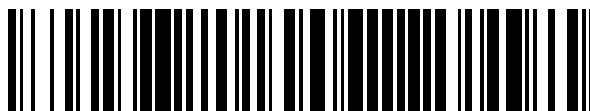


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 857**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/03 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2006 E 06804228 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1957094**

54 Título: **Péptidos de unión a calcio**

30 Prioridad:

28.09.2005 US 722071 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2015

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR
OAKLAND, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**YARBROUGH, DANIEL;
SHI, WENYUAN;
HAGERMAN, ELIZABETH;
TETRADIS, SOTIRIOS;
QI, FENGXIA;
HE, JIAN;
RUTHERFORD, BRUCE;
ECKERT, RANDAL y
WU, BEN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 549 857 T3

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

Descripción

Péptidos de unión a calcio

5 Referencia cruzada con aplicaciones relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 60/722.071, presentada el 28 de septiembre de 2005.

10 Antecedentes

Los compuestos que se unen específicamente a las superficies calcificadas incluyen pequeñas moléculas fluorescentes tales como tetraciclina, calceína, y alizarina, y grandes proteínas de unión a calcio tales como fosfoproteína de dentina (DPP, frecuentemente denominado fosfoforina) y amelogenina. DPP es una de las principales proteínas no colágenas encontradas en la matriz extracelular de la dentina y se ha implicado durante mucho tiempo en la nucleación de hidroxiapatita (HA) durante la mineralización de la dentina (Lee 1980; Lussi 1988; Veis 1998; Hao 2004). DPP humana se deriva de la escisión proteolítica de sialofosfoproteína de dentina (DSPP). DPP humana es una proteína altamente flexible (Cross, 2005), altamente fosforilada (Lee 1980) que consiste principalmente de un gran número de repeticiones de aminoácidos Asp-Ser-Ser (sec. con núm. de ident.:1) (Gu 2000). Las características bioquímicas de DPP se han investigado ampliamente. Estas investigaciones han revelado que DPP inmovilizada provoca aumentos marcados en la velocidad de nucleación hidroxiapatita, aunque este efecto no se ve con DPP en solución o con DPP desfosforilado. Adicionalmente, altas concentraciones de DPP se han mostrado que inhiben el crecimiento de cristales de HA (Lussi 1988; Veis 1998; Saito 2000). Se mostró además que especialmente el dominio carboxilo-terminal de fósforo contiene repeticiones de triplete de aminoácidos (DSS) extendidas que forman protuberancias de interacción carboxilo fosfato ordenadas. Estos tripletes se consideran que se involucran en aspectos de mineralización de la matriz extracelular (George, 1996). Además, los polipéptidos derivados de fosfatonina se mostraron que modulan el metabolismo del fosfato en los humanos y son útiles en el tratamiento de enfermedades minerales óseas y renales (US 6.679.900 B2). Los péptidos que comprenden un motivo de aminoácido de "PG", "GP", "PI" e "IG" (P es prolina o hidroxiprolina) y hasta 120 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de este, se mostraron que estimulan el desarrollo, mantenimiento y reparación de hueso, cartílago y tejido conectivo asociado (US 2005/0288229).

Resumen

En ciertas modalidades, se proporciona una composición que incluye uno o más péptidos de unión a calcio. Estos péptidos de unión a calcio comprenden la secuencia de repetición de tres aminoácidos (X-Y-Z)_n, en donde X es el ácido aspártico, Y y Z serina, fosfoserina, o fosfotreonina, y n es un número de 3 y 15, y en donde dichos péptidos de unión a calcio se unen a fosfato de calcio. En ciertas de estas modalidades, los péptidos de unión a calcio comprenden 3 a 15 repeticiones de tres aminoácidos (es decir, n = 1-40), y tienen una longitud de hasta 100 aminoácidos. En algunas de estas modalidades, n es un número de 3 a 8. En ciertas modalidades, X es ácido aspártico, Y y Z son serina. En algunas de estas modalidades, los péptidos de unión a calcio pueden tener la secuencia de aminoácidos que se expone en cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 13-15.

