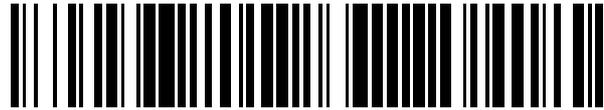


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 767**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2008 E 08795782 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2118122**

54 Título: **Nuevos péptidos antimicrobianos**

30 Prioridad:

16.01.2007 US 880783 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2015

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:

**HE, JIAN;
ECKERT, RANDAL H.;
QI, FENGXIA;
ANDERSON, MAXWELL H. y
SHI, WENYUAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 548 767 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

Nuevos péptidos antimicrobianos

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de compuestos antimicrobianos. En particular, la presente invención pertenece a la identificación de nuevos péptidos antimicrobianos eficaces frente a *Streptococcus mutans* y otras bacterias.

10

Antecedentes de la invención

Los péptidos antimicrobianos (AMP) han llegado recientemente a la vanguardia como posibles sustitutos de antibióticos debido a su fuerte actividad de eliminación frente a un amplio espectro de especies bacterianas que incluyen cepas resistentes a fármacos. Los AMP son moléculas genéticamente comunes de inmunidad innata que se han descubierto en formas unicelulares y pluricelulares de vida (Tossi *et al.* (2000) *Biopolymers* 55: 4-30; Diamond (2001) *Biologist* (Londres) 48: 209-212; Lehrer y Ganz (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 96-102; Brogden *et al.* (2003) *Int. J. Antimicrob. Agents* 22: 465-478). Aunque pueden diferir drásticamente por la secuencia de péptidos y modificación después de la traducción (lineal, circular, etc), parece que la mayoría de los AMP eliminan las bacterias mediante la alteración de las membranas lipídicas, aunque parece que los detalles de este mecanismo varían ampliamente (Shai (2002) *Biopolymers* 66: 236-248; Brogden (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250). Las observaciones anteriores han indicado el papel crítico del carácter hidrófobo y catiónico en general en la función de AMP, incluyendo la contribución significativa de restos de Trp aromático y Arg catiónica encontrados en muchos AMP (Chan *et al.* (2007) *Biochim Biophys Acta.* 51 (4): 1351-1359; Wei *et al.* (2006) *J. Bacteriol.* 188: 328-334). A pesar de su pequeño tamaño (la mayoría de los AMP tienen menos de 50 aminoácidos), también parece que la estructura secundaria desempeña un papel importante en la actividad. Ciertos AMP lineales pueden adoptar una conformación helicoidal α o de hebra después de la interacción con entornos hidrófobos (tales como detergentes o vesículas de lípidos) que imitan a las membranas bacterianas, lo que sugiere que estos cambios conformacionales son necesarios para la función antimicrobiana (Kiyota *et al.* (1996) *Biochemistry* 35: 13196-13204; Wei *et al.* (2006) *J. Bacteriol.* 188: 328-334; Wimmer *et al.* (2006) *Biochemistry* 45: 481-497). Además, parece que la formación de una hélice α de membrana activa (y otras estructuras) requiere una disposición espacial anfipática de los restos, es decir, un gradiente de hidrofobicidad a través de la superficie del péptido (Kiyota *et al.* (1996) *Biochemistry* 35: 13196-13204; Shai (1999) *Biochim Biophys Acta* 1462: 55-70; Lee (2002) *Curr Pharm Des* 8: 795-813).

Anteriormente, el diseño racional de péptidos antimicrobianos se ha centrado principalmente en la variación de secuencias naturales existentes, o el desarrollo de nuevos péptidos procedentes de grandes bibliotecas combinatorias (Kiyota *et al.* (1996) *Biochemistry* 35: 13196-13204; Blondelle y Lohner (2000) *Biopolymers* 55: 74-87; Hong *et al.* (2001) *Peptides* 22: 1669-1674; Sawai *et al.* (2002) *Protein Eng.* 15: 225-232). Estos esfuerzos han proporcionado una información valiosa sobre actividad y estructura de AMP.

40

El *Streptococcus mutans*, un patógeno oral común y el agente causante de la caries dental, ha persistido e incluso prosperado en la superficie de los dientes a pesar de los esfuerzos constantes para eliminarlo o erradicarlo. Son muy necesarias nuevas terapias contra este organismo, ya que *S. mutans* es un colonizador persistente de la superficie del diente en presencia de azúcares de la dieta y puede permanecer en la microflora oral (conocida como placa dental) a pesar de la eliminación mecánica dedicada (cepillado de dientes) y los esfuerzos antisépticos en general (Keene y Shklair (1974) *J. Dent. Res.* 53: 1295). Payne *et al.*, *Oral Microbiology and Immunology*, 1991; 6 (3): 169-176 divulgan los efectos selectivos de ciertos polipéptidos ricos en histidina en la agregación y viabilidad de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*. Helmerhorst, *Biochemical Journal*, 1997; 326 (1): 39-45 divulgan ciertos análogos de histatina sintética con amplio espectro de actividad antimicrobiana. Lee *et al.*, *Infection and Immunity*, 1997; 65 (7): 2898-2903 divulgan los efectos del pH y la salinidad sobre las propiedades antimicrobianas de clavaninas especiales. Rydengard *et al.*, *FEBS Journal*, 2006; 274 (2): 377-389 divulgan que una glicoproteína rica en histidina en particular ejerce actividad antibacteriana. Mason *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006; 50 (10): 3305-3311 divulgan un aumento de la alteración de la membrana y una acción antibiótica frente a bacterias patógenas mediante péptidos ricos en histidina diseñados específicamente a pH ácido.

55

Sumario de la invención

La presente invención pertenece al descubrimiento de nuevos péptidos antimicrobianos. En ciertas realizaciones, los péptidos muestran una actividad significativa frente a bacterias Gram positivas, en particular frente a bacterias Gram positivas en la cavidad oral (por ejemplo, *Streptococcus mutans*). Los péptidos son eficaces en la formulación de diversas composiciones antimicrobianas y/o en la prevención o reducción de la incidencia de caries dental.

60

Por consiguiente, en ciertos casos, se proporciona un péptido antimicrobiano activado con ácido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en HHHFHHFHHFHHF (SEC ID N°: 109) (AA-1), FHFFHHFHHFHHF (SEC ID N°: 110) (AA-2), KLLKGATFHFFHHFHHFHHF (SEC ID N°: 111) (AA-3), KLLKFHHFHHFHHFHHF (SEC ID N°: 112) (AA-4), y FHFFHHFHHFHHFHHF (SEC ID N°: 113) (AA-5), donde

65

repetido muestra mayor actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* a pH 4,9 que a pH 7,4. En el presente documento también se describe un péptido antimicrobiano, péptido que comprende el siguiente motivo de aminoácido o una permutación circular del siguiente motivo de aminoácido: $(H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5)_n$, donde n varía de 1 a 5 y puede aumentar en unidades de 0,1; H^1 , H^2 , H^3 , H^4 , y H^5 son aminoácidos hidrófobos o hidrófilos seleccionados independientemente; C^1 , C^2 , C^3 , C^4 , y C^5 son aminoácidos sin carga, aminoácidos con carga positiva, o aminoácidos con carga negativa seleccionados independientemente; el péptido forma una hélice alfa; y el péptido es eficaz para eliminar o inhibir el crecimiento y/o proliferación de *Streptococcus mutans* en cultivo. En ciertos casos C^1 , C^2 , C^3 , C^4 , y C^5 son aminoácidos con carga positiva, o aminoácidos con carga negativa seleccionados independientemente. En ciertos casos los aminoácidos sin carga se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en S, T, e Y (o análogos, derivados, o sustituciones conservativas de los mismos), y/o los aminoácidos con carga positiva se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en K, R, y H (o análogos, derivados, o sustituciones conservativas de los mismos), y/o los aminoácidos con carga negativa se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en N, Q, D, y E (o análogos, derivados, o sustituciones conservativas de los mismos), y/o los aminoácidos hidrófobos o hidrófilos se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en usando L, I, V, W, y F (o análogos, derivados, o sustituciones conservativas de los mismos). En ciertos casos, el péptido tiene al menos una carga positiva neta de +3 a pH fisiológico. En ciertos casos, n es 1,1; y el péptido comprende el motivo $H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6$, donde H^6 es un aminoácido hidrófobo seleccionado independientemente. Algunos péptidos con n = 1,1 ilustrativos incluyen, pero no se limitan a FKKFWKWFRRF (SEC ID N°: 31) (B-33), LKRFLKWFKRF (SEC ID N°: 32) (B-34), KLFKRWKHLFR (SEC ID N°: 33) (B-35), RLLKRFKHLFK (SEC ID N°: 34) (B-36), FKTLKWLHRF (SEC ID N°: 35) (B-37), IKQLLHFFQRF (SEC ID N°: 36) (B-38), KLLQTFKQIFR (SEC ID N°: 37) (B-39), RILKELKNLFR (SEC ID N°: 38) (B-40), LKQFVHFIHRF (SEC ID N°: 39) (B-41), VKTLLHIFQRF (SEC ID N°: 40) (B-42), KLVEQLKEIFR (SEC ID N°: 41) (B-43), RVLQEIKQILK (SEC ID N°: 42) (B-44), VKNLAELVHRF (SEC ID N°: 43) (B-45), ATHLLHALQRF (SEC ID N°: 44) (B-46), KLAENVKEILR (SEC ID N°: 45) (B-47), RAL-HEAKEALK (SEC ID N°: 46) (B-48), FHYFWHWFHRF (SEC ID N°: 47) (B-49), LYHFLHWFQRF (SEC ID N°: 48) (B-50), YLFQTWQHLFR (SEC ID N°: 49) (B-51), YLLTEFQHLFK (SEC ID N°: 50) (B-52), FKTLQWLHRF (SEC ID N°: 51) (B-53), IKTLLHFFQRF (SEC ID N°: 52) (B-54), KLLQTFNQIFR (SEC ID N°: 53) (B-55), TILQSLKNIFK (SEC ID N°: 54) (B-56), LKQFVKFIHRF (SEC ID N°: 55) (B-57), VKQLLKIFNRF (SEC ID N°: 56) (B-58), KLVQQLKNIFR (SEC ID N°: 57) (B-59), RVLNQVKQILK (SEC ID N°: 58) (B-60), VKKLAKLVRRF (SEC ID N°: 59) (B-61), AKRLLKVLKRF (SEC ID N°: 60) (B-62), KLAQKVKRVLR (SEC ID N°: 61) (B-63), y RALKRIKHVLK (SEC ID N°: 62) (B-64). En ciertos casos n es 1,4; y el péptido comprende el motivo $H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5H^6C^6C^7H^7$, donde H^6 , y H^7 son aminoácidos hidrófobos seleccionados independientemente, y C^6 y C^7 son aminoácidos con carga positiva o negativa seleccionados independientemente. Algunos péptidos con n = 1,4 péptidos incluyen, pero no se limitan a KLKLLKLLKLLK (SEC ID N°: 64) (α -5), LKLLKLLKLLK (SEC ID N°: 65) (α -6), LQLLKQLLKLLK (SEC ID N°: 66) (α -7), RWRWRWRHFFHFFH (SEC ID N°: 68) (α -9), KLKLLKRWRRWWR (SEC ID N°: 69) (α -10), RWRRLKLLHLLH (SEC ID N°: 70) (α -11), y KLKLLKHLHLLH (SEC ID N°: 71) (α -12).

En ciertos casos, el péptido antimicrobiano (AMP) es un péptido que comprende siete aminoácidos contiguos donde todos excepto dos aminoácidos son Arg o Trp, o derivados o análogos de los mismos; los dos aminoácidos que no son Arg ni Trp son Lys o Phe, o derivados o análogos de los mismos; y el resto N-terminal es Arg o un derivado o análogo del mismo. En varios casos, todos excepto dos de los aminoácidos son Arg o Trp (o derivados o análogos de los mismos); los dos aminoácidos que no son Arg ni Trp son Lys o Phe (o derivados o análogos de los mismos); y el resto N-terminal es Arg (o un derivado o análogo del mismo). En ciertos casos, el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en RRRRWWW (SEC ID N°: 72) (1C-1), RRWRWRW (SEC ID N°: 73) (1C-2), RRRWWW (SEC ID N°: 74) (1C-3), RWRWRWR (SEC ID N°: 75) (1C-4), RRRFWWR (SEC ID N°: 76) (2C-1), RRWRRF (SEC ID N°: 77) (2C-2), RRRWWW (SEC ID N°: 78) (2C-3), RWRWRWF (SEC ID N°: 79) (2C-4), RRRRWWK (SEC ID N°: 80) (3C-1), RRWRRK (SEC ID N°: 81) (3C-2), RRRWWWK (SEC ID N°: 82) (3C-3), RWRRWK (SEC ID N°: 83) (3C-4), RRRK-WWK (SEC ID N°: 84) (4C-1), RRWRK (SEC ID N°: 85) (4C-2), RRRKWWK (SEC ID N°: 86) (4C-3), y RWRKRWK (SEC ID N°: 87) (4C-4).

En el presente documento también se describen péptidos antimicrobianos activados con ácido (AMP) que comprenden un péptido helicoidal anfipático cuya longitud varía de aproximadamente 7 a aproximadamente 11 aminoácidos donde la mayoría (más de la mitad) de los restos cargados son His o un derivado o análogo del mismo que porta una carga catiónica a un pH ácido, donde el péptido no tiene básicamente actividad antimicrobiana alguna a pH neutro, pero tiene actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* a un pH ácido. En ciertos casos, todos los restos cargados son His o un derivado o análogo del mismo que porta una carga catiónica a un pH ácido (por ejemplo, pH 6 o inferior). En ciertos casos, el péptido comprende repeticiones alternantes de HH y FF. En ciertos casos, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos KLLK (SEC ID N°: 144) en uno o ambos extremos. En ciertos casos, KLLK (SEC ID N°: 144) se encuentra en uno o ambos extremos donde la secuencia KLLK se une al extremo con un conector (por ejemplo, GAT, SEC ID N°: 145). En ciertos casos, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos FHHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 110). Los AMP activados con ácido de la invención comprenden HHHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 109) (AA-1), FHHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 110) (AA-2), KLLKGATFHHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 111) (AA-3), KLLKFHHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 112) (AA-4), o FHHFFHHFFHHFFKLLK (SEC ID N°: 113) (AA-5). En el presente documento también se describen FHYFWHWFHRF (SEC ID N°: 114) (AA-6), y LYHFLHWFQRF (SEC ID N°: 115) (AA-7).

En el presente documento también se describen los AMP de la biblioteca de eliminación N° 7. Tales péptidos incluyen LKQKLKILF (SEC ID N°: 116) (S6L1-2), LKQLKAGIY (SEC ID N°: 117) (S6L1-3), VGKCVKLLY (SEC ID N°: 118) (S6L1-4), KFKVLI LAY (SEC ID N°: 119) (S6L1-5), KLVKLVFLY (SEC ID N°: 120) (S6L1-6), IKVFAKQKY (SEC ID N°: 121) (S6L1-7), y RFRHFQERY (SEC ID N°: 122) (S6L1-8).

5 En el presente documento también se describen los AMP de la biblioteca de beta-supresión. Tales péptidos incluyen FVFRHKVWVKHRFLF (SEC ID N°: 123) (S3L8-1), VFI VVVKHVLV (SEC ID N°: 124) (S3L8-2), WRWRARWRWRLRWRF (SEC ID N°: 125) (S3L8-3), WRIHLRARLHVKFRF (SEC ID N°: 126) (S3L8-4), LRIHARFKVHIRLKF (SEC ID N°: 127) (S3L8-5), FHIKFRVHLKVR-FHF (SEC ID N°: 128) (S3L8-6),
 10 FHVKIHFRLHVKFHF (SEC ID N°: 129) (S3L8-7), LHIHAHFVHIIHLHF (SEC ID N°: 130) (S3L8-8), FKIHFRLLKVVIRFKF (SEC ID N°: 131) (S3L8-9), FKAHIRFKLRVKFHF (SEC ID N°: 132) (S3L8-10), LKAKIKFKVCLKIKF (SEC ID N°: 133) (S3L8-11), WIWKHKFLHRHFLF (SEC ID N°: 134) (S3L8-12), VFLHRHVVIKHLV (SEC ID N°: 135) (S3L8-13), FLHKHVLRRHIVF (SEC ID N°: 136) (S3L8-14), VFKHKIVHRHILF (SEC ID N°: 137) (S3L8-15), FLFKHLFLHRIF (SEC ID N°: 138) (S3L8-16), LFKHILHRVIF (SEC ID N°: 139) (S3L8-17), FL-HKHLFKHKL (SEC ID N°: 140) (S3L8-18), VFRHRFIHRHVF (SEC ID N°: 141) (S3L8-19), FIKHLVHKHVLV (SEC ID N°: 142) (S3L8-20), VLRHLFRHRIVF (SEC ID N°: 143) (S3L8-21), LVHKLILRHLLF (SEC ID N°: 144) (S3L8-22), VFKRVLI HKLIF (SEC ID N°: 145) (S3L8-23), IVRKFLFRHKVF (SEC ID N°: 146) (S3L8-24), VLKHVIAHKRLF (SEC ID N°: 147) (S3L8-25), FIRKFLFKHLF (SEC ID N°: 148) (S3L8-26), VIRHVWVRKLF (SEC ID N°: 149) (S3L8-27), FLFRHRFRHRLVF (SEC ID N°: 150) (S3L8-28), LFLHKHAKHKFLF (SEC ID N°: 151) (S3L8-29), FKHKFKHKFIF (SEC ID N°: 152) (S3L8-30), LRHRLRHLIF (SEC ID N°: 153) (S3L8-31), LILKFLFKFVF (SEC ID N°: 154) (S3L8-32), VLIR-ILVRVIF (SEC ID N°: 155) (S3L8-33), FRHRFRHRF (SEC ID N°: 156) (S3L8-34), LKHKLKHKF (SEC ID N°: 157) (S3L8-35), FKFKHLIF (SEC ID N°: 158) (S3L8-36), LRLRHRVLF (SEC ID N°: 159) (S3L8-37), FKFLFKFLF (SEC ID N°: 160) (S3L8-38), LRLFLRWLF (SEC ID N°: 161) (S3L8-39), FKFLFKHKF (SEC ID N°: 162) (S3L8-40), LRLFLRHRF (SEC ID N°: 163) (S3L8-41), FKFLFKF (SEC ID N°: 164) (S3L8-42), y
 25 LRLFLRF (SEC ID N°: 165) (S3L8-43).

