10 Axelsson, P., y J. Lindhe. 1987. Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 14:205-12.
- Blehert, D. S., R. J. Palmer, Jr., J. B. Xavier, J. S. Almeida, y P. E. Kolenbrander. 2003. Autoinducer 2 production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the biofilm phenotype of a luxS mutant are influenced by nutritional conditions. *J. Bacteriol.* 185:4851-60.
- 15 Bonacorsi, S., F. Fitoussi, S. Lhopital, y E. Bingen. 1999. Comparative *in vitro* activities of meropenem, imipenem, temocillin, piperacillin, and ceftazidime in combination with tobramycin, rifampin, or ciprofloxacin against *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:213-217.
- Caufield, P. W., A. P. Dasanayake, Y. Li, Y. Pan, J. Hsu, y J. M. Hardin. 2000. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect. Immun.* 68:4018-23.
- Donlan, R. M., y J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:167-93.

- Eckert, R., F. Qi, D. K. Yarbrough, J. He, M. H. Anderson, W. Shi. 2006. Adding selectivity to antimicrobial peptides: rational design of a multidomain peptide against *Pseudomonas* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1480-1488.
- 5 Fuchs, H. J., D. S. Borowitz, D. H. Christiansen, E. M. Morris, M. L. Nash, B. W. Ramsey, B. J. Rosenstein, A. L. Smith, y M. E. Wohl. 1994. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* 331:637-42.
- Gilmour, M. N., T. S. Whittam, M. Kilian, y R. K. Selander. 1987. Genetic relationships among the oral streptococci. *J. Bacteriol.* 169:5247-57.
- 10 Li, Y. H., P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, y D. G. Cvitkovitch. 2001. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* 183:897-908.
- Merritt, J., J. Kreth, F. Qi, R. Sullivan, y W. Shi. 2005. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *J. Microbiol. Methods* 61:161-0.
- 15 Milton, R. C., S. C. Milton, y S. B. Kent. 1992. Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV- 1 protease show reciprocal chiral substrate specificity [corrected]. *Science* 256:1445-8.
- Perron, G. G., M. Zasloff, and G. Bell. 2006. Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. Biol. Sci.* 273:251-6.
- 20 Qi, F., J. Kreth, C. M. Levesque, O. Kay, R. W. Mair, W. Shi, D. G. Cvitkovitch, y S. D. Goodman. 2005. Peptide pheromone induced cell death of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251:321-6.
- Qiu, X. Q., J. Zhang, H. Wang, G. Y. Wu. 2005. A novel engineered peptide, a narrow-spectrum antibiotic, is effective against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1184-1189.
- Rogers, A. H. 1975. Bacteriocin types of *Streptococcus mutans* in human mouths. *Arch. Oral Biol.* 20:853-858.
- 25 Saiman, L., S. Tabibi, T. D. Starner, P. San Gabriel, P. L. Winokur, H. P. Jia, P. B. McCray, Jr., y B. F. Tack. 2001. Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2838-44.