En ciertas modalidades, los péptidos de unión de calcio proporcionados en la presente descripción se puede enlazar a uno o más conjugados o porciones. En algunas de estas modalidades, el conjugado o porción es un marcador detectable, tal como por ejemplo un fluoróforo, cromóforo, etiqueta de afinidad, etiqueta de antígeno, marcador radioactivo, o marcador de espín. En otras ciertas modalidades, el conjugado o porción es un péptido, proteína, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, compuesto orgánico, compuesto inorgánico, o un compuesto organometálico. En otras ciertas modalidades, el conjugado o porción es un agente terapéutico, tal como por ejemplo un agente o compuesto anticáncer o antimicrobiano. En ciertas de estas modalidades en donde el conjugado o porción es un agente antimicrobiano, el agente antimicrobiano puede ser una secuencia peptídica antimicrobiana. En ciertas modalidades, el conjugado o porción puede estar relacionado con los péptidos de unión a calcio a través de un enlazador de aminoácidos.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones para el uso al tratar un defecto del diente caracterizado por desmineralización del diente en un sujeto administrando una composición que comprende los péptidos de unión a calcio descritos en la presente. Como se describe en la presente, la administración de estos péptidos de unión a calcio es capaz de inducir la remineralización de las superficies de los dientes.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones para el uso al tratar un defecto del hueso caracterizado por desmineralización del hueso o densidad del hueso disminuida en un sujeto administrando una composición que comprende los péptidos de unión a calcio descritos en la presente. Como se describe en la presente, la administración de estos péptidos de unión a calcio es capaz de inducir la remineralización de las superficies de los huesos y aumentar la densidad del hueso.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones para el uso al identificar un defecto del diente caracterizado por

la desmineralización del diente en un sujeto administrando una composición que comprende los péptidos de unión a calcio descritos en la presente, en donde los péptidos se conjugan a un marcador detectable, y después detectando este marcador ya sea a simple vista o usando un dispositivo de detección. Como se describe en la presente, estos péptidos de unión a calcio son capaces de selectivamente o preferentemente unir porciones del diente que exhiben desmineralización.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones para el uso al identificar un defecto óseo caracterizado por la desmineralización del hueso en un sujeto administrando una composición que comprende los péptidos de unión a calcio descritos en la presente, en donde los péptidos se conjugan a un marcador detectable, y después, detectando este marcador ya sea a simple vista o usando un dispositivo de detección. Como se describe en la presente, estos péptidos de unión a calcio son capaces de selectivamente o preferentemente unir porciones de los huesos que exhiben desmineralización.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones para el uso al identificar la calcificación en un sujeto en tejido distinto de los huesos o dientes administrando una composición que comprende los péptidos de unión al calcio descritos en la presente, en donde los péptidos se conjugan a un marcador detectable, y después detectando este marcador ya sea a simple vista o usando un dispositivo de detección. Como se describe en la presente, estos péptidos de unión a calcio son capaces de unir calcio y oxalato de calcio. Las calcificaciones que se pueden identificar usando este método incluyen, por ejemplo, placa arterial, cálculos renales y sesamoideos. En ciertas modalidades, los péptidos se pueden usar para tratar estas calcificaciones inadecuadas, por ejemplo mediante la conjugación de los péptidos con una porción terapéutica y usando los péptidos para orientar la porción terapéutica al sitio de la calcificación.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente para el uso al tratar defectos de los dientes caracterizados por la desmineralización del diente o defectos de los huesos caracterizados por la desmineralización del hueso. En ciertas modalidades, estas composiciones se pueden usar para detectar o diagnosticar defectos de los huesos o de dientes caracterizados por la desmineralización.

Se describen estuches que contienen una composición que comprende los péptidos de unión a calcio descritos en la presente. En ciertas de estas modalidades, los estuches incluyen instrucciones para el uso o administración. En ciertas modalidades, estos estuches se pueden usar para tratar defectos de los dientes caracterizados por la desmineralización del diente o defectos de los huesos caracterizados por la desmineralización del hueso. En ciertas modalidades, estas composiciones se pueden usar para detectar o diagnosticar defectos de los dientes o huesos caracterizados por desmineralización,

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Afinidades de unión de péptidos DSS y variantes DSS para hidroxiapatita y superficies de los dientes. A-C. Los péptidos marcados con fluoresceína en concentraciones en el intervalo de 0-100 μM se incubaron con 0,3 mg de nanocristales de hidroxiapatita (área de superficie específica = 100 m^2/g) durante diez minutos, seguido de la eliminación por centrifugación de la hidroxiapatita. La cantidad de péptido en la mezcla antes y después de la eliminación de hidroxiapatita se determinó por AbS_{480} . Las isotermas se representaron gráficamente y ajustaron a la ecuación de Langmuir para extraer los valores de K_A una constante que refleja la afinidad del péptido para la superficie de hidroxiapatita. D. Dientes humanos sagitalmente seccionados se incubaron con 12,5 μM de péptido 6DSS marcado con 5(6) carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.:14) durante diez minutos, seguido de enjuague. La unión del péptido a las superficies de los dientes se visualizó mediante Microscopía Confocal Láser de Barrido (CLSM) usando iluminación láser azul ($\lambda=488\text{ nm}$) y un filtro de emisión FITC. Lado izquierdo, región de color claro: dentina. Lado derecho, región de color oscuro: esmalte.