En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento se unen a un segundo péptido antimicrobiano (AMP) formando de este modo un péptido antimicrobiano compuesto. Los dos péptidos se pueden conjugar de forma química directamente o a través de un conector, o se pueden expresar (o sintetizar) una proteína de fusión con o sin conector peptídico. En ciertas realizaciones, el segundo péptido antimicrobiano es: un péptido que comprende el siguiente motivo de aminoácido o una permutación circular del siguiente motivo de aminoácido: $(H^1C^1C^2H^2H^3C^3H^4H^5C^4C^5)_n$ donde n varía de 1 a 5 y puede aumentar en unidades de 0, 1; H¹, H², H³, H⁴, y H⁵ son aminoácidos hidrófobos o hidrófilos seleccionados independientemente; y C¹, C², C³, C⁴, y C⁵ son aminoácidos neutros, aminoácidos con carga positiva, o aminoácidos con carga negativa seleccionados independientemente; o el péptido que comprende los siete aminoácidos contiguos donde todos excepto dos aminoácidos son Arg o Trp, o derivados o análogos de los mismos; los dos aminoácidos que no son Arg ni Trp son Lys o Phe, o derivados o análogos de los mismos; y el resto N-terminal es Arg o un derivado o análogo del mismo. En ciertas realizaciones, el segundo péptido antimicrobiano es un péptido que se enumera en la Tabla 4, Tabla 6, Tabla 7, o Tabla 8.

40 En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos o los AMP compuestos que se describen en el presente documento comprenden adicionalmente una amina libre en el extremo de carboxilo (por ejemplo, proporcionado por arginina o lisina, o mediante un resto no catiónico amidado). En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos o los AMP compuestos que se describen en el presente documento están pegilados. En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento o los AMP compuestos porta uno o más grupos protectores (por ejemplo, grupos aceto, amida, y alquilo de 3 a 20 carbonos, Fmoc, Tmoc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenoacetilo, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr), Mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzIO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinsulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), t-butoxicarbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-Butilo (tBu), Acetilo (Ac), y Trifluoroacetilo (TFA), y similares). En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento o los
 55 AMP compuestos comprenden todos los aminoácidos de origen natural. En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento comprenden uno o más aminoácidos "D" y/o uno o más beta aminoácidos. En ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento o los AMP compuestos están marcados con una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta enzimática, una etiqueta fluorescente, una etiqueta colorimétrica, una etiqueta de espín, una etiqueta radiactiva, y similares).

60 También se proporciona una formulación farmacéutica que comprende un péptido antimicrobiano que se describe en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la formulación es una formulación de dosificación unitaria. En ciertas realizaciones, el excipiente es aceptable para administración a una mucosa oral. En el presente documento también se describen formulaciones farmacéuticas que comprenden uno cualquiera, sin que los péptidos antimicrobianos o los AMP compuestos que se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones la presente invención proporciona un producto para el cuidado de la salud que comprende un péptido antimicrobiano que se describe en el presente documento, donde dicho péptido antimicrobiano está contenido en un producto seleccionado entre el grupo que consiste en pasta de dientes, enjuague bucal, una tira o solución de blanqueado de dientes, un almacenamiento de lentes de contacto, solución humectante o de limpieza, hilo dental, un palillo de dientes, una cerda de cepillo de dientes, una pulverización oral, una pastilla para chupar oral, una pulverización nasal, un pulverizador para aplicación oral y/o nasal, y un apósito para heridas. En el presente documento también se describe un producto de cuidado de salud en el hogar que comprende uno cualquiera o más de los péptidos antimicrobianos o los AMP compuestos que se describen en el presente documento donde el péptido o péptidos antimicrobiano y/o AMP compuestos están contenidos en un producto seleccionado entre el grupo que consiste en pasta de dientes, enjuague bucal, una tira o solución de blanqueado de dientes, almacenamiento de lentes de contacto, solución humectante o de limpieza, hilo dental, un palillo de dientes, una cerda de cepillo de dientes, una pulverización oral, una pastilla para chupar oral, una pulverización nasal, un pulverizador para aplicación oral y/o nasal, y un apósito para heridas.

También se proporciona un péptido antimicrobiano que se describe en el presente documento para su uso en un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una bacteria, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha bacteria con una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de dicha bacteria. En el presente documento también se describen métodos para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una bacteria (u otro patógeno). Por lo general, los métodos implican poner en contacto la bacteria u otro patógeno con uno o más de los péptidos antimicrobianos y/o AMP compuestos que se describen en el presente documento, en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de la bacteria u otro patógeno. En ciertas realizaciones, la cantidad es una cantidad suficiente para eliminar la bacteria. En ciertas realizaciones, la bacteria es una bacteria Gram positiva. En ciertas realizaciones, la bacteria es una bacteria oral Gram positiva (por ejemplo, *Streptococcus sp.*). En ciertas realizaciones la puesta en contacto comprende poner en contacto una superficie mucosa (por ejemplo, una mucosa oral, una mucosa nasal, etc.).

En el presente documento también se describen métodos para inhibir la formación de caries dental. Por lo general, los métodos comprenden poner en contacto los dientes y/o la mucosa oral con uno o más de los péptidos antimicrobianos y/o AMP compuestos que se describen en el presente documento en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento y/o proliferación de *S. mutans*. En ciertos casos la puesta en contacto comprende poner en contacto los dientes y/o mucosa oral con una composición seleccionada entre el grupo que consiste en una pasta de dientes, a enjuague bucal, una tira o solución de blanqueo, una pastilla para chupar, un aerosol, y un hisopo.

En ciertos casos los péptidos que se describen y/o las fórmulas genéricas en el presente documento excluyen expresamente al péptido B-33 (FKKFWKWFRRF, SEC ID N°: 7).

DEFINICIONES

El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de restos de aminoácidos cuya longitud varía por lo general de 2 a aproximadamente 50 restos. En ciertos casos la longitud del péptido varía de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, o 11 restos a aproximadamente 50, 45, 40, 45, 30, 25, 20, o 15 restos. En ciertos casos la longitud del péptido varía de aproximadamente 8, 9, 10, 11, o 12 restos a aproximadamente 15, 20 o 25 restos. En ciertas realizaciones los restos de aminoácidos que comprenden el péptido son restos de aminoácidos en "forma L", sin embargo, se reconoce que en diversas realizaciones, en el péptido se pueden incorporar aminoácidos "D". Los péptidos también incluyen polímeros de aminoácidos donde uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural. Además, el término se aplica a la aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico u otros, "enlaces modificados" (por ejemplo, donde el enlace peptídico se sustituye con un α -éster, un β -éster, una tioamida, fosfonamida, carbomato, hidroxilato, y similares (véase, por ejemplo, Spatola, (1983) Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins 7: 267-357), donde la amida se incluye con una lámina saturada (véase, por ejemplo, Skiles *et al.*, documento de patente de Estados Unidos N° 4.496.542 y Kalttenbronn *et al.*, (1990) Pp. 969-970 en Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, Holanda, y similares)).

El término "resto", como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos naturales, sintéticos, o modificados. Diversos análogos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina (ácido beta-aminopropiónico), ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4 diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, n-etilglicina, n-etilasparagina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metilisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina, y similares. Estos aminoácidos modificados son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los " β -péptidos" están formados por " β aminoácidos", que tienen su grupo amino unido al carbono P en lugar de al carbono α como en los 20 aminoácidos biológicos convencionales. El único β aminoácido normalmente de origen natural es la β -alanina.

Los peptoides, o glicinas *N*-sustituidas, son una subclase específica de peptidomiméticos. Están muy relacionados con sus homólogos peptídicos naturales, pero se diferencia químicamente en que sus cadenas laterales están unidas a átomos de nitrógeno a lo largo de la estructura principal de la molécula, en lugar de a los carbonos α (como lo están en los aminoácidos naturales).

5 Los términos "convencional" y "natural" cómo se aplican a péptidos en el presente documento se refieren a péptidos, formados solamente a partir de los aminoácidos de origen natural: Ala, Cys, Asp, Glu, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, y Tyr. Un compuesto de la invención "corresponde" a un péptido natural si provoca una actividad biológica (por ejemplo, actividad antimicrobiana) relacionada con la actividad biológica y/o especificidad del péptido de origen natural. La actividad provocada puede ser la misma que, superior a o inferior a la del péptido natural. En general, tal peptoide tendrá una secuencia de monómeros básicamente correspondiente, donde un aminoácido natural está sustituido con un derivado de glicina *N*-sustituida, si el derivado de glicina *N*-sustituida se parecía al aminoácido original en su hidrofilia, hidrofobia, polaridad, etc. Por lo tanto, por ejemplo, los siguientes pares de péptidos se considerarían "correspondientes":

15 Ia. Asp-Arg-Val -Tyr-Ile-His- Pro-Phe (Angiotensina II) (SEC ID N°: 1) y

Ib. Asp-Arg-Val*-Tyr-Ile*-His-Pro-Phe (SEC ID N°: 2);

20 IIa. Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg (Bradiquinina) (SEC ID N°: 3) y

IIb: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe*-Ser*-Pro-Phe*-Arg (SEC ID N°: 4);

25 IIIa: Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr (β -Endorfina) (SEC ID N°: 5); y

IIIb: Gly-Gly-Phe*-Met-Ser*-Ser-Glu-Lys*-Ser-Gln-Ser*-Pro-Leu-Val*-Thr (SEC ID N°: 6).

30 En estos ejemplos, "Val*" se refiere a N-(prop-2-il)glicina, "Phe*" se refiere a N-bencilglicina, "Ser*" se refiere a N-(2-hidroxietil)glicina, "Leu*" se refiere a N-(2-metilprop-1-il)glicina, e "Ile*" se refiere a N-(1-metilprop-1-il)glicina. No es necesario que la correspondencia sea exacta: por ejemplo, la N-(2-hidroxietil)glicina puede sustituir a Ser, Thr, Cys, y Met; la N-(2-metilprop-1-il)glicina puede sustituir a Val, Leu, e Ile. Obsérvese en IIIa y IIIb mencionados anteriormente que Ser* se usa para sustituir a Thr y Ser, a pesar de las diferencias estructurales: la cadena lateral en Ser* es un grupo metileno más larga que la de la Ser, y se diferencia de la Thr en el sitio de hidroxil-sustitución. En general, se puede usar una glicina *N*-hidroxialquil-sustituida para reemplazar cualquier aminoácido polar, una *N*-glicina bencil- o *N*-aralquil-sustituida para reemplazar cualquier aminoácido aromático (por ejemplo, Phe, Trp, etc.), una glicina *N*-alquil-sustituida tal como *N*-butilglicina para reemplazar cualquier aminoácido no polar (por ejemplo, Leu, Val, Ile, etc.), y un derivado de *N*-(aminoalquil)glicina para reemplazar cualquier aminoácido polar básico (por ejemplo, Lys y Arg).

40 Un "péptido antimicrobiano compuesto" o "AMP compuesto" se refiere a un constructor que comprende dos o más AMP unidos en conjunto. Los AMP se pueden unir directamente o a través de un conector. Se pueden conjugar químicamente o, cuando se unen directamente en conjunto o a través de un conector peptídico pueden comprender una proteína de fusión.

45 En ciertos casos, se contemplan sustituciones conservativas de los aminoácidos que comprende en cualquiera de las secuencias que se describen en el presente documento. En varios casos uno, dos, tres, cuatro, o cinco restos diferentes están sustituidos. El término "sustitución conservativa" se usa para reflejar sustituciones de aminoácido que básicamente no alteran la actividad (por ejemplo, actividad y/o especificidad antimicrobiana) de la molécula. Por lo general, las sustituciones de aminoácidos conservativas implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia). Cada uno de los seis grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas habituales entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

55 En ciertos casos, también se contemplan péptidos antimicrobianos que comprenden una identidad de la secuencia de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 % o un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 % o un 98 % con cualquiera de las secuencias que se describe el presente documento. Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", se refiere a dos o más secuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide usando una de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Con respecto a los péptidos de la presente invención, la identidad de la secuencia se determina en la longitud completa del péptido. Para la comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. El

algoritmo de comparación de secuencias a continuación calcula el porcentaje de identidad de la secuencia para la secuencia o secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados. La alineación óptima de las secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2444, mediante puestas en práctica por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Genética de Wisconsin, Grupo de Informática Genética, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual.

El término "especificidad" cuando se usa con respecto a la actividad antimicrobiana de un péptido indica que el péptido inhibe preferentemente el crecimiento y/o proliferación y/o elimina una especie microbiana en particular en comparación con otras especies relacionadas. En ciertas realizaciones la inhibición o eliminación preferente es superior en al menos un 10 % (por ejemplo, LD₅₀ es inferior en un 10 %), preferentemente en al menos un 20 %, 30 %, 40 %, o 50 %, más preferentemente superior en al menos 2 veces, al menos 5 veces, o al menos 10 veces para las especies diana.

"Tratar" o "tratamiento" de una afección como se usa en el presente documento puede hacer referencia a la prevención de la afección, ralentización del inicio o tasa de desarrollo de la afección, reducción del riesgo del desarrollo de la afección, prevención o retraso del desarrollo de los síntomas asociados con la afección, reducción o finalización de los síntomas asociados con la afección, generación de una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de las mismas.

La expresión "que consiste básicamente en" cuando se usa con respecto a un péptido antimicrobiano (AMP) o motivo de AMP como se describe en el presente documento, indica que el péptido o péptidos incluidos por la biblioteca o variantes, análogos como derivados de los mismos poseen básicamente la misma actividad y/o especificidad antimicrobiana o superior a la del péptido de referencia. En ciertos casos la actividad antimicrobiana básicamente igual o superior se refiere a al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, y más preferentemente al menos un 95 % de la actividad antimicrobiana del péptido o péptidos de referencia frente a una especie bacteriana en particular (por ejemplo, *S. mutans*).

En diversas realizaciones, en el presente documento se usa las abreviaturas de los aminoácidos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

Nombre	Abreviatura	
	3 Letras	1 Letra
Alanina	Ala	A
βAlanina (NH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH)	3Ala	
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido Glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Homoserina	Hse	-
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K

Nombre	Abreviatura	
	3 Letras	1 Letra
Metionina	Met	M
Sulfóxido de metionina	Met (O)	-
Metionina metilsulfonio	Met (S-Me)	-
Norleucina	Nle	-
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
ácido épsilon-aminocaproico (NH ² -(CH ₂) ₅ -COOH)	Ahx	J
ácido 4-aminobutanoico (NH ₂ -(CH ₂) ₃ -COOH)	gAbu	
ácido tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico		O
Lys(N(épsilon)-trifluoroacetilo)		K[TFA]
ácido α-aminoisobutírico	Aib	B

Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra proyecciones de rueda de hélice alfa para péptidos representativos de las bibliotecas binaria y de hélice alfa (SEC ID N^os: 32, 58, 66 y 70). Los restos se enumeran de forma consecutiva desde el extremo N al extremo C.

10 Las Figuras 2A y 2B ilustran la cinética de eliminación comparativa de péptidos de fusión de binaria a hélice α y de binaria a RW. *S. mutans* se estimuló con 25 µg/ml de péptidos de fusión de binario a hélice α (Figura 2A) o de binario a RW (Figura 2B) o los AMP precursores, y las CFU de supervivencia se sembraron en diversos puntos temporales después de la adición. Las muestras a 0 min se sembraron antes del tratamiento competido. Todos los puntos de datos representan el promedio de los resultados de al menos tres experimentos independientes ± desviaciones estándar.

15 Descripción detallada

En diversas realizaciones, la presente invención pertenece al descubrimiento de nuevos péptidos que tienen actividad antimicrobiana. En ciertas realizaciones los péptidos son eficaces para eliminar y/o para inhibir el crecimiento y/o proliferación de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) y otras especies determinadas (por ejemplo, hongos [por ejemplo, *Candida albicans*, etc.], bacterias Gram-negativas [por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.], y bacterias Gram-positivas [por ejemplo, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus*, etc.]).

25 *S. mutans* es un agente patógeno encontrado en la cavidad oral y es un agente causal principal responsable de la formación de caries dental, una de las infecciones bacterianas más prevalente y costosa en todo el mundo (véase, por ejemplo, Instituto Nacional de la Salud (2000) Salud oral en América: un informe del Cirujano General, Departamento de salud y Servicios Humanos, Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, MD; Departamento de Salud del Estado de Washington (2002) Enfermedades Infecciosas - Caries Dental, Departamento de Salud del Estado de Washington, Olympia, WA; Loesche (1986) Microbial Rev., 50: 353-380; Anderson y Shi (2006) Pediatr. Dent. 28: 151-153; fusión 192-198, y similares). La alta carga financiera del tratamiento de la caries dental en Estados Unidos, especialmente entre poblaciones sin privilegios y minoritarias, así como la evidencia que indica que los estreptococos orales (incluyendo *S. mutans*)

pueden contribuir directamente a consecuencias clínicas más graves, tales como enfermedad cardiaca (Doyuk *et al.* (2002) *J. Infect* 45: 39-41; Nakano *et al.* (2006) *J. Clin. Microbiol.*, 44: 3313-3317), resalta la importancia del desarrollo de agentes terapéuticos adicionales frente a este agente patógeno.

5 Los péptidos antimicrobianos (AMP) de la presente invención encuentran usos en un gran número de contextos. Por ejemplo, los péptidos se pueden administrar por vía sistemática o por vía local para inhibir o eliminar infecciones que comprenden *S. mutans* y otras cepas o especies. En ciertas realizaciones los péptidos antimicrobianos se pueden incorporar también en diversos productos para el cuidado de la salud. Por ejemplo, los péptidos se pueden incorporar en pastas dentífricas o lavado bucal para reducir o prevenir la colonización o recolonización de la cavidad oral y reducir de este modo la incidencia y/o grado de formación de caries dental. En diversas realizaciones, los AMP se pueden incorporar en hilo dental para fines similares o se pueden proporcionar en hisopos que se usan para limpiar los dientes y la mucosa oral.

10 En ciertas realizaciones los AMP se pueden incorporar en productos como un componente de un conservantes para inhibir la colonización bacteriana y/o degradación del producto.

15 Estos usos son ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Usando las enseñanzas que se proporcionan en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que los péptidos se pueden usar como principio activo en una preparación antimicrobiana para usos que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento de superficie de artículos para contrarrestar el crecimiento microbiano en dicha superficie, y como aditivo en alimentos humanos y animales, productos de cuidado higiénico, desinfectantes, agentes de limpieza, biocidas, y similares.

I. Péptidos antimicrobianos.

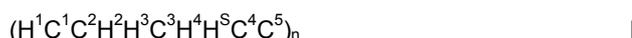
25 Para evitar la síntesis de bibliotecas combinatorias grandes de péptidos aleatorios, se produjeron péptidos sintéticos con actividad con anti-*S. mutans* mediante el diseño racional de varias bibliotecas de péptidos estructuralmente diversos pequeños y a continuación estas bibliotecas se identifican sistemáticamente para la capacidad de eliminación de *S. mutans*. En ciertos casos cada biblioteca estaba limitada a péptidos de un tamaño definido y armazón estructural, y las secuencias dentro de cada biblioteca se variaban gradualmente para generar péptidos con características bioquímicas variables. Estas características incluían contenido de resto hidrófobo aromático, carga positiva neta, y carácter de formación de hélice α , anfipática predicha. Se creó una biblioteca mediante la supresión sistemática de restos de varias secuencias anfipáticas activas (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Se crearon otras bibliotecas por sustitución de histidinas (His). Estos péptidos activados con ácido se diseñaron para que fueran activos pH inferior a 6,0 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2).