- Sajjan, U. S., L. T. Tran, N. Sole, C. Rovaldi, A. Akiyama, P. M. Friden, J. F. Forstner, y D. M. Rothstein. 2001. P-113D, an antimicrobial peptide active against *Pseudomonas aeruginosa*, retains activity in the presence of sputum from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3437-44.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un péptido dirigido unido a un péptido antimicrobiano a través de su extremo amino o carboxilo, consistiendo la secuencia de dicho péptido dirigido en la secuencia TFFRLFNRSFTQALGK (SEC ID N° 2), TFFRLFNR (SEC ID N° 5), o NIFEYFLE (SEC ID N° 10).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido antimicrobiano comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en KNLRIRKGIHIIKKY (SEC ID N° 3), FKFWKWFRRF (SEC ID N° 7), y KLFKFLRKHLL (SEC ID N° 11).
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en SEC ID N° 34-35 y SEC ID N° 54-97.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicho péptido dirigido está unido a dicho péptido antimicrobiano por un péptido enlazador.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido enlazador consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en GGG (SEC ID N° 17), AAA (SEC ID N° 18), SAT (SEC ID N° 19), ASA (SEC ID N° 20), SGG (SEC ID N° 21), PYP (SEC ID N° 22), SGS (SEC ID N° 23), GGS (SEC ID N° 24), SPS (SEC ID N° 25), PSGSP (SEC ID N° 26), PSPSP (SEC ID N° 27), y GGSGGS (SEC ID N° 28).
6. La composición de la reivindicación 4, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido dirigido consiste en la secuencia TFFRLFNRSFTQALGK (SEC ID N° 2), y la secuencia de aminoácidos de dicho péptido antimicrobiano consiste en la secuencia KNLRIRKGIHIIKKY (SEC ID N° 3).
7. La composición de la reivindicación 6, donde dicho péptido dirigido está unido a dicho péptido antimicrobiano por un enlazador que tiene la secuencia de aminoácidos GGG (SEC ID N° 17).
8. La composición de la reivindicación 1, donde la secuencia de dicho péptido dirigido unido a dicho péptido antimicrobiano es TFFRLFNRSFTQALGK GGGG KNLRIRKGIHIIKKY (SEC ID N° 4) y el extremo carboxilo del péptido antimicrobiano está amidado.
9. Un péptido antimicrobiano dirigido selectivamente (STAMP) que comprende:
- a) un péptido dirigido, donde el péptido dirigido tiene una secuencia de aminoácidos seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 2, 5 y 10; y
 - b) un péptido antimicrobiano, en donde el péptido antimicrobiano está unido al péptido dirigido por medio de un péptido.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el STAMP de la reivindicación 9 para su uso en un método para destruir o inhibir selectivamente un organismo microbiano diana en un sujeto o una película biológica *in vivo*.
11. La composición del STAMP para el uso de la reivindicación 10, donde el método es para tratar una enfermedad o infección en una superficie mucosa o una superficie que contiene la película biológica.
12. El uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o del STAMP de la reivindicación 9 en la fabricación de un medicamento para su uso en un método para destruir o inhibir selectivamente un organismo microbiano diana en un sujeto o una película biológica *in vivo*.
13. El uso de la reivindicación 12, en donde el medicamento es para tratar una enfermedad o infección en una superficie mucosa o una superficie que contiene la película biológica.
14. El uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o el STAMP de la reivindicación 9 en un método para destruir o inhibir selectivamente un organismo microbiano diana en una película biológica *in vitro*.