Figura 2: Unión de péptido 6DSS (sec. con núm. de ident.:14) a nódulos mineralizados de médula ósea de ratón (MBMNs). Cultivos de médula ósea de ratón se crecieron hasta confluencia, después se trataron durante tres semanas con 2,5 μM de péptido de control codificado o 2,5 μM de 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14). Los cultivos se fotografiaron por microscopía de fluorescencia usando un conjunto de filtros FITC. A. Imagen de campo brillante de MBMNs mineralizados de un cultivo tratado con 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14). B. Imagen de fluorescencia del campo que se muestra en (A). La tinción fuerte (coloración clara) de la masa del nódulo central indica la unión por el péptido 6DSS marcado fluorescentemente (sec. con núm. de ident.:14). C. Imagen de campo brillante de MBMNs mineralizados del cultivo tratado con el péptido de control codificado. D. Imagen de fluorescencia del campo que se muestra en (C), que ilustra tanto la falta de unión del péptido de control a MBMN's y la falta de autofluorescencia dentro de la muestra.

Figura 3: Interacción de péptido 8DSS inmovilizado (sec. con núm. de ident.:15) con CaHPO_4 . Las perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina se incubaron con 8DSS conjugado con biotina (sec. con núm. de ident.: 15) (A y C) o no conjugado con biotina (B) y (D). Las perlas se lavaron e incubaron en una solución de PBS+ 1 mM CaCl_2 +1 mM NaH_2PO_4 durante doce días antes de la imagen. A. Micrografías de campo brillante de agregados de fosfato de calcio amorfo que se acumula alrededor de las perlas recubiertas con DSS. Todos los agregados de fosfato de calcio de tamaño significativo se asociaron con una o más perlas. B. Imagen de campo brillante de perlas representativas

bloqueadas con biotina (sin péptido DSS). Ninguna cantidad significativa de precipitado se asoció con estas perlas. C. Micrografía de contraste de fase de una perla recubierta con DSS con una acumulación más ordenada de fosfato de calcio alrededor de su exterior (tenga en cuenta el centro esférico del objeto). Estos objetos no se observaron en las muestras de control (bloqueado con biotina, sin péptido DSS), como se ilustra en (D). Barras de escala= 4 μ m.

Figura 4 Remineralización de las superficies de los dientes con péptidos DSS. Los dientes humanos extraídos se seccionaron sagitalmente y desmineralizaron con gel 19% EDTA durante 1 hora, seguido por inmersión en agua desionizada y ultrasonificación para eliminar el exceso de detritos. Las muestras se trataron como se indicó, fotografiaron después por Microscopía Electrónica de Barrido. Barras de escala=50 μ m. A. Muestras de control desmineralizadas. B. Tratadas con 8DSS (sec. con núm. de ident.:15) durante 1 hora, enjuagadas, y remineralizadas usando Desensibilizador Quell. C. Tratadas sólo con tampón, remineralizadas usando Desensibilizador Quell. D. Sin tratamiento, remineralizadas usando Desensibilizador Quell.

Figura 5 : Nucleación de hidroxiapatita en las superficies del esmalte (parte superior) y dentina (parte inferior). Las superficies se prepararon y trataron como se describe en el Ejemplo 6 y como se indica en las etiquetas, seguido por imagimática usando Microscopía Electrónica de Barrido. El grupo superior (dos filas de la parte superior) representa muestras de esmalte, mientras que el grupo inferior (dos filas de la parte inferior) representa muestras de dentina. Dentro de cada grupo, la fila de la parte superior representa muestras que no se desmineralizaron antes del tratamiento, y la fila de la parte inferior representa muestras que se desmineralizaron por tratamiento con ácido fosfórico. Micrografías Electrónicas de Barrido se muestran, barras de escala= 10 μ m. Columna de la izquierda: muestras que no se expusieron a ningún tratamiento antes de la nucleación y crecimiento de cristales. Columna del centro: muestras que se expusieron solo al tampón antes de la nucleación y crecimiento de cristales. Columna de la derecha: muestras que se expusieron a 12,5 μ M de péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) antes de la nucleación y crecimiento de cristales. El crecimiento de cristales indica principios de nucleación.

Figura 6: Especificidad de tejido de péptido de unión 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) y su dependencia en el estado de mineralización. Las muestra de dientes humanos desmineralizados y no desmineralizados se incubaron con 12,5 μ M de péptido 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15) como se describe en el Ejemplo 9, y las secciones se enjuagaron y fotografiaron por CLSM. El panel izquierdo muestra el patrón de unión del péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) al tejido desmineralizado. La unión principal es al esmalte desmineralizado (E) con poca unión a la dentina (D). El patrón opuesto se observa en la muestra no desmineralizada, donde la unión principal es a la dentina (D) con poca o ninguna unión al esmalte (E). La unión dentina-esmalte, marcada DEJ, se demarca claramente en ambos casos.