30 Para aumentar adicionalmente la eficacia de los péptidos que presentan características anti-*S. mutans*, los péptidos más bactericidas de cada biblioteca se sintetizaron en conjunto como una molécula, en diversas combinaciones y con y sin un conector peptídico flexible entre cada región antimicrobiana, para generar péptidos de fusión. Muchos de estos péptidos de fusión presentaban aumento de las actividades de eliminación en comparación con las moléculas originales no unidas.

35 En consecuencia, los resultados presentados en el presente documento proporcionan nuevos péptidos antimicrobianos y un nuevo método para identificar péptidos antimicrobianos adicionales usando pequeñas bibliotecas diseñadas de forma racional. Curiosamente, parece que los péptidos más activos derivados en este estudio son selectivos para varias bacterias orales Gram-positivas. Dado que *S. mutans* normalmente crece en un estado de biopelícula *in vivo*, los inventores también se animaron a encontrar que los péptidos que se describen en el presente documento tenían actividad frente a biopelículas de *S. mutans in vitro* cultivadas en placas de vidrio (los datos no se muestran).

40 En la Tabla 4 se muestran algunos péptidos ilustrativos (biblioteca binaria, biblioteca de hélice alfa y biblioteca de RW). En el presente documento también se describen concatémicos de los péptidos (integrales o fraccionarios, por ejemplo, tal como se muestra en la Fórmula I, que sigue a continuación) así como quimeras que comprenden dos péptidos unidos en conjunto ya sea directamente, a través de un conector peptídico, o conjugados químicamente.

45 En ciertos casos (por ejemplo, bibliotecas binarias y bibliotecas de hélice α) los péptidos antimicrobianos comprenden el motivo de aminoácido o permutación circular del motivo de aminoácido de Fórmula I:



50 donde n varía de 1 a 5 y puede aumentar en unidades de 0,1; H^1 , H^2 , H^3 , H^4 , y H^5 son aminoácidos hidrófobos o hidrófilos seleccionados independientemente; C^1 , C^2 , C^3 , C^4 , y C^5 son aminoácidos con carga positiva o negativa seleccionados independientemente y/o, en ciertos casos, aminoácidos neutros; y el péptido mencionado es eficaz para eliminar o inhibir el crecimiento y/o proliferación de *Streptococcus mutans* en cultivo. En ciertos casos el péptido forma una hélice alfa. En ciertos casos el péptido mencionado excluye la secuencia de aminoácidos FKKFWKWFRRF (SEC ID N°: 7).

En la fórmula I, se dice que n aumenta en unidades de 0,1 para reconocer que el motivo se puede repetir parcialmente. Esto se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2. Ilustración de cómo el motivo se repite parcialmente como n incrementos de 0,1.

n	Motivo
1	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵
1,1	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶
1,2	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶
1,3	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷
1,4	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸
1,5	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ C ⁸ H ⁹
1,6	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹
1,7	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹ H ¹⁰
1,8	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹ H ¹⁰ C ¹¹
1,9	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹ H ¹⁰ C ¹¹ C ¹²
2	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹ H ¹⁰ C ¹¹ C ¹²

- 5 El superíndice para restos de H o C aumenta a medida que se añade nuevos restos (ya que n aumenta) lo que indica que el nuevo resto hidrófobo (H) se selecciona independientemente entre los otros restos hidrófobos y el nuevo resto cargado o neutro (C) se selecciona independientemente entre los otros restos cargados o neutros.
- 10 En ciertos casos, se contemplan permutaciones circulares de los péptidos incluidos en la Fórmula I. La permutación circular del motivo indica simplemente que el motivo puede comenzar con cualquier resto. Es equivalente a la unión de dos extremos del motivo (amino unido a extremo carboxilo) y a continuación se abre el péptido circular en una ubicación diferente. Por supuesto, no es necesario que el péptido permutado de forma circular se haya creado de este modo, pero simplemente tiene una secuencia de aminoácidos o un motivo equivalente a la secuencia o motivo producido con esta operación.
- 15

Tabla 3. Permutaciones circulares ilustrativas (CP) de Fórmula I.

Fórmula/n de CP	Motivo
Fórmula I n = 1	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵
CP n = 1	C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ¹
CP n = 1	H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ¹ C ²
CP n = 1	H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ¹ C ² H ² H ³ C ³
Fórmula I n = 1,7	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁹ H ⁹
CP n = 1,7	H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹ C ¹ C ² H ²
CP n = 1,7	H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³
CP n = 2	H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰
CP n = 2	H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰ H ¹ C ¹ C ² H ² H ³ C ³ H ⁴
Fórmula I n = 2	H ² H ³ C ³ H ⁴ H ⁵ C ⁴ C ⁵ H ⁶ C ⁶ C ⁷ H ⁸ C ⁸ H ⁹ H ¹⁰ C ⁹ C ¹⁰ H ¹ C ¹ C ²

- 20 En ciertos casos, la carga varía en las posiciones de C mediante el uso de restos de S, T, Y sin carga; K, R, H con carga positiva; o N, Q, D, E con carga negativa. En ciertos casos la variación de la hidrofobicidad se controla usando aminoácidos L, I, V, W, y F.

En ciertos casos los péptidos de la biblioteca binaria mostrados en la Tabla 4 incluyen péptidos de acuerdo con la Fórmula I donde n es 1,1, mientras que los péptidos de la biblioteca de hélice α incluyen péptidos de acuerdo con la Fórmula I, donde n es 1,4.

- 5 También se proporcionan péptidos de biblioteca de RW (véase, por ejemplo, la Tabla 4). En diversos casos, los péptidos de la biblioteca de RW son siete, ocho, nueve, diez, o 11 aminoácidos del péptido, de los que todos excepto 2 aminoácidos son Arg (R) o Trp (W) (o análogos o derivados de los mismos) colocados en cualquier combinación. Los restos de RW que no son Arg ni Trp son Lys o Phe o derivados o análogos de los mismos. En ciertos casos los péptidos son péptidos de siete restos todos los cuales excepto 2 aminoácidos van a ser Arg o Trp (colocados en cualquier combinación). Los dos restos que no son Arg ni Trp son Lys o Phe o derivados o análogos de los mismos. In en varios casos, el resto N-terminal de los péptidos de la biblioteca de RW es la arginina.

- 15 En el presente documento también se describen péptidos activados con ácido (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2), péptidos de la biblioteca de eliminación N° 7 (véase, por ejemplo, el Ejemplo 3), y bibliotecas de beta-supresión (véase, por ejemplo, el Ejemplo 4). Los péptidos dentro de las bibliotecas de Eliminación N° 7 y Beta-supresión se crearon a partir de un marco secuencia, similar a los que se han descrito anteriormente, de grupos alternantes de aminoácidos hidrófobos y cargados. Para la Bibliotecas de Eliminación N° 7, el número máximo de aminoácidos estaba limitado a 9 con, en ciertas realizaciones, extremos C amidados (véase, por ejemplo, la Tabla 7). Para la Biblioteca de Beta-supresión (véase, por ejemplo, la Tabla 8), los inventores variaron el tamaño de las secuencias de 20 15 a 7 restos, aunque todas las secuencias se limitaban a características anfipáticas e hidrófobas equivalentes (los datos no se muestran).

- 25 Los restos de histidina tienen una cadena lateral con pKa cercano a 6,0, y por lo tanto portan una carga catiónica a pH 6,0 e inferior, pero no a pH neutro. Los inventores crearon una Biblioteca activada Ácido con esta característica en la mente, de modo que resultaría una disposición de formación de hélice, anfipático (que conduce a la actividad anti-*S. mutans*) en un entorno de pH la (tal como la creada por *S. mutans* en una lesión de caries), pero los péptidos permanecerían inactivos a pH superior a 6,0. 42. En consecuencia, ciertos casos, los péptidos antimicrobianos activos comprenden un péptido helicoidal anfipático activado con ácido cuya longitud varía de aproximadamente 7 a aproximadamente 11 aminoácidos donde la mayoría de los restos cargados son His o un derivado o análogo del mismo que porta una carga catiónica a un pH ácido. Por lo general con el péptido tiene poca actividad microbiana o básicamente ninguna a pH neutro (por ejemplo, frente a *S. mutans*), pero tiene actividad antimicrobiana (por ejemplo, frente a *S. mutans*) a un pH ácido (por ejemplo, a pH de aproximadamente 6 o inferior, por ejemplo, de aproximadamente pH 1,4 a aproximadamente pH 6, de aproximadamente pH 2, aproximadamente pH 3, aproximadamente pH 4, o aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6, o aproximadamente pH 6,5). En ciertos casos todos los restos cargados en estos péptidos son His o un derivado o análogo del mismo que porta una carga catiónica a un pH negativo. Ciertos péptidos activados con ácido comprenden repeticiones alternantes de HH y FF. En ciertos casos el péptido comprende adicionalmente la secuencia de aminoácidos KLLK (SEC ID N°: 144), o instituciones conservativas de la misma, en uno o ambos extremos. En ciertos casos los péptidos comprenden adicionalmente la secuencia de aminoácidos KLLK (SEC ID N°: 144), o sustituciones conservativas de la misma, en uno o ambos extremos donde la KLLK (SEC ID N°: 144), se une al extremo mediante un conector (por ejemplo, GAT (SEC ID N°: 145). Diversos péptidos activados con ácido comprenden la secuencia de aminoácidos FHFFHHFFHHFF (SEC ID N°: 110). Una serie de los AMP activados con ácido se ilustran en el Ejemplo 2 (véase, por ejemplo, la Tabla 6).

- 45 En diversas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento puede comprender aminoácidos de origen natural, o aminoácidos de origen no natural que incluyen derivados y análogos de aminoácidos de origen natural. Además, diversos péptidos pueden incluir aminoácidos en forma L, aminoácidos en forma D, y/o beta-aminoácidos.

- 50 También se observará que además de secuencias de péptidos de la forma D y la forma L y beta que se ilustran de forma expresa en el presente documento, la presente invención también contempla formas retro y retro-inverso de cada uno de estos péptidos. En las formas retro, la dirección de las secuencias está invertida. En las formas inversas, la quiralidad de los aminoácidos componentes está invertida (es decir, los aminoácidos en la forma L se convierten en aminoácidos en la forma D y los aminoácidos en la forma D se convierten en aminoácidos en la forma L). En la forma retro-inverso, tanto el orden como la quiralidad de los aminoácidos está invertida. Por lo tanto, por ejemplo, una forma retro del péptido B-36 (RLLKRFKHLFK, SEC ID N°: 4) tiene la secuencia KFLHKFRKLLR (SEC ID N°: 28). Cuando el péptido B-36 comprende todos los L aminoácidos, la forma inversa comprenderá todos los D aminoácidos y la forma retro-inverso (retro-inversa) tendrá la secuencia de la SEC ID N°: 28 que comprende todos los aminoácidos en la forma D.

- 60 En diversas realizaciones, cualquiera de los péptidos que se describen en el presente documento, pueden portar uno o más grupos protectores. Por lo tanto, por ejemplo, el extremo carboxilo se puede amidar. En diversas realizaciones, ciertos extremos y/o cadenas laterales portan uno o más grupos de bloqueo del extremo C, y/o el extremo N, y/o restos internos se pueden bloquear con uno o más grupos de bloqueo como se describe en el presente documento.

65

Existe un gran número de grupos protectores adecuados para esta finalidad. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos acetilo, amida, y alquilo con los grupos acetilo y alquilo siendo particularmente precedentes para protección N-terminal y los grupos amida siendo preferentes para protección carboxilo terminal. En ciertas realizaciones, los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, cadenas de alquilo tal como en ácidos grasos, propeonilo, formilo y otros. Ciertos grupos protectores de carboxilo preferentes incluyen, pero no se limitan a, amidas, ésteres, y grupos protectores que forman éter. En una realización, un grupo acetilo se puede usar para proteger el extremo amino y un grupo amida se puede usar para proteger el ex carboxilo. Estos grupos de bloqueo aumentan las tendencias de formación de hélice de los péptidos. Ciertos grupos de bloqueo particularmente preferentes incluyen grupos alquilo de diversas longitudes, por ejemplo, grupos que tienen la fórmula: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-CO-}$ donde n varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 16 o 18, más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 13, y lo más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10.

Otros grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, Fmoc, t-butoxicarbonilo (t-BOC), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr), Mesitilen-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzlO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-Butilo (tBu), Acetilo (Ac), y Trifluoroacetilo (TFA), y similares.

Los grupos protectores/de bloqueo son bien conocidos por los expertos en la materia ya que son métodos para acoplar tales grupos al resto por estos apropiados que comprenden los péptidos de la presente invención (véase, por ejemplo, Greene *et al.*, (1991) Protective Groups in Organic Synthesis, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc. Somerset, N.J.). En una realización, por ejemplo, la acetilación se consigue durante la síntesis cuando el péptido está en la resina usando anhídrido acético. La protección de amidas se puede conseguir mediante la selección de una resina apropiada para la síntesis. Por ejemplo, la síntesis de los péptidos que se describen en el presente documento se puede realizar usando resina de amida de Rink como el soporte sólido. Después de la finalización de la síntesis, los grupos protectores semipermanentes en aminoácidos bifuncionales ácidos tales como Asp y Glu y en el aminoácido básico Lys, el hidroxilo de la Tyr se puede retirar simultáneamente. Los péptidos liberados de tal resina usando tratamiento ácido salen con el extremo N protegido como acetilo y con el grupo carboxilo protegido como NH_2 y con la retirada simultánea de todos los otros grupos protectores.

En diversas realizaciones, la presente invención también contempla formas pegiladas de los diversos péptidos protegidos o sin proteger en forma L, forma D, beta, retro, inversa, y/o retro-inverso de la presente invención. La pegilación se puede usar para aumentar la biocompatibilidad de los péptidos y/o para aumentar la vida media en suelo. Los expertos en la materia conocen bien algunos métodos para pegilación de péptidos (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N^{os} 7.256,258, 6.552,170, y 6.420,339, y las referencias citadas en ese documento).

Para las bibliotecas binaria, de eliminación de péptidos N^o 7, beta-supresión, y de hélice α , que se describe en el presente documento, los resultados indican que la actividad máxima de *S. mutans* se producían los péptidos tanto con una hidrofobicidad relativa elevada como en la carga positiva neta +3. Se observaron niveles intermedios de actividad para péptidos cuyas propiedades estaban dominadas por cualquier rasgo individual. Estos resultados son coherentes con lo que se conoce de la mayoría de los AMP sintéticos y naturales con carácter anfipático catiónico, y sugieren que B-33, α -7 y las otras secuencias activas en esta biblioteca se pueden comportar de una manera similar a la de otros AMP; es decir, la carga positiva del péptido proporciona atracción de AMP hacia membranas bacterianas aniónicas, mientras que la anfipaticidad facilita la interacción de la membrana, transición de la hélice, y eliminación celular (Hancock y Lehrer (1998) Trends Biotechnol., 16: 82-88; Shai (1999) Biochim Biophys Acta 1462: 55-70). Estos resultados también indican que un valor de $\langle \text{Hélice} \rangle$ elevado, por su parte, puede no correlacionarse con el aumento de la actividad anti-*S. mutans* para los AMP anfipáticos catiónicos. Sin embargo, a pH 6,0, algunos péptidos dentro de la biblioteca activada con ácido tienen fuerte carácter de formación de hélice anfipática que parece que se correlaciona con un aumento del contenido relativo de His y actividad frente a *S. mutans*.

Para la Biblioteca de RW, como fue el caso con las bibliotecas Binaria y hélice α , las secuencias más hidrófobas y catiónicas eran las más activas (2C-3, -4). A pesar de las diferencias de longitud y periodicidad en comparación con los péptidos en las otras bibliotecas, los péptidos de RW pueden ganar un aumento de la actividad a partir de mejoras en la unión o inserción de la membrana del péptido inicial. Sin desear quedar ligado a una teoría en particular, se cree que los péptidos ricos en Arg y Trp, a pesar de sus valores de $\langle \text{Hélice} \rangle$ bajos, forman disposiciones anfipáticas similares a la hélice estables después de la interacción de la membrana que se estabilizan mediante enlaces electrostáticos entre los electrones de H de Trp y el grupo funcional de Arg (véase, por ejemplo, Mecozzi *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93: 10566-10571; Jing *et al.* (2003) J. Pept. Res. 61: 219-229). Por lo tanto, las propiedades únicas de la secuencia de los péptidos de la Biblioteca de RW les permiten obtener estructuras unitarias que conducen en gran medida la actividad antimicrobiana.

En diversas realizaciones, la presente invención contempla concatémoros que comprenden combinaciones de dos o más péptidos diferentes de la presente invención unidos en conjunto directamente o a través de un conector (por ejemplo, conector peptídico, u otro conector). Por lo tanto, se contemplan conjugados químicos así como proteínas de fusión. Los resultados proporcionados en el presente documento indican que los péptidos de fusión, dímeros de AMP sintetizados como moléculas lineales individuales, a menudo presentan aumento de la cinética de eliminación en comparación con sus péptidos precursores. Algunos péptidos de fusión pueden funcionar aumentando el número de unidades que forman hélice por molécula en la superficie de la membrana, tal como se ha descrito para los haces de AMP (véase, por ejemplo, Sal-Man *et al.* (2002) *Biochemistry* 41: 11921-11930). Además, los resultados presentados en el presente documento sugieren que puede ser difícil predecir el efecto de la disposición constituyente (cuya subunidad de péptido de fusión va al extremo C o N) (comparar las MIC de FB α -12 y FB α -20), aunque otro trabajo demostrado que parece que los anfipáticos y supuestos AMP que forman hélices toleran mejor las adiciones N-terminales (Eckert *et al.* (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3833-3838; Szynol *et al.* (2006) *Chem Biol Drug Des* 67: 425-431).

En general, los resultados proporcionados en el presente documento muestran que *S. mutans* es susceptible a los AMP con hidrofobicidad y carga catiónica relativamente elevadas, que se pueden aislar fácilmente a partir de bibliotecas usando los métodos que se describen en el presente documento. Además, los péptidos de fusión creados a partir de secuencias activas conjuntas desde dentro y entre estas bibliotecas aumentan la cinética de eliminación de estos péptidos.

Se cree que los AMP proporcionados en el presente documento son eficaces frente a la infección microbiana en superficies normalmente estériles y de la mucosa, incluso cuando las infecciones están causadas por cepas resistentes a antibióticos. Los AMP se pueden administrar por vía tópica mediante cualquier número de métodos convencionales. Como alternativa, se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo, mediante administración oral o inyección. Los AMP diseñados de forma racional proporcionados en el presente documento son pequeños (la mayoría con menos de 20 aminoácidos), y por lo tanto son fáciles de sintetizar por vía química con un rendimiento elevado, una mejora sobre otros AMP costes son significativamente más largos (30-40 aminoácidos) y más difíciles de crear y purificar. Los AMP proporcionados también se pueden hacer a medida fácilmente para resistencia a proteasas, por ejemplo mediante la incorporación de aminoácidos de isómeros D, mediante pegilación, mediante el uso de aminoácidos de no origen natural, y similares.