Figura 1

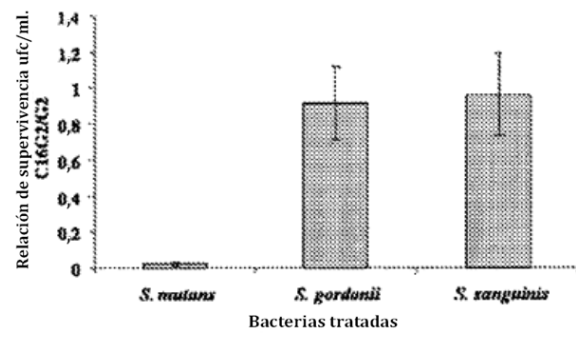


Figura 2

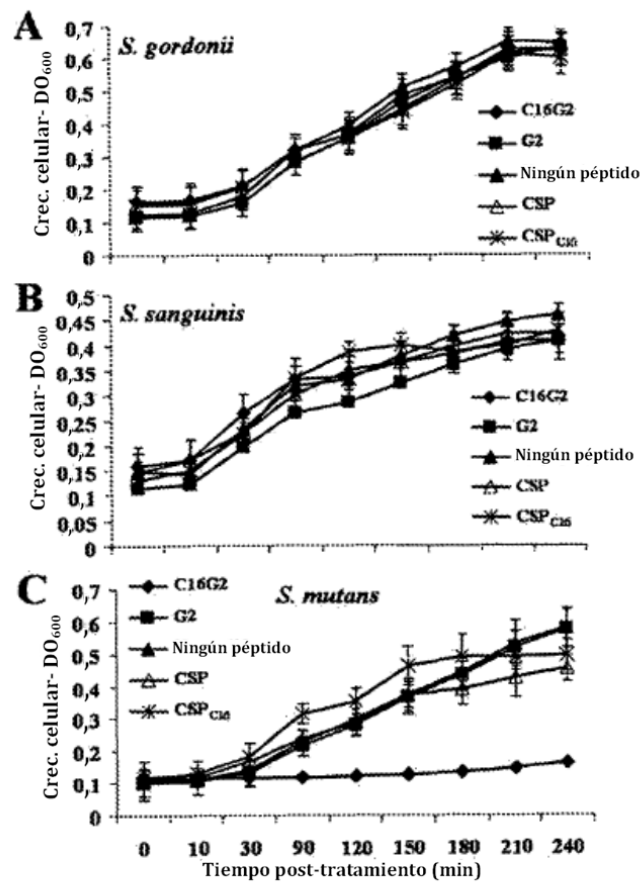


Figura 3

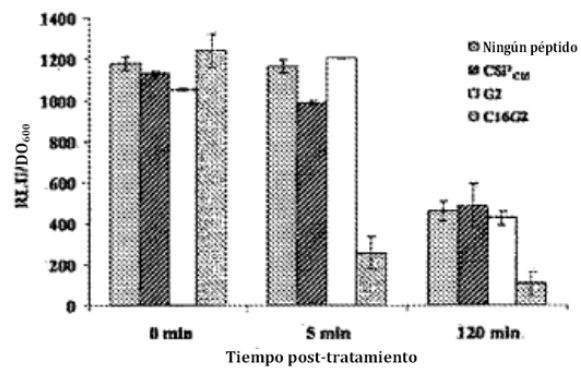


Figura 4