Figura 7: Mineralización del hueso. Fémures de rata se obtuvieron de animales sacrificados bajo un protocolo de tejido compartido. Las muestras se desmineralizaron, enjuagaron y ultrasonificaron para eliminar los detritos. Las muestras de prueba se trataron con péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) durante una hora, enjuagaron, remineralizaron usando Desensibilizador Quell como se describe en el Ejemplo 8, después, fotografiaron por Microscopía Electrónica de Barrido. Se muestran imágenes de SEM. Parte superior: muestra no tratada, que muestra la superficie del hueso completamente cubierta por mineral. Centro: Muestra desmineralizada, que muestra canales Haversianos expuestos por la eliminación de la capa mineral. Parte inferior: Hueso tratado con 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) y Desensibilizador Quell (una solución acuosa de $\text{CaCl}_2/\text{K}_2\text{HPO}_4$), que muestra restablecimiento de la capa mineral.

Figura 8 : Micrografías de fluorescencia que muestran especificidad de tejido en la unión de los péptidos y variantes DSS. Dientes adultos humanos se expusieron a 12,5 μ M de péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína y sin desmineralización, lavaron extensamente, y fotografiaron por CLSM. Para cada sección, múltiples exploraciones se recogieron y reunieron en un modo automatizado para generar paneles de imágenes que representan un área de 13x13 mm, suficiente en la mayoría de los casos para abarcar toda la sección. Los péptidos usados para cada sección se marcaron debajo de cada panel (8DSS= sec. con núm. de ident.:15, 8ASS= sec. con núm. de ident.: 21, 8DAA= sec. con núm. de ident.: 22, 8NAA = sec. con núm. de ident.:23, 6DSS = sec. con núm. de ident.: 14, 4DSS= sec. con núm. de ident. 13, 4ESS= sec. con núm. de ident.: 16, 4NSS= sec. con núm. de ident.: 20, 4DTT= sec. con núm. de ident.: 17, 4ETT= sec. con núm. de ident.: 19, 4NTT= sec. con núm. de ident.: 18), y dentro de cada panel el diente se orienta con la raíz hacia la parte superior de la imagen y la corona hacia la parte inferior. Las capas de tejido se marcan como sigue: RTD = Dentina punta de la raíz; CPD = Dentina Circumpulpar; MD=Dentina del Manto; P=Pared de la Cavity de la Pulpa; DEJ=Unión Dentina-Esmalte; E=Esmalte; BE=Esmalte Basal; EC=Esmalte Cortical ; CL =Lesión de Caries; PB= Hueso Periodontal.

Figura 9: Micrografías de fluorescencia que muestran la unión específica de péptidos DSS y variantes (4ESS=sec. con núm. de ident.: 16, 4NSS= sec. con núm. de ident.: 20, 8DAA= sec. con núm. de ident.: 22, 8NAA= sec. con núm. de ident.: 23, 4ETT= sec. con núm. de ident.: 19, 4DSS= sec. con núm. de ident.: 13, 8ASS= sec. con núm. de ident.: 21, 8DSS= sec. con núm. de ident.: 15, 6DSS= sec. con núm. de ident.: 14) para las lesiones de caries en los dientes. Dientes humanos adultos se expusieron a 12,5 μ M de péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína sin desmineralización, se lavaron extensivamente, y fotografiaron por CLSM. Ajustes del microscopio y de la cámara se optimizaron por separado para cada muestra. Cada panel muestra una región de la sección del diente que abarca una

lesión de caries. Huellas blancas en la parte derecha de cada panel identifican la posición de la superficie del diente, mientras que las flechas indican la posición de la lesión teñida.

Figura 10: Niveles relativos de la unión del péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.:15) a varios precipitados de fosfato inorgánico. 100 mM de fosfato de sodio (pH 7,5) se combinó con soluciones de 100 mM de $MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, y $SrCl_2$, respectivamente. Las suspensiones se hicieron de cada sal de fosfato a una concentración de aproximadamente 0,5% (p/v) en presencia de 12,5 μM de péptido 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15). Después de una incubación de diez minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron y fotografiaron por microscopía de fluorescencia. La intensidad de la tinción fluorescente de las partículas de fosfato inorgánico en cada muestra se evaluó mediante la medición de los valores de intensidad píxel usando el GIMP (www.gimp.org) como se describe en el Ejemplo 11. Los valores normalizados de fluorescencia se representan aquí. En el eje X, se identifican varios precipitados de fosfato inorgánico. En el eje Y, se representan los valores de intensidad de fluorescencia relativa.

Figura 11: Unión del péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) a oxalato de calcio. Los cristales de oxalato de calcio se expusieron a 12,5 μM de péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15), se lavaron, y fotografiaron por microscopía de fluorescencia como se describe en el Ejemplo 12. El lado izquierdo de la figura muestra cristales de oxalato de calcio sin teñir. La imagen de campo brillante (parte superior) confirma la presencia de cristales, mientras que la imagen de fluorescencia de la misma región (parte inferior) confirma que el oxalato de calcio tiene fluorescencia no visible bajo estas condiciones. La parte derecha de la figura muestra cristales de oxalato de calcio teñidos con el péptido 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15). La imagen de campo brillante (parte superior) confirma la presencia de cristales, y la imagen de fluorescencia de la misma región (parte inferior) muestra la tinción brillante de los cristales por el péptido marcado.