II. Preparación de Péptidos.

Preparación del péptido.

Los péptidos usados en la presente invención se pueden sintetizar químicamente usando técnicas químicas convencionales de síntesis de péptidos o, en particular cuando el péptido no comprende restos de aminoácido "D", el péptido se puede expresar de forma recombinante. Cuando los polipéptidos "D" se expresan de forma recombinante, un organismo hospedador (por ejemplo, bacterias, vegetales, células fúngicas, *etc.*) se pueden cultivar en un entorno donde uno o más de los aminoácidos se proporcionan al organismo exclusivamente en una forma D. A continuación, los péptidos expresados de forma recombinante en un sistema de este tipo se incorporan a esos D aminoácidos.

En ciertas realizaciones, los D aminoácidos se pueden incorporar en precios expresados de forma recombinante usando amino acil-ARNt sintetasas modificadas que reconocen D-aminoácidos.

En ciertas realizaciones los péptidos se sintetizan químicamente mediante cualquiera de una serie de técnicas de síntesis de péptidos en fase fluida o sólida conocidas por los expertos en la materia. La síntesis en fase sólida donde el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método preferente para la síntesis química de los polipéptidos de la presente invención. Algunas técnicas para síntesis en fase sólida son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Barany y Merrifield (1963) *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*; Merrifield *et al.* (1963) *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156, y Stewart *et al.* (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

En una realización, los péptidos se pueden sintetizar mediante el procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida usando una resina de benzhiderilamina (Beckman Bioproducts, 0,59 mmol de NH₂/g de resina) como al soporte sólido. El aminoácido COOH terminal (por ejemplo, *t*-butilcarbonil-Phe) se une al soporte sólido a través de un grupo 4-(oximetil)fenacetilo. Se trata de una unión más estable que la unión de éster de bencilo convencional, aunque el péptido acabado todavía se puede escindir mediante hidrogenación. Para este fin se puede usar hidrogenación de transferencia usando ácido fórmico como el dador de hidrógeno. Algunos protocolos detallados para síntesis de péptidos y análisis de péptidos sintetizados se describen en un suplemento en miniimpresión que se adjunta a Anantharamaiah *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.*, 260 (16): 10248-10255,

En la síntesis química de péptidos, en particular péptidos que comprenden D aminoácidos, se observa que la síntesis normalmente produce un número de péptidos truncados además del producto deseado de longitud

completa. Por lo tanto, los péptidos por lo general se purifican usando, por ejemplo, HPLC.

D-aminoácidos, beta aminoácidos, aminoácidos no naturales, y similares se pueden incorporar en una o más posiciones en el péptido simplemente usando el resto de aminoácido derivatizado de forma apropiada en la síntesis química. Algunos restos modificados para síntesis de péptidos en fase sólida están disponibles en el mercado a partir de una serie de proveedores (véanse, por ejemplo, Advanced Chem Tech, Louisville; Nova Biochem, San Diego; Sigma, St Louis; Bachem California Inc., Torrance, etc.). La forma D y/o aminoácidos modificados de otro modo se pueden omitir totalmente o incorporar en cualquier posición en el Péptido si se desea. Por lo tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones, el oscuras puede comprender un solo ácido modificado, mientras que en otras realizaciones, el péptido comprende al menos dos, generalmente al menos tres, más generalmente al menos cuatro, no más generalmente al menos cinco, preferentemente al menos seis, más preferentemente al menos siete o incluso todos los aminoácidos modificados. En ciertas realizaciones, cada aminoácido básicamente es un aminoácido en forma D.

Como se ha indicado anteriormente, los péptidos o proteínas de fusión de la presente invención también se pueden expresar de forma recombinante.

En ciertas realizaciones, los péptidos antimicrobianos de la presente invención se sintetizan usando sistemas de expresión recombinantes. Por lo general, esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica el péptido o la proteína de fusión deseados, colocando el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor en particular, expresando el péptido o proteína de fusión en un hospedador, aislando el péptido o proteína de fusión expresados y, si fuera necesario, volviendo a naturalizar el péptido o proteína de fusión.

El ADN que codifican el péptido o péptidos o proteína o proteínas de fusión que se describen en el presente documento se puede preparar mediante cualquier método adecuado como se ha descrito anteriormente, que incluye, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa.

Este ácido nucleicos se puede ligar fácilmente en un vector apropiado que contiene secuencias de control de la expresión apropiadas (por ejemplo, promotor, potenciador, etc.), y, que contienen, opcionalmente, uno o más marcadores que se pueden seleccionar (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos).

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los péptidos o proteínas de fusión de la presente invención se pueden expresar en una diversidad de células hospedadoras, que incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levadura, Pombo, y diversas células eucariotas superiores tales como células de insecto (por ejemplo, SF3), las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante por lo general se unirá de forma operativa a secuencias de control de la expresión apropiadas para cada hospedador. Para *E. coli* éste puede incluir un promotor tal como los promotores T7, trp, o lambda, un sitio de unión a ribosomas y preferentemente una señal determinación de la transcripción. Para células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y a menudo un potenciador (por ejemplo, un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc.), y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias dadoras y aceptoras de corte y empalme.

Los plásmidos se pueden transferir en la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos tales como transformación con cloruro cálcico para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas con los plásmidos se pueden seleccionar mediante resistencia a antibióticos transmitida mediante genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* e *hyg*.

Una vez expresado, el péptido o péptidos o la proteína o proteínas de fusión recombinantes se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, generalmente, R. Scopes, (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y.). Son preferentes las composiciones básicamente puras con una homogeneidad de al menos aproximadamente un 90 a un 95 %, y las más preferentes tienen una homogeneidad de un 98 a un 99 % o superior.

Un experto en la materia reconocería que después de síntesis química, expresión biológica, o purificación, el péptido o péptidos o proteína o proteínas de fusión de la presente invención pueden poseer una conformación básicamente diferente de la conformación nativa deseada. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el péptido o proteína de fusión y a continuación hacer que la molécula se vuelva a plegar en la conformación preferente. Algunos métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir el nuevo plegado son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Debinski *et al.* (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; y Buchner, *et al.*, (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270). Debinski *et al.*, por ejemplo, describe la desnaturalización y reducción de proteínas de cuerpos de inclusión en guanidina-DTE. A continuación, la proteína se vuelve a plegar en un tampón redox que contiene glutatión oxidado y L-arginina.

Un experto en la materia reconocería que se pueden hacer modificaciones al péptido o péptidos y/o proteína o proteínas de fusión sin disminuir su actividad biológica. Se pueden hacer algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida al extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales (por ejemplo, poli His) colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción o codones de terminación o secuencias de purificación localizados convenientemente.

Preparación del péptido compuesto.

En ciertas realizaciones la presente invención contempla el uso de péptidos antimicrobianos "compuestos" que comprenden dos o más péptidos antimicrobianos (AMP) unidos en conjunto. Los péptidos se pueden unir directamente o a través de un conector. En diversas realizaciones los AMP se conjugan químicamente o como alternativa, cuando se unen directamente o se unen a través de un conector peptídico, los AMP compuestos se pueden expresar como una proteína de fusión.

Por lo general los AMP compuestos incluirán al menos un AMP descrito en el presente documento unido a un segundo AMP. El segundo AMP puede ser un AMP como se describe en el presente documento, u otros AMP conocidos por los expertos en la materia. Los expertos en la materia conocen un número de AMP diferentes (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N° 7.271.239, 7.223.840, 7.176.276, 6.809.181, 6.699.689, 6.420.116, 6.358.921, 6.316.594, 6.235.973, 6.183.992, 6.143.498, 6.042.848, 6.040.291, 5.936.063, 5.830.993, 5.428.016, 5.424.396, 5.032.574, 4.623.733).

En ciertas realizaciones los AMP compuestos comprenden dos o más AMP de la presente invención unidos entre sí.

En una realización, los AMP se conjugan químicamente entre sí. Los expertos en la materia conocen bien algunos medios para la conjugación química de moléculas. Por lo general los péptidos contienen una diversidad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH₂), que están disponibles para reacción con un grupo o grupos funcionales adecuados para unirse entre sí.

Como alternativa, el péptido o péptidos se pueden derivatizar para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de un número de moléculas conectoras tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Un "conector", como se usa en el presente documento, es una molécula que se usa para unir dos moléculas. Por lo general, el conector es capaz de formar enlaces covalentes a ambas moléculas (por ejemplo, los AMP). Algunos conectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos, o conectores peptídicos. En ciertas realizaciones los conectores se pueden unir a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Sin embargo, en ciertas realizaciones preferentes, los conectores se unirán a los grupos amino y carboxilo del carbono alfa en los aminoácidos terminales.

Un conector bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en una molécula (por ejemplo, AMP), y otro grupo reactivo en la otra molécula (por ejemplo, AMP diferente), se puede usar para formar el conjugado deseado. Como alternativa, la derivatización se puede realizar para proporcionar grupos funcionales. Por lo tanto, por ejemplo, También se conocen algunos procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libre en péptidos (véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.659.839).

Se conocen muchos procedimientos y moléculas conectoras para unión de diversas moléculas a péptidos o proteínas (véase, por ejemplo, el documento de Solicitud de Patente Europea N° 188.256; los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus *et al.* (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075).

Cuando los AMP se enlazan o se unen directamente mediante un conector peptídico, se pueden sintetizar usando técnicas químicas convencionales de síntesis de péptidos. Cuando ambos componentes son relativamente cortos, el resto quimérico se puede sintetizar como un solo polipéptido contiguo. Como alternativa las moléculas se pueden sintetizar por separado y a continuación se pueden fusionar mediante condensación del extremo amino de una molécula con el extremo carboxilo de la otra molécula formando de este modo un enlace peptídico. Como alternativa, cada uno de los AMP se pueden condensar con un extremo de una molécula espaciadora de péptido formando de este modo una proteína de fusión contigua.

En ciertas realizaciones, los AMP compuestos se sintetizan como proteínas de fusión usando metodología de ADN recombinante. Generalmente esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, colocando el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor en particular, expresando la proteína en un hospedador, aislando la proteína expresada y, si fuera necesario, volviendo a naturalizar la proteína. Los expertos en la materia conocen algunos métodos para la generación de proteínas de fusión.

En diversas realizaciones, se usa un conector peptídico para unir cada uno de los AMP. En diversas realizaciones, el conector peptídico es relativamente corto, por lo general con menos de aproximadamente 10 aminoácidos, preferentemente menos de aproximadamente 8 aminoácidos y más preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 5 aminoácidos. Algunos conectores ilustrativos adecuados incluyen, pero no se limitan a PSGSP (SEC ID N°: 106), ASASA (SEC ID N°: 107), o GGG (SEC ID N°: 108). En ciertas realizaciones, se pueden usar conectores más largos tales como (GGGS)₃ (SEC ID N°: 29).

En ciertas realizaciones, la presente invención contempla la unión de los AMP de la presente invención o los AMP compuestos a un resto de direccionamiento (por ejemplo, un péptido o anticuerpo específico de bacterias) para mejorar la especificidad del AMP. Algunos anticuerpos y/o restos de direccionamiento de péptido se describen por ejemplo, en el documento USSN 10/706.391, publicado como documento de patente US 2004/0137482, y similares.

El resto de direccionamiento se puede conjugar químicamente al AMP o AMP compuesto o el resto químico se puede expresar como una proteína de fusión, por ejemplo, como se ha explicado anteriormente para la fabricación de AMP compuestos.

Marcado de péptidos.

En diversas realizaciones, el péptido o péptidos antimicrobianos descritos en el presente documento y/o los AMP compuestos descritos en el presente documento se etiquetan con una etiqueta detectable. Las etiquetas detectables adecuadas para uso en la presente invención incluyen cualquier composición detectable con medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Algunas y etiquetas útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, biotina para tinción con conjugado de estreptavidina etiquetado, perlas magnéticas (por ejemplo, Dynabeads™), colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente de color verde, puntos cuánticos, y similares, véase, por ejemplo, Molecular Probes, Eugene; Oregon, USA), radioetiquetas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas normalmente en un ELISA), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal (por ejemplo, partículas de oro en el intervalo del tamaño de diámetro de 40 - 80 nm se dispersa luz verde con alta eficacia) o perlas de vidrio o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). Algunas patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241.

En ciertas realizaciones las etiquetas fluorescentes son preferentes porque proporcionan una señal muy fuerte con bajo fondo y no conllevan radiactividad. También se pueden detectar por vía óptica a resolución y sensibilidad elevadas a través de un procedimiento de barrido rápido.

Algunos agentes cromógenos adecuados que se pueden usar incluyen las moléculas y compuestos que absorben luz en un intervalo de longitudes de onda distintivas de modo que se puede observar un color o, como alternativa, que emiten luz cuando se irradian con radiación de una longitud de onda o intervalo de longitud de onda en particular, por ejemplo, agentes fluorescentes.

De forma ideal, las etiquetas fluorescentes absorberían luz por encima de aproximadamente 300 nm, preferentemente a aproximadamente 350 nm, y más preferentemente por encima de aproximadamente 400 nm, que normalmente emiten en longitudes de onda superiores a aproximadamente 10 nm superior a la longitud de onda de la luz absorbida. Se debería indicar que las características de absorción y emisión del colorante unido pueden diferir de las del colorante no unido. Por lo tanto, cuando se hace referencia a los diversos intervalos de longitud de onda y características de los colorantes, se pretende hacer referencia a los colorantes tal como se usa en y no al colorante que está sin conjugar y caracterizado en un disolvente arbitrario.

La señal detectable también se puede proporcionar mediante fuentes quimioluminiscentes y bioluminiscentes. Algunas fuentes quimioluminiscentes incluyen un compuesto que se lleva a excitar electrónicamente mediante una reacción química y a continuación puede emitir luz que sirve como señal detectable o indica energía a un aceptor fluorescente. Como alternativa, se pueden usar luciferinas en conjunto con luciferasa o lucigeninas para proporcionar bioluminiscencia.

Las etiquetas de espín son proporcionadas por moléculas indicadoras con un espín de electrón sin emparejar que se puede detectar mediante espectroscopía de resonancia de espín electrónico (ESR). Algunas etiquetas de espín ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, radicales libres orgánicos, complejos de metales de transición, en particular vanadio, cobre, hierro, y manganeso, y similares. Algunas etiquetas de espín a modo de ejemplo incluyen radicales libres de nitróxido.

Las etiquetas se pueden unir al AMP directamente o a través de un resto conector. En general, el sitio de unión de la etiqueta o etiqueta a conector no se limita a ninguna posición específica. Por ejemplo, una etiqueta se puede unir a una cadena lateral de aminoácidos, o al extremo amino o carboxilo de un resto terminal por lo general en cualquier posición que no interfiera con la actividad y/o especificidad del péptido.

Se reconocerá que las etiquetas fluorescentes no se van a limitar a moléculas orgánicas de una sola especie, pero incluyen moléculas inorgánicas, mezclas multimoleculares de moléculas orgánicas y/o inorgánicas, cristales, heteropolímeros, y similares. Por lo tanto, por ejemplo, algunos nanocristales de cubierta de núcleo de CdSe-CdS incluidos en una cubierta de sílice se pueden derivatizar fácilmente para acoplamiento a una molécula biológica (Bruchez *et al.* (1998) *Science*, 281: 2013-2016). De forma análoga, algunos puntos cuánticos altamente fluorescentes (seleniuro de cadmio protegido con sulfuro de cinc) se han acoplado covalentemente a biomoléculas para uso en detección biológica ultrasensible (Warren y Nie (1998) *Science*, 281: 2016-2018).

III. Formulaciones.

Formulaciones farmacéuticas.

Para realizar la invención, uno o más agentes activos (por ejemplo, péptidos antimicrobianos (AMP) o péptidos antimicrobianos compuestos que se describen en el presente documento) se administran a un mamífero con necesidad de los mismos, por ejemplo, a un mamífero que padece una infección microbiana o de forma profiláctica para prevenir una infección microbiana y/o para prevenir o reducir la incidencia o gravedad de la caries dental.

El agente o agentes activos se pueden administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados, y similares, con la condición de que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sea farmacológicamente adecuado, es decir, eficaz en el método o métodos presentes. Algunas sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos se pueden preparar usando procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica de síntesis y se describen, por ejemplo, en March (1992) *Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure*, 4^a Ed. N.Y. Wiley-Interscience.

Los expertos en la materia conocen algunos métodos para formular tales derivados. Por ejemplo, las sales de disulfuro de un número de agentes de administración se describen en la Publicación de PCT WO 00/059863. De forma análoga, algunas sales ácidas de péptidos, peptoides, u otros miméticos terapéuticos, se pueden preparar a partir de la base libre usando metodología convencional que por lo general implica la reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma de base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y el ácido se añade a esto. La sal resultante bien precipita o bien se puede extraer de la solución mediante la adición de un disolvente. Algunos ácidos adecuados para la preparación de sales de adición de ácido incluyen, pero no se limitan a ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares, así como a ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Una sal de adición de ácido se puede reconvertir en la base libre por tratamiento con una base adecuada. En el presente documento, ciertas sales de adición de ácido particularmente preferentes de los agentes activos incluyen sales de haluro, ya que se pueden preparar usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de la presente invención se realiza de una manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina, o similares. Algunas sales básicas particularmente preferentes incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, la sal sódica, y sales de cobre.

La preparación de ésteres por lo general implica la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del agente activo. En ciertas realizaciones, los ésteres son por lo general derivados sustituidos con acilo de grupos de alcohol libre, es decir, restos que se derivan de ácidos carboxílicos de fórmula RCOOH donde R es aralquilo, y preferentemente es alquilo inferior. Algunos ésteres se pueden reconvertir en los ácidos libres, si se desea, usando procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

Algunas amidas también se pueden preparar usando técnicas conocidas por los expertos en la materia o que se describen en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, algunas amidas se pueden preparar a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados, o se pueden preparar a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido por reacción con amoniaco o una alquil amina inferior.

En diversas realizaciones, los agentes activos identificados en el presente documento son útiles para administración parenteral, tópica, oral, nasal (o inhalada de otro modo), rectal, o local, tal como mediante aerosol o por vía transdérmica, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico de infección (por ejemplo, infección microbiana) una más de las patologías/indicaciones se describen en el presente documento (por ejemplo, aterosclerosis y/o síntomas de la misma). Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una diversidad de formas de dosificación unitaria dependiendo del método de administración. Algunas formas de dosificación unitaria adecuadas, incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas para chupar, supositorios, parches, pulverizaciones nasales, agentes inyectables, formulaciones de liberación sostenida implantables, complejos lípidos, etc.