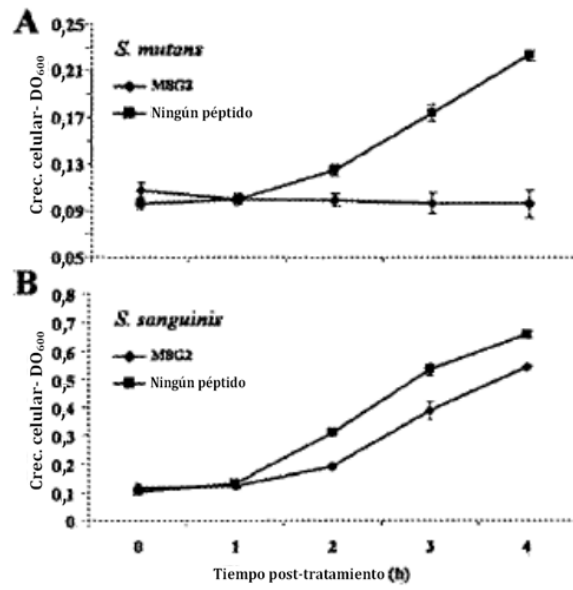


Figura 5

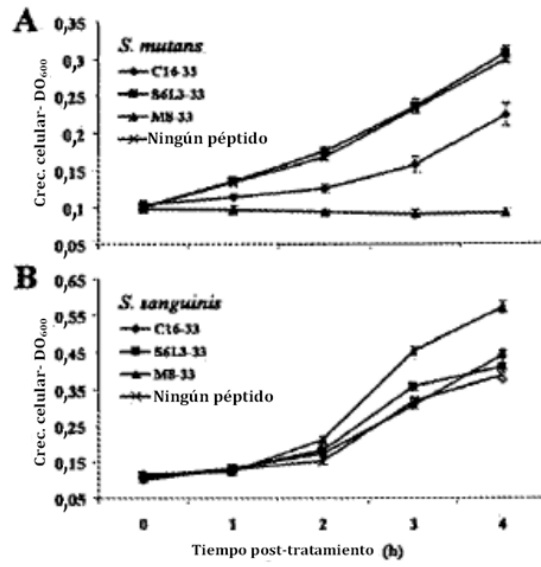


Figura 6

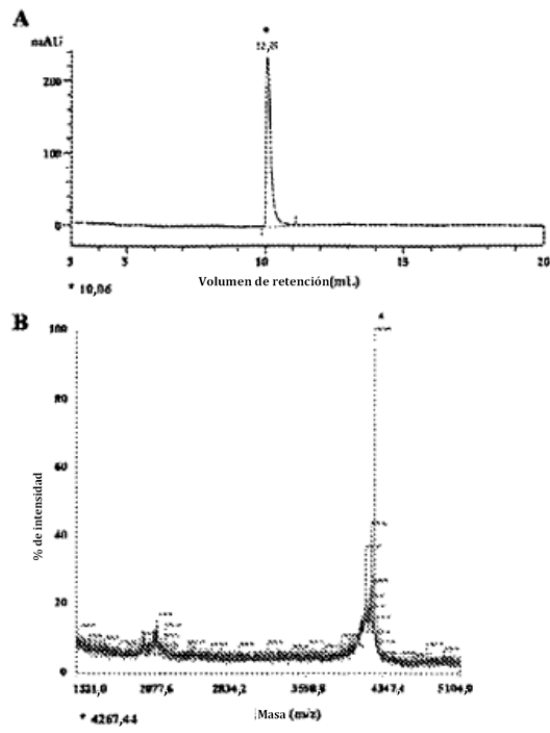


Figura 7

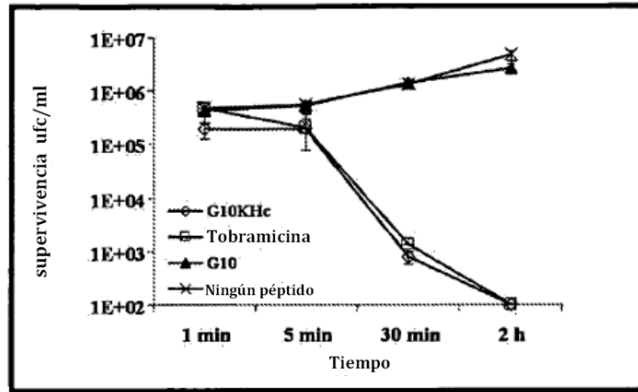


Figura 8