Descripción detallada

La siguiente descripción de la invención es meramente destinada a ilustrar varias modalidades de la invención. Como tal, las modificaciones específicas discutidas no se deben interpretar como limitaciones en el alcance de la invención. Resultarán evidentes para aquel con experiencia en la técnica que varios equivalentes, cambios y modificaciones pueden hacerse sin apartarse del alcance de la invención.

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se usan en la presente descripción: BE, esmalte basal; CE, esmalte cortical; CL, lesión de caries; CLSM, microscopía confocal láser de barrido; CPD, dentina circumpulpa; D, dentina; DEJ, unión dentina-esmalte; DPP, fosfoproteína de dentina; E, esmalte; DSPP, sialofosfoproteína de dentina; HA, hidroxiapatita; MD, dentina del manto; MIC concentración inhibitoria mínima; P, pared de la cavidad pulpar; PB, hueso periodontal; SEM, microscopía electrónica de barrido; RTD, dentina punta de la raíz; λ , longitud de onda de excitación.

Los aminoácidos se abrevian usando el sistema estándar que se expone más abajo. Abreviatura de Aminoácido Una letra Tres letras:

	Abreviatura
	Alanina A Ala
	Arginina R Arg
45	Asparagina N Asn
	Ácido aspártico D Asp
	Cisteína C Cys
	Ácido glutámico E Glu
	Glutamina Q Gln
50	Glicina G Gly
	Histidina H His
	Isoleucina I Ile
	Leucina L Leu
	Lisina K Lys
55	Metionina M Met
	Fenilalanina F Phe
	Fosfoserina SP Sep
	Prolina P Pro
	Serina S Ser
60	Treonina T Thr
	Triptófano W Trp
	Tirosina Y Tyr
	Valina V Val

A menos que se indique de cualquier otra forma por un prefijo "D", por ejemplo, D-Ala, la estereoquímica del carbono alfa de los aminoácidos y residuos aminoácido en los péptidos descritos en la presente descripción es la configuración natural o "L".

5 Péptidos de unión a calcio

Los compuestos actualmente disponibles para la remineralización directa de tejidos descalcificados consisten principalmente de varias formulaciones de fosfato de calcio y/o fluoruro de sodio libre o unido a proteínas. La mejora de la calcificación en los tejidos biológicos generalmente se logra mediante la manipulación de la señalización celular en las células precursoras de los huesos y dientes, o mediante el aumento de la concentración total de calcio usando alimentos fortificados con calcio, suplementos dietéticos, u otros tratamientos ricos en calcio libre o unido a proteína. Estudios anteriores han descrito una formulación que recluta fosfato de calcio a la superficie del diente para mejorar la remineralización (ver patente de los EE.UU. núm. 6.780.844). Sin embargo, no se ha demostrado el aumento de la calcificación por la orientación directamente y específicamente de calcio a las superficies.

Se describen en la presente una serie de pequeños péptidos de unión a calcio formados por variaciones del motivo Asp-Ser-Ser sec. con núm. de ident.:1) encontrado en DPP. Estos péptidos se han mostrado que se unen fuertemente y específicamente a las superficies de fosfato de calcio. Adicionalmente, estos péptidos han mostrado que reclutan fosfato de calcio a dichas superficies y que sirven como porciones de unión para la fijación de etiquetas fluorescentes a superficies calcificadas independientemente de su estado de fosforilación.

Los péptidos descritos en la presente, denominados generalmente como péptidos DSS, se componen de varios números y/o combinaciones de los tres aminoácidos del motivo Asp-Ser-Ser (sec. con núm. de ident.:1) de DPP o variaciones de estos. Ejemplos de tres repeticiones de aminoácidos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, Asp-Ser-Ser (DSS, sec. con núm. de ident.: 1), Glu-Ser-Ser (ESS, sec. con núm. de ident.: 2), Asp-Thr-Thr (DTT, sec. con núm. de ident.: 3), Glu-Thr-Thr (ETT, sec. con núm. de ident.: 4), Asn-Ser-Ser (NSS, sec. con núm. de ident.: 5), Asn-Thr-Thr (NTT, sec. con núm. de ident.: 6), Gln-Ser-Ser (QSS, sec. con núm. de ident.: 7), Gln-Thr-Thr (QTT, sec. con núm. de ident.: 8), y variaciones de estas. Como alternativa o adicionalmente a estas secuencias de repetición, los péptidos descritos en la presente pueden incluir variaciones menores de estas repeticiones, que incluyendo pero no se limitan a Asp-Ser-Thr (DST, sec. con núm. de ident.: 9), Asp-Ala-Ala (DAA, sec. con núm. de ident.: 10), o Ala-Ser-Thr (AST, sec. con núm. de ident.: 11). Uno o más residuos de aminoácidos dentro de una repetición de tres aminoácidos se puede modificar químicamente. Por ejemplo, los péptidos pueden contener uno o más residuos de Ser o Thr en el que un grupo hidroxilo se ha modificado mediante la adición de un grupo fosfato. Los péptidos pueden variar en longitud de tres a mayor de cincuenta aminoácidos.