Los agentes activos de la presente invención también se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable (excipiente) para formar una composición farmacológica. Algunos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción del agente o agentes activos. Algunos

- 5 compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas bajo de peso molecular, potenciadores de la protección y la absorción tales como lípidos, composiciones que reducen la eliminación o hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizantes y/o tampones.
- 10 Otros compuestos fisiológicamente aceptables, en particular para uso en la preparación de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina, y similares incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes, diluyentes/cargas, disgregantes, lubricantes, agentes de suspensión, y similares.

En ciertas realizaciones, para preparar una forma de dosificación oral (por ejemplo, un comprimido), un excipiente (por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, etc.), un agente disgregante opcional (por ejemplo, carbonato cálcico, carboximetilcelulosa calcita, glicolato de almidón sódico, crospovidona etc.), un aglutinante (por ejemplo, almidón alfa, goma arábica, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, ciclodextrina, etc.), y un lubricante opcional (por ejemplo, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol 6000, etc.), por ejemplo, se añaden al componente o componentes activos (por ejemplo, péptido activo y salicilanilida) y la

15 composición resultante se comprime. Cuando sea necesario, el producto formado por compresión se reviste, por ejemplo, a través de métodos conocidos para enmascarar el sabor o para disolución entérica o liberación sostenida. Algunos materiales de revestimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, etil-celulosa, hidroximetilcelulosa, polioxietilenglicol, ftalato acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, y Eudragit (Rohm & Haas, Alemania; copolímero de ácido metacrílico-acrílico).

25 Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulgentes, agentes de dispersión o conservantes que son particularmente útiles para la prevención del crecimiento o acción de microorganismos. Se conocen bien diversos conservantes e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la materia observaría que la elección del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración del agente o agentes

30 activos y de las características fisicoquímicas en particular del agente o agentes activos.

En ciertas realizaciones los excipientes son estériles y por lo general libres de materia no deseada. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas convencionales de esterilización bien conocidas. Para diversos excipientes de forma de dosificación oral tales como comprimidos y cápsulas no es necesaria la esterilidad. Normalmente es suficiente el patrón de USP/NF.

35

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones de la presente invención se administran, por ejemplo, por vía tópica o se administran a la cavidad oral o nasal, de un paciente que padece acción o está en riesgo de infección o para prevenir profilácticamente la caries dental u otras patologías de los dientes o la mucosa oral caracterizadas por

40 infección microbiana en una calle suficiente para prevenir y/o curar y/o prevenir o detener al menos parcialmente la enfermedad y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general de la salud del paciente. Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones se pueden administrar dependiendo de la dosificación y frecuencia que sea necesaria y tolerada por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una cantidad suficiente de los agentes activos de las formulaciones de la presente invención para tratar de forma eficaz (mejorar uno o más síntomas en) el paciente.

45

La concentración de agente o agentes activos puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en la actividad del principio o principios activos, peso corporal y similares de acuerdo con el modo de administración en particular seleccionado y las necesidades del paciente. Sin embargo, las concentraciones por lo general se seleccionarán para proporcionar dosificaciones que varían de aproximadamente 0,1 o 1 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día y en algunas ocasiones superiores. Las dosificaciones habituales varían de aproximadamente 3 mg/kg/día a aproximadamente 3,5 mg/kg/día, preferentemente de aproximadamente

50 3,5 mg/kg/día a aproximadamente 7,2 mg/kg/día, más preferentemente de aproximadamente 7,2 mg/kg/día a aproximadamente 11,0 mg/kg/día, y lo más preferentemente de aproximadamente 11,0 mg/kg/día a aproximadamente 15,0 mg/kg/día. En ciertas realizaciones preferentes, las dosificaciones varían de aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, las dosificaciones varían de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 50 mg proporcionadas por vía oral dos veces al día. Se observará

55 que tales dosificaciones pueden variar para optimizar un régimen terapéutico y/o profiláctico en un sujeto o grupos de sujetos en particular.

60

En ciertas realizaciones, los agentes activos de la presente invención se administran a la cavidad oral. Esto se consigue fácilmente mediante el uso de pastillas para chupar, pulverizaciones de aerosol, enjuague bucal, hisopos

65 revestidos, y similares.

En ciertas realizaciones, el agente o agentes activos de la presente invención se administran por vía tópica, por ejemplo, a la superficie de la piel, a una lesión o herida tópica, a un sitio quirúrgico, y similares.

5 En ciertas realizaciones los agentes activos de la presente invención se administran por vía sistémica (por ejemplo, por vía oral, o como un agente inyectable) de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la materia. En otras realizaciones preferentes, los agentes también se pueden administrar a través de la piel usando sistemas transdérmicos de administración del fármaco convencionales, es decir, "parches" transdérmicos donde el agente o agentes activos por lo general están contenidos dentro de una estructura laminada que sirve como un dispositivo de administración del fármaco para fijar en la piel. En una estructura de este tipo, la composición farmacológica por lo general está contenida en una capa, o "depósito", subyacente a una capa de sustrato superior. Se observará que el término "depósito" en este contexto se refiere a una cantidad de "principio o principios activos" que en última instancia está disponible para administración a la superficie de la piel. Por lo tanto, por ejemplo, el "depósito" puede incluir el principio o principios activos en un adhesivo en una capa de sustrato del parche, o en cualquiera de una diversidad de diferentes formulaciones de matriz conocidas por los expertos en la materia. El parche puede contener un solo depósito, o puede contener múltiples depósitos.

15 En una realización, el depósito comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante la administración del fármaco. Algunos ejemplos de materiales adhesivos de contacto en la piel adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietilenos, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliacrilatos, poliuretanos, y similares. Como alternativa, el depósito que contiene fármaco y el adhesivo de contacto en la piel como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente al depósito que, en este caso, puede ser cualquiera de una matriz polimérica como se ha descrito anteriormente, o puede ser un depósito de líquido o hidrogel, o puede tomar cualquier otra forma. La capa de sustrato en estos laminados, que como la superficie superior del dispositivo, funciona preferentemente como un elemento estructural primario del "parche" y proporciona al dispositivo la mayor parte de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de sustrato es preferentemente básicamente impermeable al agente o agentes activos y cualquier otro material que esté presente.

20 Otras formulaciones para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, pomadas, geles, pulverizaciones, fluidos, y cremas. Las pomadas son preparaciones semisólidas que por lo general se basan en vaselina otros derivados del petróleo. Por lo general, las cremas que contienen el agente activo seleccionado son líquidos discursos o emulsiones semisólidas, a menudo ya sea de aceite en agua o de agua en aceite. Por lo general, las bases de crema se pueden lavar con agua, y contienen una fase oleosa, un agente emulgente y una fase acuosa. La fase oleosa, en algunas ocasiones también denominada la fase "interna", está formada por un general de vaselina un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa normalmente, aunque no necesariamente, supera a la fase oleosa en volumen, y por lo general contienen un agente humectante. El agente emulgente en una formulación de crema por lo general es un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. La pomada o base de crema específicas a usar, como observaran los expertos en la materia, es una que proporciona una administración óptima del fármaco. Al igual que con otros excipientes o vehículos, una base de pomada debería ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizan.

Como se ha indicado anteriormente, también se contemplan diversas formulaciones bucales y sublinguales.

45 En ciertas realizaciones, uno o más agentes activos de la presente invención se pueden proporcionar como un "concentrado", por ejemplo, en un recipiente de almacenamiento (por ejemplo, en un volumen medido previamente) listo para dilución, o en una cápsula soluble lista para la adición hasta un volumen de agua, alcohol, peróxido de hidrógeno, u otro diluyente.

50 Aunque la invención se describe con respecto a su uso en seres humanos, también es adecuada para animales, por ejemplo, uso veterinario. Por lo tanto, ciertos organismos preferentes incluyen, pero no se limitan a seres humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, largomorfos, y similares.

Las formulaciones y métodos de administración mencionados anteriormente pretenden ser ilustrativos y no limitantes. Se observará que, usando la enseñanza proporcionada en el presente documento, se pueden concebir fácilmente otras formulaciones y modos de administración.

Formulaciones de productos para el cuidado de la salud.

60 En ciertas realizaciones, uno o más de los péptidos antimicrobianos (AMP) y/o AMP compuestos de la presente invención se incorporan en formulaciones para el cuidado de la salud, por ejemplo, un producto con o sin receta médica para uso en un lugar, para viaje, en el trabajo, en una clínica dental, en un hospital, etc. Tales formulaciones incluyen, pero no se limitan a, pasta de dientes, enjuague bucal, tira sus soluciones para blanqueado de dientes, almacenamiento de lentes de contacto, soluciones humectantes o de limpieza, hilo dental, palillos de dientes, cerdas de cepillo de dientes, pulverizaciones orales, pastillas para chupar orales, pulverizaciones nasales, aerosoles para aplicación oral y/o nasal, apósitos para heridas (por ejemplo, vendajes), y similares.

La formulación de tales productos para la salud es bien conocida por los expertos, y los AMP y/o AMP compuestos de la presente invención simplemente se añaden a tales formulaciones en una dosis eficaz (por ejemplo, una dosis profiláctica para inhibir la formación de caries dental, etc.).

- 5 Por ejemplo, las formulaciones de pasta de dientes son bien conocidas por los expertos en la materia. Por lo general, tales formulaciones son mezclas de agentes abrasivos y tensioactivos; agentes anticaries, tales como fluoruro; ingredientes para el control del sarro, tales como pirofosfato tetrasódico y copolímero de metil vinil éter/anhídrido maleico; tampones de pH; agentes humectantes, para evitar la sequedad y el aumento de sensación agradable en la boca; y agentes aglutinantes, para proporcionar consistencia y forma (véase, por ejemplo, la Tabla 4). Los agentes aglutinantes mantienen la fase sólida suspendida apropiadamente en la fase líquida para prevenir la separación de la fase líquida fuera de la pasta de dientes. También proporcionan cuerpo al dentífrico, especialmente después de la explosión del tubo en el cepillo de dientes.

Tabla 4. Componentes habituales de la pasta de dientes.

Ingredientes	% en peso
Humectantes	40-70
Agua	0-50
Tampones/sales/control del sarro	0,5-10
Espesantes orgánicos (gomas)	0,4-2
Espesantes inorgánicos	0-12
Abrasivos	10-50
Agentes activos (por ejemplo, triclosán)	0,2-1,5
Tensioactivos	0,5-2
Sabor y edulcorante	0,8-1,5
Las fuentes de fluoruro proporcionan 1000-15000 ppm de flúor.	

- 15 La Tabla 5 enumera los ingredientes habituales usados en las formulaciones; la combinación final dependerá de factores tales como la compatibilidad de los ingredientes y el coste, costumbres locales, y beneficios deseados y calidad a administrar en el producto. Se reconocerá que uno o más AMP y/o AMP compuestos de la presente invención se pueden añadir simplemente a tales formulaciones o se pueden usar en lugar de uno o más de los otros ingredientes.

Tabla 5. Lista de ingredientes habituales

Gomas	Espesantes Inorgánicos	Abrasivos	Tensioactivos	Humectantes	Ingrediente para Control del Sarro
Carboximetil celulosa sódica	Espesantes de sílice	Sílice hidratada	Lauril sulfato sódico	Glicerina	Pirofosfato tetrasódico
Éteres de celulosa	Silicatos de sodio y aluminio	Dihidrato de fosfato dicálcico	N-lauril sarcosinato sódico	Sorbitol	Gantrez S-70
Goma de Xantano	Arcillas	Carbonato cálcico	Pluronic	Propilen glicol	Tri-polifosfato sódico
Carragenanos		Bicarbonato sódico		Xilitol	
Alginato sódico		Pirofosfato cálcico	Lauril sulfoacetato sódico	Polietilen glicol	
Carbopols		Alúmina			

Una formulación ilustrativa que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.113,887 comprende (1) un agente bactericida soluble en agua seleccionado entre el grupo que consiste en compuestos de piridinio, compuestos de amonio cuaternario y compuestos de biguanidas en una cantidad de un 0,001 % a un 5,0 % en peso, basándose en el peso total de la composición; (2) una hidroxietilcelulosa modificada de forma catiónica que tiene un peso molecular medio de 1.000.000 o superior en la parte de hidroxietilcelulosa del mismo y que tiene un grado de cationización de 0,05 a 0,5 moles/glucosa en una cantidad de un 0,5 % a un 5,0 % en peso, basándose en el peso total de la composición; (3) un tensioactivo seleccionado entre el grupo que consiste en copolímeros en bloque de polioxietileno y polioxipropileno y compuestos alquilolamida en una cantidad de un 0,5 % a un 13 % en peso, basándose en el peso total de la composición; y (4) un agente de pulido no similar a la sílice en una cantidad de un 5 % a un 50 % en peso, basándose en el peso total de la composición. En ciertas realizaciones, los AMP y/o AMP compuestos de la presente invención se pueden usar en lugar del agente bactericida o en combinación con el agente bactericida.

De forma análoga, los expertos en la materia también conocen bien algunas formulaciones de enjuague bucal. Por lo tanto, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N°s U: 2.913.373, 3.975.514, y 4.548.809, y en las publicaciones de Patente de Estados Unidos N°s US 2003/0124068 A1, US 2007/0154410 A1, y similares, se divulgan algunos enjuagues bucales que contienen fluoruro sódico. También se conocen algunos enjuagues bucales que contienen diversos compuestos de metales alcalinos: benzoato sódico (documento de patente WO 9409752); hipohalito de metal alcalino (documento de patente US 2002/0114851A1); dióxido de cloro (documento de patente CN 1222345); fosfato de metal alcalino (documentos de patente US 2001/0002252 A1, US 2003/0007937 A1); hidrogeno sulfato/carbonato (JP 8113519); cloruro de cetilpiridinio (CPC) (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.117.417, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.948.390, y documento de patente JP 2004051511). También se conocen algunos enjuagues bucales que contienen alcohol superior (véase, por ejemplo, los documentos de patente US 2002/0064505 A1, US 2003/0175216 A1); peróxido de hidrógeno (véase, por ejemplo, el documento de patente CN 1385145); burbujas de gas CO₂ (véase, por ejemplo, el documento de patente JP 1275521 y el documento de patente JP 2157215). En ciertas realizaciones, estas y otras formulaciones de enjuague bucal pueden comprender uno o más de los AMP o AMP compuestos de la presente invención.

Los expertos en la materia también conocen el almacenamiento de lentes de contacto, soluciones humectantes o de limpieza, hilo dental, palillos de dientes, cerdas de cepillo de dientes, pulverizaciones orales, pastillas para chupar orales, pulverizaciones nasales, y aerosoles para la aplicación oral y/o nasal, y similares y se pueden adaptar fácilmente para que incorpore en uno o más AMP y/o AMP compuestos de la presente invención.

Se pretende que las formulaciones y/o dispositivos para el cuidado de la salud en el hogar mencionados anteriormente sean ilustrativos y no limitantes. Usando la enseñanza que se proporciona en el presente documento, los AMP y/o AMP compuestos de la presente invención se pueden incorporar fácilmente en otros productos.

IV. Kits.

En el presente documento también se describen kits para la inhibición de la infección y/o para el tratamiento y/o prevención de la caries dental en un mamífero. Por lo general los kits comprenden un envase que contiene uno o más de los agentes activos (es decir, péptidos antimicrobianos o péptidos antimicrobianos compuestos) que se describen en el presente documento. En ciertos casos el agente o agentes activos se pueden proporcionar en una formulación de dosificación unitaria (por ejemplo, supositorio, comprimido, comprimido encapsulado, parche, etc.) y/o se pueden combinar opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En ciertos casos los kits comprenden una o más de las formulaciones de producto para el cuidado de la salud en el hogar que se describen en el presente documento (por ejemplo, pasta de dientes, enjuague bucal, tiras o soluciones de blanqueado de dientes, almacenamiento de lentes de contacto, soluciones humectantes o de limpieza, hilo dental, palillos de dientes, cerdas de cepillo de dientes, pulverizaciones orales, pastillas para chupar orales, pulverizaciones nasales, aerosoles para aplicación oral y/o nasal, y similares).

Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de etiquetado y/o instrucciones que proporcionan directrices (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos o uso de los agentes "terapéuticos" o "profilácticos" de la presente invención. Los materiales de instrucciones preferentes describen el uso de uno o más agente o agentes activos de la presente invención para inhibir o prevenir la infección y/o para inhibir la formación de la caries dental de forma terapéutica o profiláctica. Los materiales de instrucciones también pueden enseñar, opcionalmente, el régimen precedente de dosificaciones/terapéutico, contraindicaciones y similares.

Aunque los materiales de instrucciones por lo general comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a los mismos. En la presente invención se contempla cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones para sitios en Internet que proporcionan tales materiales de instrucciones.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención que se reivindica. Las secuencias de aminoácidos de la invención se marcan con un ⁺.

5

Ejemplo Comparativo 1

Nuevos Péptidos Antimicrobianos Sintéticos frente a *Streptococcus mutans*

10 El *Streptococcus mutans*, un patógeno oral común y el agente causante de la caries dental, ha persistido e incluso prosperado en la superficie de los dientes a pesar de los esfuerzos constantes para eliminarlo o erradicarlo. En este estudio, los inventores generaron una serie de péptidos antimicrobianos sintéticos frente a esta bacteria mediante la creación y la identificación sistemática de varias bibliotecas péptidos estructuralmente diversos donde la hidrofobicidad y la carga dentro de cada biblioteca se variaba gradualmente para generar una colección de péptidos con diferentes características bioquímicas. A partir de estas bibliotecas, los inventores identificaron múltiples péptidos con una fuerte actividad de iluminación frente a *S. mutans*. Para aumentar adicionalmente su eficacia, la mayoría de los péptidos bacterianos de cada biblioteca se sintetizaron en conjunto como una molécula, en diversas combinaciones, con y sin un conector peptídico flexible entre cada región antimicrobiana. Muchos de estos péptidos de "fusión" presentaban un aumento de las actividades de eliminación en comparación con las de las moléculas no unidas originales. Los resultados presentados aquí ilustran que las bibliotecas pequeñas de péptidos bioquímicamente restringidos se pueden usar para generar péptidos antimicrobianos frente a *S. mutans*, varios de los cuales pueden ser agentes anticaries funcionales.

Materiales y Métodos

25

Cepas bacterianas

Se cultivaron aislados los clínicos de *S. mutans*, UA140 (32), UA159 (1), T8 (33), ATCC 25175, GS5 (Kuramitsu y Ingersoll (1977) Infect Immun., 17: 330-337), y todas las cepas gram-positivas indicadas a continuación (véase la Tabla 9) se cultivaron en condiciones anaerobias en infusión de corazón y cerebro o caldo de cultivo de Todd-Hewitt (TH) (Difco) durante una noche a 37 °C antes de su uso (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3651-3657). El PK1910 de *Veillonella atypica* se cultivó en medio de *Veillonella* (Egland *et al.* (2004) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101: 16917-16922). Todas las cepas se cultivaron en una atmósfera anaerobia de N₂ al 80 %, CO₂ al 10 %, y H₂ al 10 %.