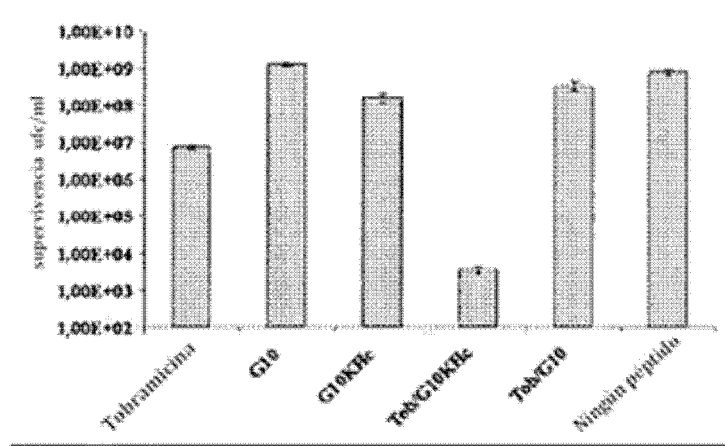


Figura 9

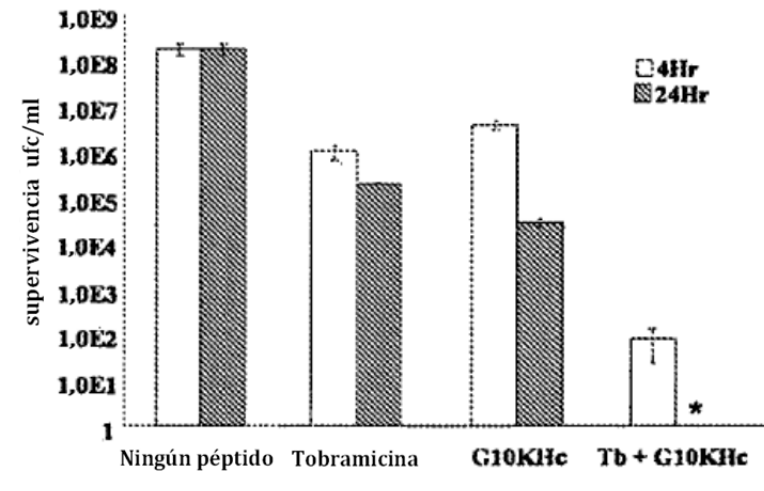


Figura 10

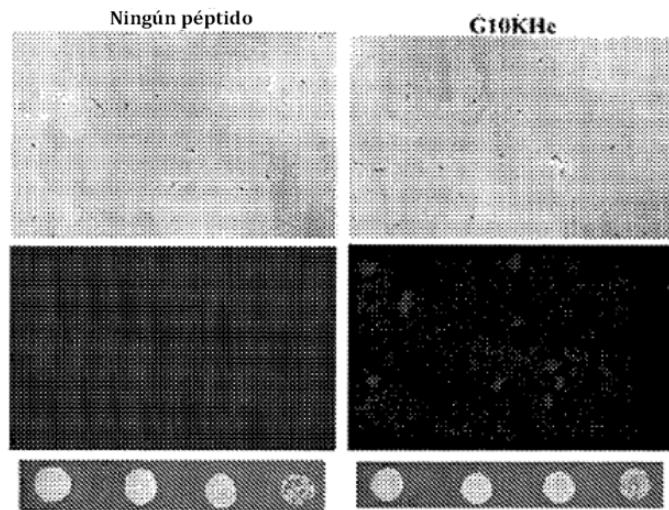


Figura 11

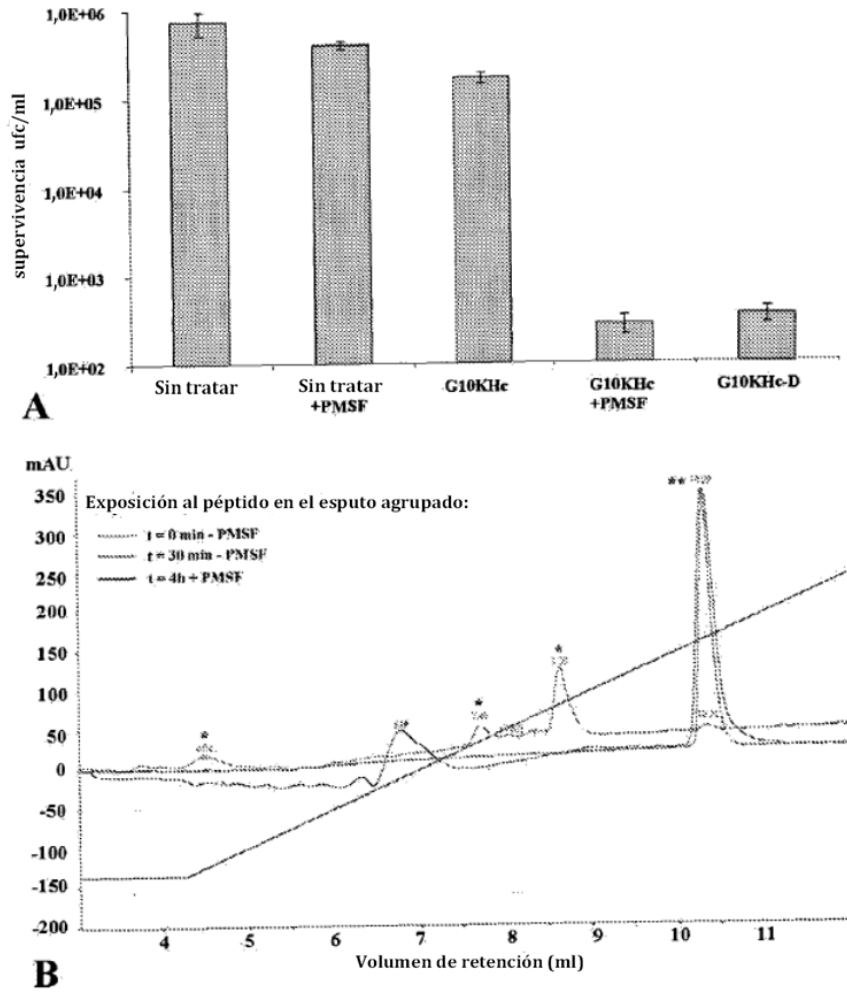