La afinidad de unión de los péptidos descritos en la presente para superficies calcificadas se puede controlar mediante la alteración de la composición y el número de repeticiones. Por ejemplo, la inclusión de uno o más repeticiones Asp-Ser-Ser (sec. con núm. de ident.:1) aumentará la afinidad de unión del péptido, porque esta secuencia exhibe la mayor afinidad de cualquiera de las repeticiones probadas. La afinidad de unión del péptido se puede aumentar además por el aumento del número de repeticiones de tres aminoácidos. Los péptidos que contienen más de seis repeticiones generalmente exhiben una mayor afinidad de unión que los que tienen menos repeticiones. En ciertas modalidades, los péptidos descritos en la presente pueden tener una afinidad de unión (K_A) para la hidroxiapatita de más de 15.000 M^{-1} . En ciertas modalidades, esta afinidad de unión puede ser mayor de 50.000 M^{-1} , en otras modalidades mayor de 100.000 M^{-1} , en otras modalidades mayor de 200.000 M^{-1} , y en otras modalidades mayor de 300.000 M^{-1} .

En ciertas modalidades, los péptidos pueden contener uno o más aminoácidos adicionales que no son parte de una secuencia de repetición de tres aminoácidos. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la porción de repetición del péptido se puede fusionar con una secuencia de aminoácidos que tiene una funcionalidad adicional, tal como por ejemplo una secuencia peptídica antimicrobiana tal como las secuencias peptídicas, 2c-4, PL135, o b-34. En ciertas de estas modalidades, la porción de repetición del péptido se puede fusionar a la secuencia de aminoácidos adicional a través de una secuencia enlazadora, tal como por ejemplo una secuencia de triglicina.

En ciertas modalidades, los péptidos descritos en la presente comprenden la secuencia (X-Y-Z)_n, en donde X es ácido aspártico, Y y Z son aminoácidos seleccionados de serina y fosfoserina y n es un número entre 3 y 15. En otras modalidades, n es entre 3 y 10, en ciertas modalidades, n es entre 3 y 8,

Los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se han mostrado que inducen el crecimiento de cristales de fosfato de calcio en el esmalte desmineralizado y tanto en dentina desmineralizada como no desmineralizada, dependiendo de las condiciones de tratamiento. Del mismo modo, los péptidos se han mostrado que inducen remineralización del hueso. Así, en ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para mejorar la mineralización mediante el reclutamiento de partículas de fosfato de calcio que flotan libres a las superficies calcificadas. Estos péptidos pueden unirse a superficies calcificadas y/o agregados de fosfato de calcio que flotan libres. La unión concurrente de las superficies calcificadas y los agregados que flotan libres resulta en aumento de la concentración de fosfato de calcio cerca de la superficie calcificada, que conduce a aumento de la remineralización de la superficie. Modulando el tamaño y la afinidad de unión de los péptidos,

es posible alterar la cantidad de calcio unido a la superficie. En ciertas modalidades, la remineralización de los dientes resulta en oclusión completa o parcial de los túbulos dentinarios.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para remineralizar un diente, prevenir o desmineralización lenta del diente, tratar el daño del diente, defectos, enfermedades, o anomalías, formar capas de mineral en o más abajo de la superficie de un diente, alterar la densidad mineral de un diente, tal como por ejemplo aumentar o disminuir la densidad mineral, o sellar un sitio dental. Del mismo modo, estas composiciones se pueden usar para tratar un defecto del hueso, lesión, tumor, crecimiento anómalo, enfermedad, o pérdida de hueso, causar la formación de capas minerales en o más abajo de la superficie de un hueso, o alterar la densidad de un hueso, tal como, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la densidad. En estas modalidades, una composición que comprende uno o más péptidos de unión a calcio como se describió anteriormente se aplica en o cerca del sitio del hueso o huesos afectados. En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para tratar la calcificación, lesiones calcáreas, o defectos mineralizados en tejidos y órganos distintos del hueso, que incluye la placa arterial.