35

Síntesis y purificación de péptidos.

Los péptidos se sintetizaron usando métodos de fase sólida de 9-fluorenilmetoxilcarbonilo (Fmoc) en un sintetizador de péptidos Apex 396 (AAPPTec, Louisville, KY). Todos los aminoácidos, resinas sustituidas apropiadamente (Anaspec), y reactivos (Fisher) se adquirieron con una calidad para síntesis de péptidos. La síntesis general de péptidos lineales indicaba el siguiente procedimiento: se añadieron 0,6 ml de piperidina al 25 % en dimetilformamida (DMF) a la resina que se había cargado con el primer aminoácido, seguido de agitación durante 27 min y ciclos de lavado de diclorometano (un lavado con 1 ml), y N-metilpirrolidona (siete lavados con 0,8 ml cada vez). Para el acoplamiento, se añadió un exceso 5 M de aminoácido protegido con Fmoc, N-hidroxi-benzotrazol, HBTU (hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio), y diisopropil etil-amina (exceso de 10 M) en DMF (0,1 ml) y N-metilpirrolidona (0,2 ml), y la mezcla de reacción se agitó durante 45 min. Después del acoplamiento del último aminoácido a la resina, el péptido protegido se escindió de la resina con 1 ml de ácido trifluoroacético-tioanisol-agua-1,2-etanoditiol (10 ml:0,5 ml:0,5 ml:0,25 ml) durante 2 h a temperatura ambiente y se lavó secuencialmente con DMF, metanol, y diclorometano y se secó durante una noche al vacío.

50

La cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa analítica y preparativa (purificador ACTA; Amersham) se realizó con una columna Source 15RPC eluyendo con H₂O y CH₃CN con ácido trifluoroacético al 0,1 % en un gradiente lineal como se ha descrito anteriormente (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3833-3838). Todos los péptidos se purificaron hasta > 90 % (los datos no se muestran). La masa del péptido se confirmó por espectrometría de masas con ionización/desorción mediante láser asistida por matriz y se realizó con muestras disueltas en una mezcla a 1:2 de H₂O-CH₃CN. Las medidas se prepararon en el modo lineal, con una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (sistema Voyager; ABI). La masa observada correspondía, en todos los casos, con el valor calculado (los datos nos muestran).

55

Cálculo de las características del péptido.

La hidrofobicidad media del péptido por resto (<H>) se calculó usando la escala de Fauchere y Pliska (Fauchere y Pliska (1983) Eur. J. Med. Chem. 18: 369-375), disponible en //us.expasy.org/tools/pscale/Hphob.Fauchere.html. Este método se seleccionó para el cálculo de la hidrofobicidad de los AMP debido a su concordancia con la evidencia experimental describiendo la afinidad de la membrana de los aminoácidos individuales en un sistema que hospedador-huésped (Thorgeirsson *et al.* (1996) Biochemistry 35: 1803-1809). La tendencia media de formación de

60

65

hélice α por resto (<Hélice>) se calculó usando la escala desarrollada por Liu y Deber que define las tendencias helicoidales de los aminoácidos individuales en entornos de membrana no polar, tales como los que encuentran los AMP en la superficie de la célula diana (Lehrer y Ganz (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 96-102).

5 Ensayos de MIC.

Los ensayos de inhibición del crecimiento antibacteriano se realizaron usando placas estériles de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l de TH o medio de *Veillonella* como se ha descrito anteriormente (Qi *et al.* (2005) FEMS Microbial Lett. 251: 321-326). En resumen, las células bacterianas y cultivaron durante una noche a una densidad óptica a 600 nm de 0,75 a 0,8 (que corresponde a 1×10^8 CFU/ml) y a continuación se diluyeron hasta 1×10^5 CFU/ml en caldo de cultivo y se tomaron alícuotas en placas. A continuación, se añadió un volumen apropiado de solución de reserva de péptido (de 5 a 20 mg/ml, en agua o metanol, dependiendo de la solubilidad) a la primera columna de la placa para dar 500 μ g/ml o 512 μ g/ml, seguido de diluciones a 1:2 en serie a través de la placa para obtener pocillos que contienen péptidos que varían de 500 a 1,95 μ g/ml o de 512 a 2 μ g/ml. También se añadió solamente metanol para controlar los efectos del disolvente. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C en condiciones anaerobios de 16 a 20 h sin agitación, y la MIC se determinó como la concentración de péptido presente en el último pocillo transparente después de inspección visual. Se encontró que hasta un 5 % (vol/vol) de metanol no era antimicrobiano (los datos nos muestran). Las MIC se determinaron por triplicado para todas las bacterias.

20 Evaluación de la cinética antimicrobiana.

La determinación de la cinética de eliminación para péptidos de fusión y precursores se realizó básicamente como se ha descrito anteriormente (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1480-1488). En resumen, cultivos de UA159 diluidos en medio durante una noche (de $0,5 \times 10^6$ a 1×10^6 CFU/ml) se estimularon con Péptido una concentración de 25 μ g/ml, y a los intervalos de tiempo indicados ("0 min" indica muestras sin tratar), se retiró una alícuota de 10 ml y las CFU supervivientes se rescataron por dilución (1:50) en medio de crecimiento y a continuación se extendieron en placas de agar de TH para cuantificación. Cuando los experimentos iniciales sugerían pocos supervivientes (< 3.000 CFU/ml), todas las muestras de 1 ml se sembraban sin alícuotas. La cinética se determinó registrando el número medio de CFU/ml supervivientes con respecto al tiempo de incubación en presencia de péptido (todos los ensayos se repitieron independientemente de tres a cinco veces). Para la Tabla 5, los valores del tiempo para la eliminación bactericida (TC) se definieron como el tiempo necesario para que el nivel de CFU/ml supervivientes a partir de cultivos tratados con péptido estuviera 3 \log_{10} por debajo de los niveles de CFU/ml de *S. mutans* recuperadas a partir de muestras sin tratar.

35 Resultados.

Diseños de bibliotecas restringidas de péptidos.

Los inventores hicieron la hipótesis de que una serie bibliotecas de péptidos pequeños que contenía gradientes de carácter hidrófobo y catiónico variado gradualmente, dentro de marcos conformacionales predichos restringidos, contendrían los AMP con actividad frente a *S. mutans*. Para este estudio se desarrollaron tres bibliotecas: las bibliotecas binaria, hélice alfa α , y RW. Los péptidos dentro de las bibliotecas binaria y de hélice α se diseñaron a partir de un marco de disposición de secuencia α -helicoidal, anfipática (HCCHHCHHCC_n, donde H es un resto hidrófobo y C es un resto cargado) que se desarrolló a partir de varios moldes de secuencia anfipática de AMP publicados (Blondelle y Lohner (2000) Biopolimers 55: 74-87; Zelezetsky *et al.* (2005) Peptides 26: 2368-2376) y se validó usando proyecciones de rueda helicoidal (Schiffer y Edmundson (1967) Biophys J., 7: 121-135) y la tendencia helicoidal media <Hélice> (Tabla 4). La Figura 1 nuestras dos proyecciones representativas de cada biblioteca. Las longitudes de los péptidos dentro de las bibliotecas binaria y de hélice α estaban limitadas a 11 y 14 aminoácidos, respectivamente, cerca del número de restos mínimos calculado necesarios para formar poros transmembrana (Shai (2002) Biopolimers 66: 236-248). Desde dentro de este marco estructural, la biblioteca ordinaria se creó mediante la reducción, en forma escalonada, de los componentes hidrófobos/aromáticos y catiónicos dentro de una secuencia de la medida inicial, FKKFWKWFRRF (B-33, SEC ID N°: 7), mediante la sustitución de restos menos hidrófobos/aromáticos o con carga positiva (B-33 se ha publicado con una nomenclatura alternativa, S6L3-33 [Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 3651-3657]). El gradiente de carga e hidrofobicidad resultante (<H>) dentro de esta biblioteca de 32 péptidos se muestra en la Tabla 4. La biblioteca de hélice α se diseñó para que fuera mayor que la biblioteca binaria (14 aminoácidos frente a 11), y de una manera similar a la de la biblioteca binaria, la hidrofobicidad y la carga se variaron gradualmente a través de la biblioteca de hélice α (Tabla 4).

60

Tabla 4. Secuencias y actividades antimicrobianas de péptidos de biblioteca binaria, hélice alfa, y RW frente a aislados clínicos de *S. mutans*.

Péptido	Secuencia ^a (SEC ID N°:)	MIC ^b (µg/ml)	Carga neta ^c	<H>	<Hélice>
Biblioteca binaria					
B-33	FKKFWKWFRRF* (SEC ID N°: 7)	8-24	+6	0,61	0,71
B-34	LKRFLKWFKRF* (SEC ID N°: 8)	8-24	+6	0,55	0,94
B-35	KLFKRWKHLFR (SEC ID N°: 9)	31,25-125	+5	0,18	0,85
B-36	RLLKRFKHLFK (SEC ID N°: 10)	31,25-125	+5	0,35	1,05
B-37	FKTFLKWLHRF* (SEQ IDNO:11)	24	+4	0,77	1,06
B-38	IKQLLHFFQRF* (SEC ID N°: 12)	24	+3	0,75	1,21
B-39	KLLQTFKQIFR (SEC ID N°: 13)	> 250	+3	0,50	1,11
B-40	RILKELKNLFK (SEC ID N°: 14)	> 250	+3	0,32	1,23
B-41	LKQFVHFIHRF* (SEC ID N°: 15)	32	+3	0,74	1,20
B-42	VKTL LHIFQRF* (SEC ID N°: 16)	31,25-125	+3	0,56	1,32
B-43	KLVEQLKEIFR (SEC ID N°: 17)	> 250	+1	0,16	1,10
B-44	RVLQEIKQILK (SEC ID N°: 18)	> 250	+2	0,43	1,21
B-45	VKNLAELVHRF* (SEC ID N°: 19)	> 250	+2	0,35	1,25
B-46	ATHLLHALQRF* (SEC ID N°: 20)	> 250	+2	0,62	1,31
B-47	KLAENVKEILR (SEC ID N°: 45)	> 250	+1	0,25	1,12
B-48	RALHEAKEALK (SEC ID N°: 46)	> 250	+1	0,02	1,02
B-49	FHYFWHWFHRF* (SEC ID N°: 47)	125	+2	1,09	0,79
B-50	LYHFLHWFQRF* (SEC ID N°: 48)	125	+2	1,00	1,05
B-51	YLFQTWQHLFR (SEC ID N°: 49)	> 125	+1	0,83	0,95
B-52	YLLTEFQHLFK (SEC ID N°: 50)	> 125	0	0,74	1,13
B-53	FKTFLQWLHRF* (SEC ID N°: 51)	16-64	+3	0,84	1,06
B-54	IKTLLHFFQRF* (SEC ID N°: 52)	32-62,5	+3	0,79	1,26
B-55	KLLQTFNQIFR (SEC ID N°: 53)	> 125	+2	0,54	1,10
B-56	TILQSLKNIFK (SEC ID N°: 54)	> 125	+2	0,56	1,24
B-57	LKQFVKFIHRF* (SEC ID N°: 55)	24	+4	0,64	1,18
B-58	VKQLLKIFNRF* (SEC ID N°: 56)	32-62,5	+4	0,56	1,25
B-59	KLVQQLKNIFR (SEC ID N°: 57)	> 125		0,38	1,11
B-60	RVLNQVKQILK (SEC ID N°: 58)	> 125	+3	0,33	1,17
B-61	VKKLAKLVRRF* (SEC ID N°: 59)	16-32	+6	0,27	1,21
B-62	AKRLLKVLKRF* (SEC ID N°: 60)	16-32	+6	0,31	1,25

ES 2 548 767 T3

Péptido	Secuencia ^a (SEC ID N°:)	MIC ^b (µg/ml)	Carga neta ^c	<H>	<Hélice>
Biblioteca binaria					
B-63	KLAQKVKRVLRLR (SEC ID N°: 61)	> 125	+5	0,18	1,10
B-64	RALKRIKHVLK (SEC ID N°: 62)	> 125	+5	0,06	1,15
Péptido	Secuencia ^a (SEC ID N°:)	MIC ^b (µg/ml)	Carga neta ^c	<H>	<Hélice>
Biblioteca de hélice alfa					
α-4	AQAAHQAAHAAHQF* (SEC ID N°: 63)	> 125	+1	0,26	1,13
α-5	KLKLLKLLKLLKLLK (SEC ID N°: 64)	8	+8	0,16	1,13
α-6	LKLLKLLKLLKLLKFF* (SEC ID N°: 65)	8	+7	0,55	1,42
α-7	LQLLKQLLKLLKQF* (SEC ID N°: 66)	8	+4	0,72	1,42
α-8	AQAAKQAAKAAKQF* (SEC ID N°: 67)	> 125	+4	0,026	1,09
α-9	RWRRWWRHFHFFH* (SEC ID N°: 68)	8	+5	0,61	0,55
α-10	KLKLLKRWRRWWR (SEC ID N°: 69)	8	+8	0,28	0,68
α-11	RWRLLKLLHLLH* (SEC ID N°: 70)	8	+6	0,44	1,02
α-12	KLKLLKLLHLLH* (SEC ID N°: 71)	8	+5	0,48	1,18
Biblioteca de RW					
1C-1	RRRRWWW (SEC ID N°: 72)	16	+4	0,39	0,24
1C-2	RRWRRRW (SEC ID N°: 73)	16	+4	0,39	0,24
1C-3	RRRWWW (SEC ID N°: 74)	32	+4	0,39	0,24
1C-4	RWRWRWR (SEC ID N°: 75)	32	+4	0,39	0,24
2C-1	RRRFWWR (SEC ID N°: 76)	31,25-125	+4	0,32	0,41
2C-2	RRWRRF* (SEC ID N°: 77)	12-24	+5	0,32	0,41
2C-3	RRRWWWF* (SEC ID N°: 78)	4-8	+4	0,79	0,46
2C-4	RWRWRWF* (SEC ID N°: 79)	4-8	+4	0,79	0,46
3C-1	RRRRWWK (SEC ID N°: 80)	125	+5	-0,076	0,19
3C-2	RRWRRK (SEC ID N°: 81)	125	+5	-0,076	0,19
3C-3	RRRWWWK (SEC ID N°: 82)	31,25-125	+4	0,39	0,24
3C-4	RWRWRWK (SEC ID N°: 83)	32	+4	0,39	0,24
4C-1	RRRKWWK (SEC ID N°: 84)	250	+5	-0,073	0,19

Péptido	Secuencia ^a (SEC ID N°:)	MIC ^b (µg/ml)	Carga neta ^c	<H>	<Hélice>
Biblioteca binaria					
4C-2	RRWKRRK (SEC ID N°: 85)	500	+6	-0,39	0,13
4C-3	RRRKWWK (SEC ID N°: 86)	125	+5	-0,51	0,19
4C-4	RWRKRWK (SEC ID N°: 87)	125-500	+5	-0,51	0,19

^a Un asterisco indica un extremo C amidado.
^b Intervalo o valor de MIC de todos los aislados de *S. mutans* sometidos a ensayo. La carga a pH 7, 0, calculada como se ha descrito anteriormente (Zhang *et al.* (2001) J. Biol. Chem., 276: 35714-35722).

Muchos AMP de origen natural contienen numerosos restos de Arg y Trp (Chan *et al.* (2007) Biochim Biophys Acta. 51(4): 1351-1359), e informes previos han demostrado que una predominancia de estos aminoácidos aparece en los AMP hexaméricos generados mediante métodos combinatorios sintéticos, o similares (Blondelle y Houghten (1996) Trends Biotechnol., 14: 60-65; Chan *et al.* (2007) Biochim Biophys Acta. 51 (4): 1351-1359). Por lo tanto, los inventores crearon la biblioteca de RW para contener heptámeros ricos en Arg y Trp (R y W) que se variaron en orden de restos básicos (Arg o Lys) y Trp y con respecto a restos de básicos a hidrófobos, tal como se muestra en la Tabla 6. Estas secuencias no se diseñaron para formar conformaciones de hélice α convencional, como se refleja en sus valores de <Hélice> bajos.

Actividad de péptidos de la biblioteca binaria.

La biblioteca binaria se evaluó para la actividad de *S. mutans* frente a una colección de aislados clínicos mediante un ensayo de MIC (Tabla 6). Dos péptidos que presentaban los valores de MIC más bajos (intervalo, de 8 a 24 µg/ml), B-33 y B-34, también eran los más hidrófobos y catiónicos en la biblioteca binaria. De forma análoga, B-37, -38, -41, -53, -54, -57, y -58, péptidos que eran activos pero en una menor medida que B-33 o B-34, poseían cargas netas de al menos + 3 y un <H> de > 0,55. Por el contrario, los péptidos con valores de hidrofobicidad inferiores a 0,55 no eran antimicrobianos, con dos excepciones: B-61 y B-62 (intervalo de MIC, de 16 a 32 µg/ml). En particular, cada uno de estos dos péptidos presentaba solamente un resto aromático pero una carga neta de +6 que puede contribuir a su actividad sostenida.

Los resultados de MIC son coherentes con la idea de que la carga positiva neta y un cierto contenido hidrófobo son parámetros críticos para el diseño de péptidos activos (Chan *et al.* (2007) Biochim Biophys Acta. 51 (4): 1351-1359; Deslouches *et al.* (2005) Antimicrob. Agents Chemother. 49: 316-322). Por consiguiente, la adición de restos con carga negativa, especialmente para el área central del péptido, parece que anula la actividad de AMP (por ejemplo, B-43), debido probablemente a la interrupción de la carga positiva necesaria para la atracción del péptido a la superficie bacteriana. Los datos indicándose excepciones interesantes, B-49 y B-50, que son débilmente activos a pesar de la falta de carácter catiónico fuerte. Los valores de <H> excepcionalmente elevados (y por lo tanto la probable partición rápida en membranas hospedadoras) para estos péptidos pueden explicar esta discrepancia. B-33, -34, y -38, tres de los péptidos más activos de esta biblioteca, se seleccionaron para un aumento adicional. De forma interesante, como fue el caso durante todo este estudio, ninguna cepa de *S. mutans* parecía más susceptible o resistente a los AMP sometidos al ensayo (los datos no se muestran)

Actividad de los péptidos de la biblioteca de hélice α .

Como se muestra en la Tabla 6, muchos de los péptidos de la biblioteca de hélice α presentaban actividades fuertes frente a *S. mutans*, tal como se evalúa con MIC: solamente dos péptidos con cargas positivas netas bajas o valores de <H> (α -4 y α -8, respectivamente) eran inactivos. Aunque muchos péptidos de la biblioteca de hélice α presentaban actividades de eliminación igualmente fuertes frente a *S. mutans*, solo α -11 se seleccionó para modificación adicional.

Actividad de los péptidos de la biblioteca de RW.