Figura 12

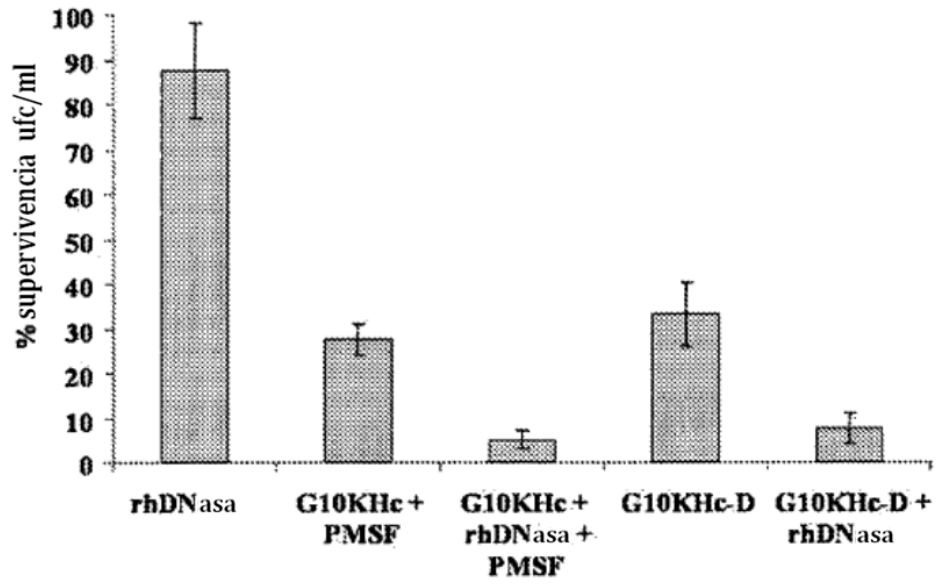


Figura 13.

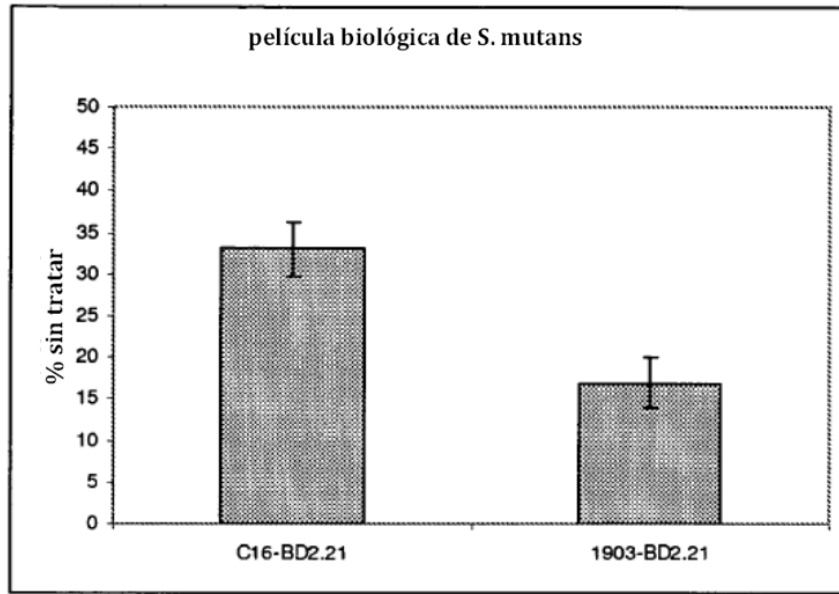
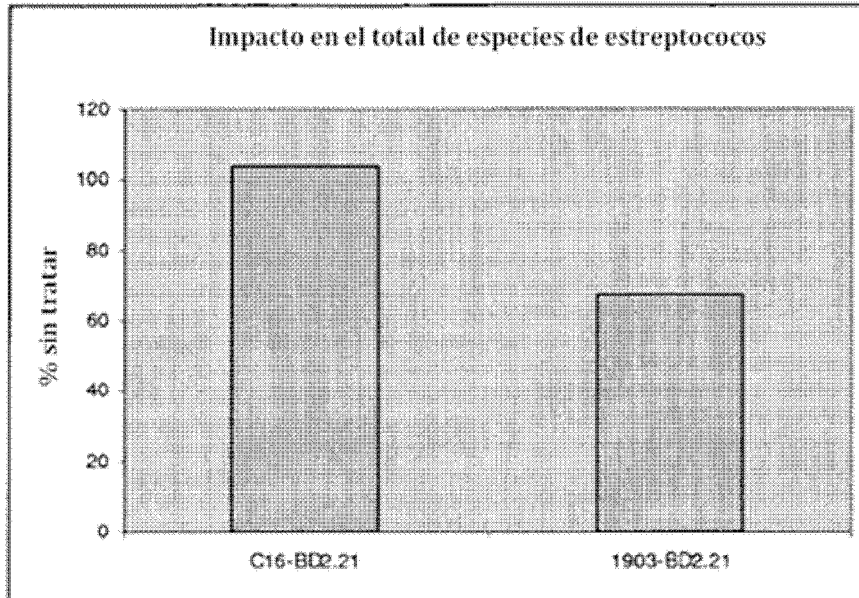


Figure 14.

A



B