"Tratar" o "tratamiento" de una afección como se utiliza en la presente puede referirse a prevenir o reparar la afección, retrasar o demorar la aparición o la velocidad de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la afección, reducir o acabar con los síntomas asociados con la afección, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de estos.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar como un medio para la unión específica de porciones químicas o partículas deseables a las superficies calcificadas, tales como la de huesos y dientes. A diferencia de los enfoques actuales para la remineralización de las superficies de los dientes que dependen de las inundaciones de la cavidad oral con formulaciones de calcio libre o unido a proteínas, estos compuestos causan agregados de fosfato de calcio que específicamente se adhieren a la superficie del diente, aumentando así la concentración local de calcio y fosfato y aumentando la probabilidad de que este fosfato de calcio será incorporado en regiones desmineralizadas del diente. Las terapias farmacéuticas actuales para las lesiones o enfermedades de los tejidos calcificados depende de que comprendan el área de la superficie deseada, ya sea directamente (en forma tópica) o por administración sistémica, con soluciones libres del compuesto terapéutico de interés con la esperanza de que alguna fracción interactuará con la superficie calcificada.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para ensayos in situ e in vivo para la calcificación inadecuada. Por ejemplo, estas composiciones se pueden usar para diagnosticar, identificar, localizar, o tratar la calcificación, lesiones calcáreas o defectos de mineralización de los tejidos y órganos que no sean huesos, que incluyen, por ejemplo placa arterial, cálculos renales, o sesamoides. Los ensayos actualmente en uso para determinar la presencia de calcificación incluyen métodos de unión de colorante, incorporación de isótopos radiactivos, análisis de transmisión de rayos X, y análisis químico cuantitativo. Cada uno de estos métodos sufre de ciertas desventajas. En los métodos de unión de colorante, la muestra se expone a un colorante fluorescente quelante de calcio, tal como tetraciclina, calceína, o alizarina, y se visualiza la incorporación del colorante en el tejido de interés. Aunque los colorantes se pueden introducir in vivo, la visualización de la señal requiere la escisión del tejido de interés. El tratamiento de tejido fijado con iones de plata (tinción von Kossa) se puede usar además para identificar los sitios de calcificación, pero este método no se puede aplicar in vivo y está sujeto a importantes niveles de tinción de fondo. La incorporación de isótopos radiactivos tales como ⁴⁵Ca proporciona información precisa y cuantitativa sobre la localización y la velocidad de calcificación in vivo, pero tiene el inconveniente de exponer a los sujetos experimentales a altos niveles de radiación ionizante. El análisis de transmisión de rayos X proporciona una alta resolución espacial y se puede lograr de animales vivos, pero no puede únicamente identificar depósitos de calcio entre las otras características visibles en una imagen de rayos X. El análisis químico cuantitativo in vitro de los depósitos de calcio proporciona determinaciones robustas del tipo y cantidad del mineral presente, pero estos métodos son de mucho trabajo y resultan en la pérdida de información acerca del lugar y la estructura del tejido involucrado.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden marcar fluorescentemente de cualquier otra forma y utilizar como un medio mejorado de visualización de regiones calcificadas en un tejido de interés. Estos péptidos se pueden sintetizar fácilmente con altos rendimientos, y tienen seguridad mejorada, toxicidad, y facilidad de uso en comparación con los métodos disponibles en la actualidad. La secuencia o composición del péptido se puede alterar para cambiar la afinidad relativa del péptido de tejido específico o tipos de superficie. Esto permitirá al péptido discriminar entre la dentina, esmalte, hueso y otros tejidos o superficies calcificadas, y entre los tejidos sanos y enfermos. Esta propiedad permite a estos compuestos que se usen como sondas para lesiones o lesiones patológicas en el tejido calcificado. Los péptidos se pueden usar solos, o junto con otros métodos conocidos para la detección de calcificación. En contraste con los fluoróforos de unión a calcio actualmente disponibles, que se limitan a los que pueden quelar iones de calcio mientras que conservan su fluorescencia, los péptidos descritos en la presente pueden unirse a cualquier fluoróforo. Esto expande en gran medida la paleta de colores que se puede usar para marcar superficies calcificadas, y permite la adaptación precisa de longitudes de onda de emisión y tecnologías de detección para cada experimento individual. Conjugando estos péptidos con colorantes o indicadores fluorescentes, colorimétricos, radiactivos, NMR- activo, u otros y tratando las muestras

biológicas con estos conjugados, se vuelve posible hacer observaciones cuantitativas de la extensión de la calcificación in situ e in vivo sin fijar o en gran medida perturbar la muestra. Debido a su alta especificidad y las velocidades de unión rápidas, tales conjugados pueden proporcionar tinción de fondo inferiores que los métodos de tinción de von Kossa/ión plata. La amplia variedad de etiquetas que se pueden conectar a estos péptidos de unión a calcio ofrece una enorme flexibilidad en cuanto a las condiciones de unión y los métodos de detección, lo que aumenta en gran medida la facilidad y la calidad con la que se pueden conducir la investigación biológica, biomédica, biotecnológica, medioambiental, y otras.