Como se muestra en la Tabla 4, los inventores observaron que 2C-3 y 2C-4 eran los péptidos más activos frente a *S. mutans* (intervalo de MIC, de 4 a 8 µg/ml) de la biblioteca de RW (ricos en Arg y Trp). Estos datos indican que una proporción cercana a 1:1 de aminoácidos de hidrófobos a cargados (incluyendo el Phe C-terminal amidado como un resto cargado) se requiere para actividad antimicrobiana robusta, similar a la proporción informada de 4:3 observada por Blondelle y otros que examinan los AMP ricos en Trp/Arg (Blondelle *et al.* (1996) Antimicrob. Agents Chemother. 40: 1067-1071; Shai (2002) Biopolimers 66: 236-248). Los péptidos de la biblioteca de RW con una proporción menor de aminoácidos de hidrófobos a cargados (reflejado en los valores de <H> más bajos) no eran tan activos como 2C-3 o 2C-4. Debido a sus MIC bajas, estos péptidos se seleccionaron para aumento adicional.

Diseño de los AMP de fusión.

Los estudios anteriores han mostrado que la síntesis de los AMP como dímeros lineales o haces pentaméricos conjuntos, en diversas disposiciones, pueden aumentar la actividad del péptido en comparación con la del AMP componente individual solo (Devi *et al.* (1998) J. Biomol. Struct. Dyn. 15: 653-651; Sal-Man *et al.* (2002) Biochemistry 41: 11921-11930). De un modo similar, los inventores plantearon la hipótesis de que la actividad de las secuencias activas para *S. mutans* mostradas en la Tabla 4 podría aumentar mediante la síntesis de los AMP en conjunto, de cabeza a cola, como una sola molécula de péptido lineal fusión individual. En los enturbien estudios anteriores de los inventores se observó que una región conectora entre dominios peptídicos tiene un impacto en la actividad antimicrobiana (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1480-1488). Por lo tanto, con las esperanzas de generar péptidos con mayor actividad frente a *S. mutans*, los inventores sintetizaron una biblioteca de péptidos de fusión (Tabla 7) que difería en la disposición de los AMP componentes y la secuencia de regiones colectoras (o sin conector) entre cada una.

En el conjunto de binario a hélice alfa, B-33 y B-38 se sintetizaron con α -11 en el extremo N o C. Un conector de tri-Gly (SEC ID N°: 108), que se ha mostrado anteriormente que es eficaz en la separación de regiones específicas funcionalmente independientes dentro de una secuencia lineal (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1480-1488) y puede ser crítica para la transición de la estructura secundaria del péptido en membranas modelo (Tack *et al.* (2002) Eur. J. Biochem. 269: 1181-1189), se usó para separarlos dos dominios de AMP. El conjunto de RW a RW de péptidos de fusión contenían 2C-3 y 2C-4 como homodímeros lineales con o sin diversas regiones colectoras entre ellas. En el último grupo mostrado en la Tabla 7 (conjunto de binario a RW), 2C-4 se sintetizó con B-33, -34, o -38 en el extremo N o C, de nuevos separado por una región conectora de Gly. Estas disposiciones permitieron que los investigadores investigaran la importancia de una composición conectora (y presencia) así como la disposición de subunidad de AMP (extremo N o C dentro del péptido de fusión) en la actividad anti-*S. mutans*.

Actividad antimicrobiana de los AMP de fusión.

Los MIC revelaron que los AMP de fusión eran en gran medida iguales o menos activos que sus AMP precursores frente a *S. mutans* (Tabla 7). Las excepciones incluían FB α -20, que presentaba un intervalo de MIC reducido en comparación con cualquiera de B-33 o α -11, y FBRW-22, que tenía un intervalo de MIC ligeramente reducido en comparación con el péptido precursor B-33. En general, estos datos indican que los AMP de fusión dan como resultado, en el mejor de los casos, sumamente modestas mejoras en la MIC. Sin embargo, los ensayos de MIC pueden ensombrecer las diferencias drásticas en la velocidad de eliminación entre péptidos comparables (Eckert *et al.* (2006) Antimicrob. Agents Chemother. 50: 1480-1488), lo que sugiere que un análisis más detallado de la cinética de eliminación de péptidos era necesaria para evaluar totalmente los AMP de fusión.

Tabla 7. Secuencia y actividad de péptidos de biblioteca de fusión

Péptido	Secuencia ^a	(μ g/ml) ^b	SEC ID N°
Conector de binario a α -helicoidal			
FB α -12	FKKFWKWFRRF-GGG-RWRLLKKLHLLH*	16	88
FB α -13	IKQLLHFFQRF-GGG-RWRLLKKLHLLH*	16	89
FB α -20	RWRLLKKLHLLH-GGG-FKKFWKWFRRF*	4-8	90
FB α -21	RWRLLKKLHLLH-GGG-IKQLLHFFQRF*	16	91
Conector de RW a RW			
FRW-2	RRRWWWFRRRWWW ⁻	16	92
FRW-8	RWRWRWFRWRWF ⁻	16	93
FRW-3	RRRWWWF-ASASA-RRRWWWF*	32	94
FRW-4	RRRWWWF-PSGSP-RRRWWWF*	32	95
FRW-5	RRRWWWF-GGG-RRRWWWF*	16	96
FRW-9	RWRWRWF-ASASA-RWRWRWF*	16	97
FRW-10	RWRWRWF-PSGSP-RWRWRWF*	32	98
Conector de RW a RW			

Péptido	Secuencia ^a	($\mu\text{g/ml}$) ^b	SEC ID N°
FRW-11	RWRWRWF-GGG-RWRWRWF*	16	99
Conector de binario a RW			
FBRW-14	FKKFWKWFRRF-GGG-RWRWRWF*	4-16	100
FBRW-15	IKQLLHFFQRF-GGG-RWRWRWF*	4-16	101
Conector de binario a RW			
FBRW-16	LKRFLKWFKRF-GGG-RWRWRWF*	4-16	102
FBRW-22	RWRWRWF-GGG-FKKFWKWFRRF*	4-8	103
FBRW-23	RWRWRWF-GGG-IKQLLHFFQWRF*	8-16	104
FBRW-24	RWRWRWF-GGG-LKRFLKWFKRF*	8	105
^a Un asterisco representa un extremo C amidado. ^b Intervalo o valor de MIC de todos los aislados de <i>S. mutans</i> sometidos a ensayo, con un mínimo de tres ensayos independientes.			

La cinética de eliminación de los AMP de fusión frente a *S. mutans* se analizaron para ensayos de tiempo de eliminación. Como se muestra en la Figura 2A, el péptido de fusión FB α -21 presenta un aumento evidente en la cinética de eliminación en comparación con cualquiera de B-34 o o-11: más de 2 log₁₀ menor que CFU/ml se recuperaron de los cultivos tratados con péptido de fusión que de las muestras tratadas con péptido precursor después de 30 min. Esta tendencia era representativa de todos los péptidos FB α (los datos no se muestran).

Un aumento de la cinética de eliminación para todos los como a todos de la biblioteca binaria-RW (con la excepción de FBRW-14 y -23) también era evidente (Figura 2B): los péptidos de fusión con el AMP de la biblioteca binaria en el extremo N o C con respecto a 2C-4 eran igualmente eficaces en el aumento del nivel de eliminación de *S. mutans* más de 3 log₁₀ después de 30 min de tratamiento, en comparación con las muestras tratadas con cualquier péptido precursor. Los resultados indican que los dominios de AMP conjuntos pueden estar ejerciendo un aumento del efecto de eliminación frente a *S. mutans* que se puede observar mejor después de periodos breves de exposición al péptido.

Como se muestra en la Tabla 8, los inventores también observaron un aumento de la cinética de eliminación para algunos péptidos de fusión de RW a RW. En las muestras tratadas con el homodímero 2C-4 sin una región conectora (FRW-8), el número de supervivientes de CFU/ml de *S. mutans* disminuyó a 3 log₁₀ por debajo del de las muestras sin tratar (definido como tiempo con respecto a la actividad bactericida, o T_c) en 50 min, mientras que 2C-4 presentaba un T_c de 220 min. Esta tendencia, en menor medida, también estaba presente cuando las muestras expuestas al homodímero 2C-3 sin un conector (FRW-2) se compararon con muestras tratadas con su péptido precursor (2C-3). De forma interesante, la adición de una región conectora de aminoácidos flexibles (cualquier PSGSP (SEC ID N°: 21), ASASA (SEC ID N°: 22), o GGG (SEC ID N°: 23)) entre dominios de 2C-3 no daba como resultado un aumento de la cinética de eliminación ($T_c > 250$ min para FRW-3 a -5), mientras que los homodímeros 2C-4 FRW-9 y -11 presentaban aumento de la velocidad bactericida con respecto a la del AMP precursor, 2C-4, a pesar de la presencia de regiones conectoras ASASA (SEC ID N°: 22) y GGG (SEC ID N°: 23), respectivamente (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la actividad peptídica basada en RW frente a *S. mutans* se puede aumentar mediante la síntesis de péptidos en conjunto sin una región conectora, pero cuando se usa una región conectora, los datos indican que el aumento de la cinética depende probablemente de la secuencia y por lo tanto de la estructura secundaria, ya que 2C-4 podría aumentar mediante conjugación es con regiones conectoras de aminoácidos flexibles (excepto PSGSP, SEC ID N°: 21) y 2C-3 no podría.

Tabla 5. Cinética bactericida de péptidos de biblioteca de RW precursor y FRW de fusión

Péptido	Composición del conector (SEC ID N°:)	T_c (min) ^a
AMP precursores		
2C-3		220
2C-4		230

Péptido	Composición del conector (SEC ID N°:)	T _c (min) ^a
Fusiones de 2C-3		
FRW-2	Sin conector	60
FRW-3	ASASA (107)	480
FRW-4	PSGSP (106)	420
Fusiones de 2C-3		
FRW-5	GGG (108)	270
Fusiones de 2C-4		
FRW-8	Sin conector	50
FRW-9	ASASA (107)	45
FRW-10	PSGSP (106)	270
FRW-11	GGG (108)	90
^a T _c , tiempo necesario para eliminar 3 log ₁₀ de CFU/ml recuperables.		

Actividad del péptido frente a otras bacterias orales.

- 5 Un conjunto de péptidos con la mejor actividad anti-*S. mutans* (como se mide con MIC) se seleccionó para investigar la actividad de estos AMP frente a varias cepas de estreptococos orales normalmente comensales y *Lactobacillus casei*, así como el organismo gram-negativo oral *V. atypica* (Tabla 9). Los resultados de MIC indican que estas secuencias eran activas, pero en una menor medida que la observada con *S. mutans*, frente a *Streptococcus gordonii*, *L. casei*, y *Streptococcus sanguinis*. Todos los precios examinados por lo general solo eran débilmente activos frente a *Streptococcus mitis*. *V. atypica* parecía más susceptible a α-11 que las otras bacterias sometidas a ensayo pero era más resistente a los péptidos 2C-3 y 2C-4 de la biblioteca de RW.
- 10

Tabla 9. Las MIC de péptidos seleccionados frente a aislados orales que no son de *S. mutans*

Péptido	MIC (µg/ ml)				
	<i>S. gordonii</i> Challis DL1	<i>S. mitis</i> ATCC 903	<i>S. sanguinis</i> NY101	<i>L. casei</i> ATCC 4646	<i>V. atypica</i> PK1910
B-33	32	32	32	32	16
B-34	32	64	16	16	32
B-38	32	64	64	32	64
α-11	16	32	16	16	4
2C-3	32	32	16	16	64
2C-4	32	32	32	32	64
FBα-20	16	32	16	8	8
FBRW-14	32	64	16	8	8
FBRW-15	32	64	16	16	8
FBRW-16	64	64	16	16	8
FBRW-22	16	64	8	8	8
FBRW-24	32	64	16	8	16

Discusión

En Estados Unidos, la elevada carga financiera asociada con el tratamiento de la caries dental, especialmente entre poblaciones sin privilegios y minoritarias Anderson y Shi (2006) *Pediatr. Dent.*, 28: 151-153; discusión 192-198; Instituto Nacional de la Salud (2000) *Salud oral en América: un informe del Cirujano General*, Departamento de salud y Servicios Humanos, Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneofacial, Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, MD; Departamento de Salud del Estado de Washington (2002) *Enfermedades Infecciosas - Caries Dental*, Departamento de Salud del Estado de Washington, Olympia, WA), se podría aliviar con regímenes de higiene dental complementados con agentes terapéuticos anti-*S. mutans* más eficaces. Por consiguiente, los resultados presentados aquí sugieren que los péptidos con una fuerte actividad frente a *S. mutans* se pueden identificar mediante identificación sistemática de bibliotecas pequeñas diseñadas de forma racional. De forma interesante, los péptidos más activos derivados en este estudio parece que tienen una cierta actividad frente a otras bacterias orales gram-positivas, aunque se necesitan más datos para evaluar totalmente si las características hidrofóbicas y anfipáticas de esta secuencia son indicativas de actividad bacteriana anti-gram-positiva general. Dado que *S. mutans* normalmente crece en un estado de biopelícula *in vivo*, los inventores también se animaron a encontrar que todos los péptidos de la Tabla 9 presentaban actividad frente a biopelículas de *S. mutans in vitro* cultivadas en placas de vidrio en presencia de sacarosa (los datos no se muestran).

Para las bibliotecas binaria y de hélice α , los resultados indican que la actividad máxima de *S. mutans* se producía en péptidos tanto con hidrofobicidad relativamente elevada como con carga positiva neta superior a +3. Se observaron niveles intermedios de actividad para péptidos cuyas propiedades estaban dominadas por cualquier rasgo individual. Estos resultados son coherentes con lo que se sabe de la mayoría de los AMP sintéticos y naturales con carácter anfipático catiónico sugieren que B-33, α -7, y las otras secuencias de péptidos activos en estas bibliotecas pueden comportarse de una manera similar a la de otros AMP dentro de esta clase estructural; es decir, se cree que la carga positiva del péptido es necesaria para la atracción de AMP a membranas bacterianas aniónicas, mientras que la anfipaticidad es necesaria para la interacción de membrana, transición de hélice, y eliminación celular (Jing *et al.* (2003) *J. Pept. Res.* 61: 219-229; Shai (2002) *Biopolimers* 66: 236-248). Estos resultados también indican que un valor de $\langle \text{Hélice} \rangle$ elevado, por sí mismo, puede no correlacionarse con el aumento de la actividad anti-*S. mutans* para los anfipáticos catiónicos.

Para la biblioteca de RW, como fue el caso con las bibliotecas binaria y de hélice α , las secuencias más hidrófobas y catiónicas eran las más activas (2C-3 y -4). A pesar de las diferencias de longitud y periodicidad en comparación con los péptidos en las otras bibliotecas, se cree que los péptidos de RW son capaces de ganar un aumento de la actividad para mejoras en la unión de péptido o inserción de membrana iniciales. Esto sería apoyado con la evidencia que indica que los péptidos ricos en Arg y Trp, a pesar de sus valores de $\langle \text{Hélice} \rangle$ bajos, forman disposiciones anfipáticas de tipo hélice estables después de la interacción de la membrana que se estabiliza mediante enlaces electrostáticos entre los electrones de H de Trp y el grupo funcional de Arg (Jing *et al.* (2003) *J. Pept. Res.* 61: 219-229; Mecozzi *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93: 10566-10571). Por lo tanto, las propiedades únicas de la secuencia de los péptidos de la biblioteca de RW pueden permitirles obtener estructuras secundarias que conducen en gran medida a actividad antimicrobiana.

De forma interesante, los resultados de los inventores indican que los péptidos de fusión, dímeros de AMP sintetizados como moléculas lineales individuales, a menudo presentan un aumento de la cinética de eliminación en comparación con sus péptidos precursores. Algunos péptidos de fusión pueden funcionar aumentando el número de unidades de formación de hélice por molécula en la superficie de la membrana, como se ha descrito para haces de AMP (Sawai *et al.* (2002) *Protein Eng.* 15: 225-232). Los datos no son claros con respecto al impacto de las regiones conectoras entre segmentos de AMP, aunque parece que las regiones conectoras pueden influir en los péptidos individuales de forma diferente (véanse los resultados para FRW-3 y FRW-9 en las Tablas 7 y 8). Los estudios están en vías de investigar directamente el impacto de la composición conectora en la actividad de AMP. Además, los resultados de los inventos sugieren que el efecto de la disposición constituyente (cuya subunidad de péptido de fusión va al extremo C o N) también es difícil de predecir (comparar las MIC de FB α -12 y FB α -20), aunque otro trabajo ha demostrado que parece que los AMP formadores de hélice anfipáticos y supuestos son más tolerantes a las adiciones N-terminales por razones que no quedan claras (Eckert *et al.* (2006) *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1480-1488; Szytnol *et al.* (2006) *Chem. Bio. Drug Des.*, 67: 425-431).

En conclusión, los resultados de los inventores indican que parece que *S. mutans* es susceptible a péptidos con una hidrofobicidad y carga catiónica relativamente elevadas, que se aislaron fácilmente de las bibliotecas restringidas de los inventores. Además, los péptidos de fusión creados a partir de secuencias activas conjuntas dentro de y entre estas bibliotecas aumentaban la cinética de eliminación de estos péptidos.

Ejemplo 2

Actividad de péptidos de Biblioteca activada con Ácido.

Los restos de histidina tienen un pKa de la cadena lateral cercano a 6,0, y por lo tanto portan una carga catiónica a pH 6,0 e inferior, pero no a pH neutro. Los inventores crearon la Biblioteca activada con Ácido con esta

- característica en la mente, de modo que resultaría una disposición formadora de hélice, anfipática (que conduce a actividad anti-*S. mutans*) en un entorno de pH bajo (tal como la creada mediante *S. mutans* en una lesión de caries), pero los péptidos permanecerían inactivos a pH superior a 6,0. Validando esta hipótesis, se encontró que la mayoría de las secuencias en esta biblioteca tienen una fuerte actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* a pH 4,9, pero eran inactivas a pH 7,4 (Tabla 6). Los péptidos de esta biblioteca no se seleccionaron para estudio adicional durante este estudio.

Tabla 6: MIC de péptidos de biblioteca activada con ácido frente a *S. mutans*.

Péptido	Secuencia	SEC ID N°:	MIC (µM)	
			pH 7,4	pH 4,9
AA-1 ⁺	HHFFHHFFHHFFHHF*	24 ⁺	> 125	12,5
AA-2 ⁺	FHHFFHHFFHHFFHHF*	25 ⁺	> 125	3,125
AA-3 ⁺	KLLKGATFHFFHHFFHHFFHHF	26 ⁺	> 125	6,25
AA-4 ⁺	KLLKFHFFHHFFHHFFHHF	27 ⁺	> 125	3,125
AA-5 ⁺	FHHFFHHFFHHFFHHFKLLK	28 ⁺	> 125	28,125
AA-6	FHYFWHWFHRF	29	125	> 50
AA-7	LYHFLHWFQRF	30	125	> 50

* representa extremo C amidado; ⁺ representa secuencia de aminoácidos de la invención

10 Ejemplo Comparativo 3

Actividad de la Biblioteca N° 7 de Péptido de Eliminación:

- Los péptidos dentro de la Biblioteca N° 7 de Eliminación (Tabla 7), se diseñaron para que fueran pequeños, hidrófobos, y para que tuvieran un carácter catiónico débil con respecto a las otras bibliotecas que se describen en el presente documento. Algunos estudios de MIC frente a *S. mutans* revelaron que muchas de las secuencias dentro de esta biblioteca no eran activas o eran débilmente activas. S6L1-5 presentaba una actividad moderada. No se seleccionaron péptidos de esta biblioteca para estudio adicional.

20 Tabla 7: Biblioteca de Eliminación de Péptido N° 7.

Péptido	Secuencia	SEC ID N°:	MIC (µg/ml)		
			<i>S. mutans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
S6L1-2	LKQKLKILF*	31	125	> 500	> 500
S6L1-3	LKQLKAGIY*	32	> 500	> 500	250
S6L1-4	VGKCVKLLY*	33	125	500	250
S6L1-5	KFVKLI LAY*	34	32	> 500	92
S6L1-6	KLVKLVFLY*	35	125	> 500	> 500
S6L1-7	IKVFAKQKY*	36	> 500	> 500	> 500
S6L1-8	RFRHFQERY*	37	64	125	> 500

* representa extremo C amidado

Ejemplo Comparativo 4

Actividad de péptidos de Biblioteca de Beta-supresión

- 25 Los péptidos hidrófobos y catiónicos encontrados dentro de esta biblioteca se redujeron sistemáticamente de 15 aminoácidos a 7, para dar un gradiente de tamaño físico a la vez que mantenían los parámetros de hidrofobicidad y

5 carga generalmente estables. Los inventores observaron que varias de las secuencias dentro de esta biblioteca presentaban actividad anti-*S. mutans* porque tal como se evalúa con MIC (Tabla 8). Las secuencias activas incluían péptidos de tamaños variables, aunque los datos de los inventores indican que para la actividad son necesarios al menos 9 restos. Los inventores también encontraron que los péptidos en esta biblioteca por lo general no eran activos al organismo Gram-negativo examinarlo, *Pseudomonas aeruginosa*, pero presentaban actividad frente a otras varias bacterias Gram-positivas. Estos péptidos no se seleccionaron para un aumento adicional durante este estudio.

Tabla 8: Biblioteca de Beta-supresión

Péptido	Secuencia	MIC (µg/ml)				
		<i>E. faecalis</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. mutans</i>
S3L8-1	FVFRHKVWVKHRFLF (SEC ID N°: 38)	32	62,5	> 125	> 125	16
S3L8-2	VFI VVVKHVLVLF (SEC ID N°: 39)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	N/D
S3L8-3	WRWRARWRWRLRWF (SEC ID N°: 40)	8	16	16	> 125	4
S3L8-4	WRIHLRARLHVKFRF (SEC ID N°: 41)	8	8	62,5	> 125	N/D
S3L8-5	LRIHARFKVHIRLKF (SEC ID N°: 42)	12	8	> 125	> 125	60
S3L8-6	FHIKFRVHLKVRHFH (SEC ID N°: 43)	> 125	8	> 125	> 125	N/D
S3L8-7	FHVKIHFRLHVKFHF (SEC ID N°: 44)	> 125	16	> 125	> 125	N/D
S3L8-8	LHIHAHFHVHIHLHF (SEC ID N°: 45)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	N/D
S3L8-9	FKIHFRVHLKVRHFH (SEC ID N°: 46)	> 125	8	> 125	> 125	N/D
S3L8-10	FKAHFRVHLKVRHFH (SEC ID N°: 47)	> 125	8	> 125	> 125	N/D
S3L8-11	LKAKIKFKVCLKIKF (SEC ID N°: 48)	39	3	125	32-62,5	8
S3L8-12	WIWKHKFLHRHFLF (SEC ID N°: 49)	125	> 62,5	> 125	> 125	125
S3L8-13	VFLHRHVIVKHKLVF (SEC ID N°: 50)	125	> 62,5	> 125	> 125	N/D
S3L8-14	FLHKHVLRRHIVF (SEC ID N°: 51)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	N/D
S3L8-15	VFKHKIVHRHILF (SEC ID N°: 52)	125	> 62,5	> 125	> 125	31
S3L8-16	FLFKHLFLHRIFV (SEC ID N°: 53)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-17	LFKHILHRVIF (SEC ID N°: 54)	125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-18	FLHKHLFKHKLF (SEC ID N°: 55)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-19	VFRHRFVHRHVF (SEC ID N°: 56)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-20	FIHKLHVHKVLF (SEC ID N°: 57)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125

ES 2 548 767 T3

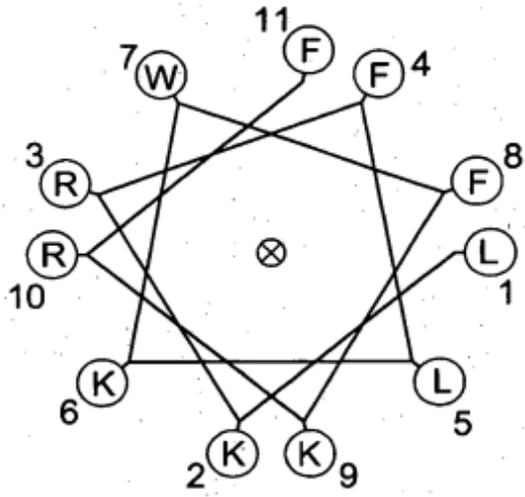
Péptido	Secuencia	MIC (µg/ml)				
		<i>E. faecalis</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. mutans</i>
S3L8-21	VLRHLFRHRIVF (SEC ID N°: 58)	93,5	> 62,5	> 125	> 125	60
S3L8-22	LVHKLILRHLLF (SEC ID N°: 59)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-23	VFKRVLHKLIF (SEC ID N°: 60)	32	62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-24	IVRKFLFRHKVF (SEC ID N°: 61)	32	62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-25	VLKHVIAHKRLF (SEC ID N°: 62)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-26	FIRKFLFKHLF (SEC ID N°: 63)	24	16	62,5	> 125	16
S3L8-27	VIRHVWVRKLF (SEC ID N°: 64)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	60
S3L8-28	FLFRHRFRHRLVF (SEC ID N°: 65)	62,5	> 62,5	> 125	> 125	60
S3L8-29	LFLHKHAKHKFLF (SEC ID N°: 66)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-30	FKHKFKHKFIF (SEC ID N°: 67)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-31	LRHRLRHRLIF (SEC ID N°: 68)	125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-32	LILKFLFKVF (SEC ID N°: 69)	16	16	16	> 125	31
S3L8-33	VLIRILVRVIF (SEC ID N°: 70)	16	16	125	> 125	> 125
S3L8-34	FRHRFRHRF (SEC ID N°: 71)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-35	LKHKLKHKF (SEC ID N°: 72)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-36	FKFKHKLIF (SEC ID N°: 73)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-37	LRLRHRVLF (SEC ID N°: 74)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-38	FKFLFKFLF (SEC ID N°: 75)	> 125	32	> 125	> 125	> 125
S3L8-39	LRLFLRWLF (SEC ID N°: 76)	32	16	16	> 125	16
S3L8-40	FKFLFKHKF (SEC ID N°: 77)	62,5	62,5	> 125	> 125	30
S3L8-41	LRLFLRHRF (SEC ID N°: 78)	62,5	> 62,5	> 125	> 125	16
S3L8-42	FKFLFKF (SEC ID N°: 79)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125
S3L8-43	LRLFLRF (SEC ID N°: 80)	> 125	> 62,5	> 125	> 125	> 125

REIVINDICACIONES

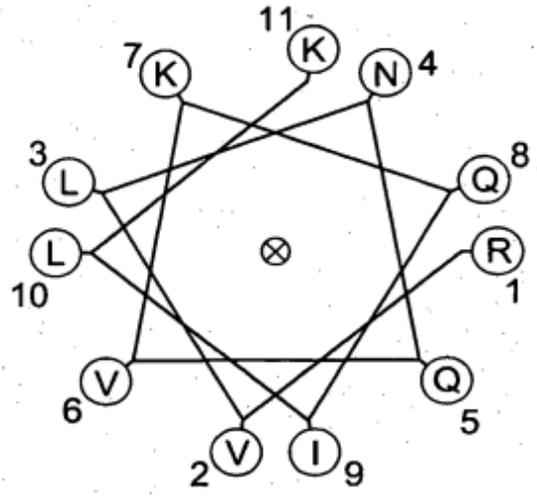
1. Un péptido antimicrobiano activado con ácido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en HHHFHHFHHFFHHF (SEC ID N°: 109) (AA-1), FHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 110) (AA-2), KLLKGATFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 111) (AA-3), KLLKFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 112) (AA-4), y FHFFHHFFHHFFHHFKLLK (SEC ID N°: 113) (AA-5), donde dicho péptido muestra mayor actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* a pH 4,9 que a pH 7,4.
2. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho péptido porta uno o más grupos protectores.
3. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho péptido porta uno o más grupos protectores seleccionados entre el grupo que consiste en acetilo (Ac), amida, un grupo alquilo con 3 a 20 carbonos, Fmoc, Tmoc, grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenocarboxílico, grupo 9-fluorenona-1-carboxílico, benciloxicarbonilo, Xantilo (Xan), Tritilo (Trt), 4-metiltritilo (Mtt), 4-metoxitritilo (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), Mesitileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibenzhidrido (Mbh), Tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencilo (MeBzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), Benciloxi (BzIO), Bencilo (Bzl), Benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimentil-2,6-diaxociclohexilid)etilo (Dde), 2,6-diclorobencilo (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), Benciloximetilo (Bom), t-butoxi-carbonilo (Boc), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-Butilo (tBu), y Trifluoroacetilo (TFA).
4. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido comprende la secuencia HHHFHHFHHFFHHF (SEC ID N°: 109) (AA-1).
5. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia HHHFHHFHHFFHHF (SEC ID N°: 109) (AA-1).
6. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido comprende la secuencia FHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 110) (AA-2).
7. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia FHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 110) (AA-2).
8. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido comprende la secuencia KLLKGATFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 111) (AA-3).
9. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia KLLKGATFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 111) (AA-3).
10. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido comprende la secuencia KLLKFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 112) (AA-4).
11. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia KLLKFHFFHHFFHHFFHHF (SEC ID N°: 112) (AA-4).
12. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido comprende la secuencia FHFFHHFFHHFFHHFKLLK (SEC ID N°: 113) (AA-5).
13. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la secuencia de aminoácidos de dicho péptido consiste en la secuencia FHFFHHFFHHFFHHFKLLK (SEC ID N°: 113) (AA-5).
14. Una formulación farmacéutica que comprende un péptido antimicrobiano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, donde:
- (i) dicha formulación es una formulación de dosificación unitaria; o
 - (ii) dicho excipiente es aceptable para administración a una mucosa oral.
16. Un producto para el cuidado de la salud que comprende un péptido antimicrobiano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde dicho péptido antimicrobiano está contenido en un producto seleccionado entre el grupo que consiste en pasta de dientes, enjuague bucal, una tira o solución de blanqueado de dientes, un almacenamiento de lentes de contacto, solución humectante o de limpieza, hilo dental, un palillo de dientes, una cerda de cepillo de dientes, una pulverización oral, una pastilla para chupar oral, una pulverización nasal, un pulverizador para aplicación oral y/o nasal, y un apósito

para heridas.

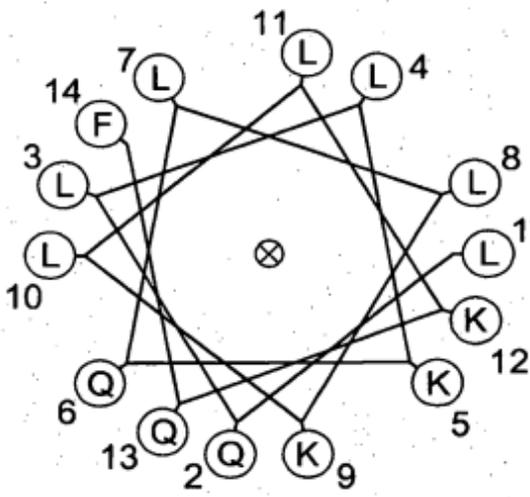
17. Un péptido antimicrobiano de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para uso en un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una bacteria, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha bacteria con una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento y/o proliferación de dicha bacteria.
- 5



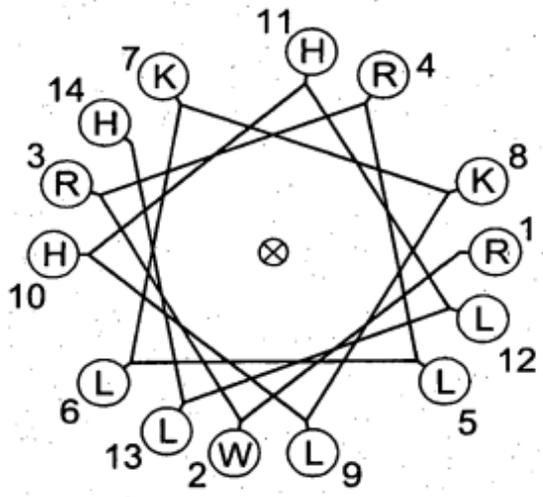
B-34



B-60



α -7



α -11

Fig. 1

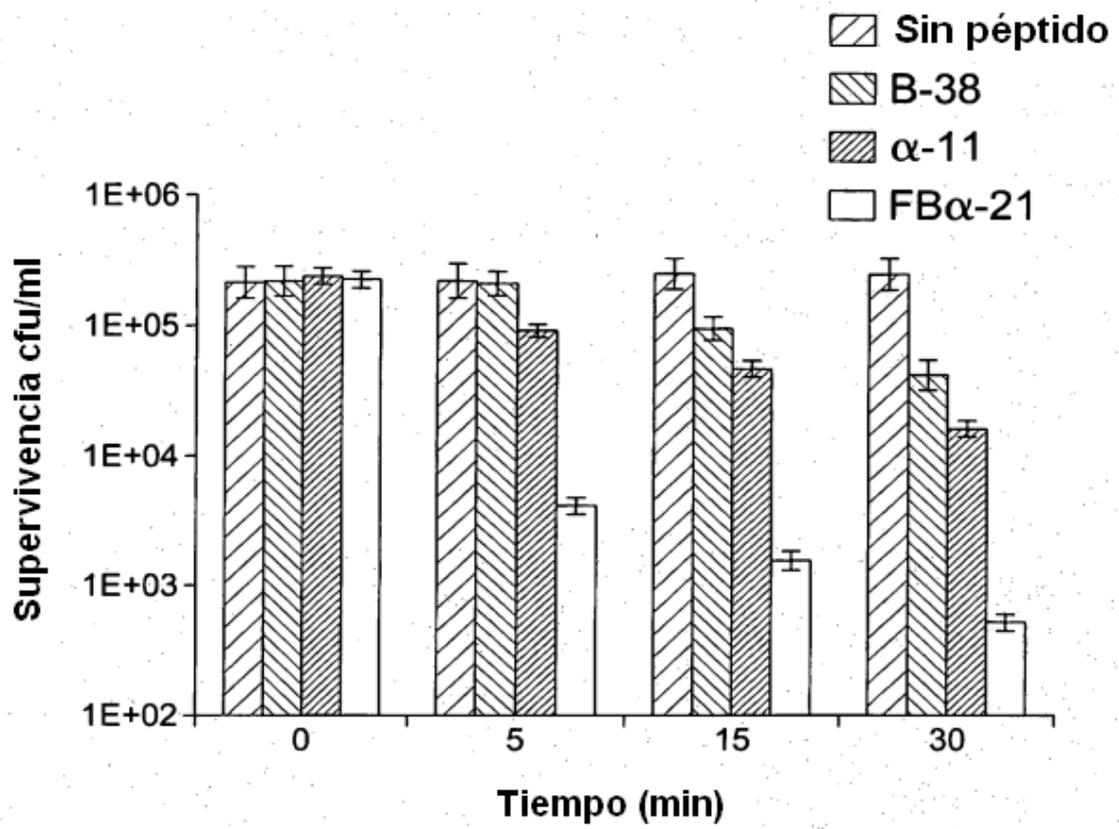


Fig. 2a

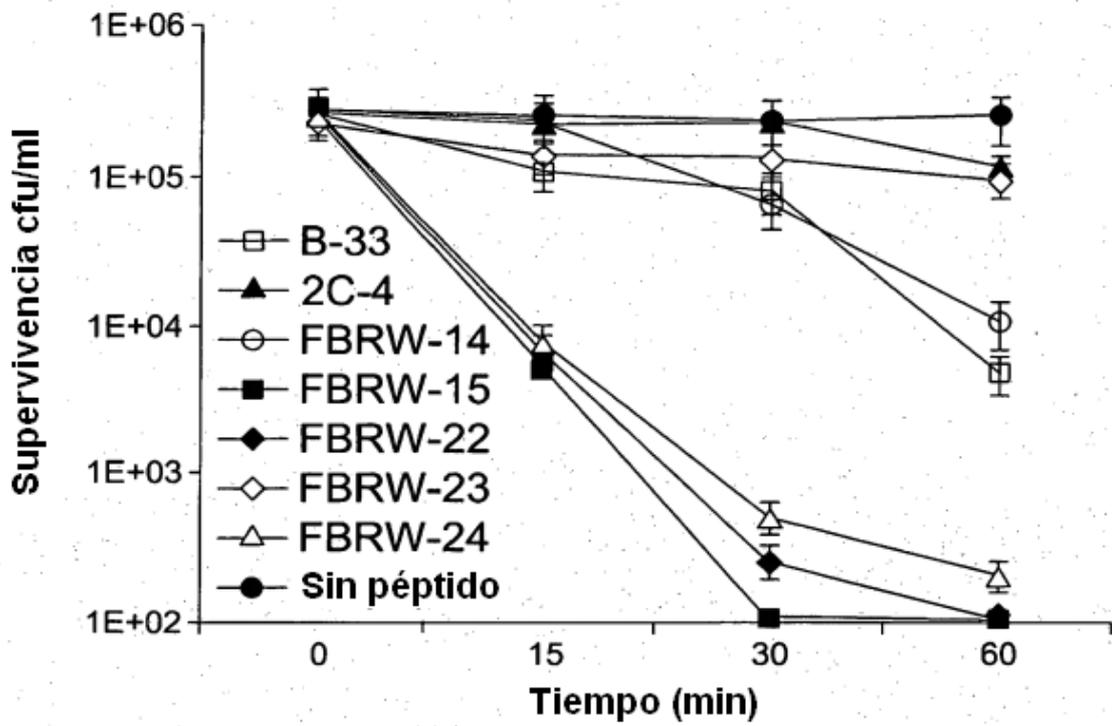


Fig. 2b