Los péptidos descritos en la presente tienen gran potencial como agentes de diagnóstico, porque a diferencia de los métodos actuales de identificación de lesiones, infecciones, tumores u otras lesiones de los tejidos calcificados, que se basan principalmente en la observación visual o radiológica, los péptidos descritos en la presente se pueden usar para detectar tales eventos sin dependencia en el ojo humano. Los péptidos DSS descritos en la presente se han mostrado que se orientan específicamente al esmalte desmineralizado y dentina no desmineralizada. Particularmente, estos péptidos han exhibido la capacidad de unirse preferentemente a lesiones de dientes cariados. Además, diversas variantes de péptidos DSS han exhibido la capacidad de orientarse a subporciones precisas de la estructura del diente, tal como por ejemplo punta de la raíz de dentina, esmalte basal, dentina del manto, esmalte cortical, y superficie del esmalte. Las composiciones que comprenden péptidos de unión a calcio conjugados a varias porciones detectables, tales como por ejemplo colorantes o indicadores fluorescente, colorimétrico, radiactivo, RMN-activo u otros, se pueden administrar a un sujeto para orientar las porciones específicas de los dientes e identificar a las porciones de los dientes que exhiben la desmineralización u otros daños. La composición de aminoácidos de los péptidos se puede seleccionar tal que se pueden orientar los tipos específicos de tejido o daño de tejido. El uso de estos péptidos permitirá la identificación específica de las regiones dañadas que incluyen las que pueden haber sido demasiado pequeñas para ver u oscurecidas de cualquier otra forma, aumentando enormemente la facilidad y precisión del diagnóstico de estas lesiones. Del mismo modo, en ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar como agentes de contraste para rayos X, Tomografía Computarizada o Imagen por Resonancia Magnética.

En ciertas modalidades, las composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para orientar los compuestos terapéuticos a las superficies de los huesos, dientes, u otros tejidos calcificados. Por ejemplo, los péptidos se pueden conjugar con compuestos antimicrobianos, moduladores de desarrollo de los huesos y dientes, o cualquier otro compuesto que se pueden unir al péptido. La conjugación de un compuesto terapéutico a uno de estos péptidos se pueden usar para localizar el compuesto terapéutico a una superficie calcificada, conduciendo a una concentración local aumentada del compuesto y eficacia mejorada. Localizando el compuesto con el tejido de interés, estos péptidos reducirán la concentración del compuesto necesario para lograr el efecto deseado. Además de mejorar la eficacia, la orientación específica del compuesto terapéutico a un tejido de interés evita a los tejidos no-objetivo de los efectos potencialmente dañinos del compuesto. La composición o la longitud del péptido se pueden regular para permitir la orientación específica a las regiones lesionadas o enfermas del tejido.

En ciertas modalidades, composiciones que comprenden los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden usar para tratar una infección microbiana, tal como por ejemplo una infección bacteriana. En estas modalidades, los péptidos se pueden unir a un péptido antimicrobiano, tal como por ejemplo péptido 2c-4, B-34 o PL-135 (sec. con núms. de ident.: 26, 30, y 32, respectivamente).

Basado en la capacidad de los péptidos de unión a calcio descritos en la presente para unir selectivamente calcio o fosfatos de calcio, composiciones que comprenden estos péptidos se pueden incorporar en un sensor para la detección de calcio en el agua potable, aguas residuales, soluciones industriales, alimentos, bebidas, aplicaciones de investigación, o cualquier solución para los que se desea la determinación de la presencia de calcio. Asimismo, estas composiciones se pueden usar para controlar la deposición de minerales de calcio en, por ejemplo, aplicaciones industrial, fabricación, médica, investigación, casero, o personal. Además, estas composiciones se pueden emplear para determinar la presencia o cantidad de varios minerales de calcio, por ejemplo, cultivos celulares, tejidos, animales experimentales, sujetos humanos experimentales, u otras aplicaciones de investigación.

Los péptidos de unión a calcio descritos en la presente se pueden enlazar directa o indirectamente, ya sea de forma covalente o no covalente, a uno o más conjugados o porciones. Tales conjugados son regiones que incluyen, pero no se limitan a, otros péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, compuestos organometálicos, porciones terapéuticas, tales como por ejemplo un agente anticáncer o antimicrobiano. Otros ejemplos de conjugados o porciones que se pueden enlazar con los péptidos de unión a calcio descritos en la presente invención incluyen marcadores detectables tales como por ejemplo fluoróforos, cromóforos, etiquetas de afinidad, marcadores radiactivos o marcadores de espín. Adicionalmente, uno o más átomos dentro del péptido de unión a calcio o un conjugado o porción de enlace se puede sustituir con un isótopo radiactivo o activo-RMN. El enlace entre el péptido de unión a calcio y un conjugado o porción puede ocurrir en el extremo amino del péptido, el extremo carboxi terminal del péptido, o a través de un sitio interno en el péptido. En ciertas modalidades, el péptido se puede enlazar a un conjugado o porción a través de un enlazador de aminoácidos, tal como por ejemplo, una secuencia enlazadora de triglicina.

- Composiciones que comprenden péptidos de unión a calcio descritos en la presente invención se pueden administrar a través de cualquier método conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, transdérmico, aerosol, o enteral. La administración "oral" puede realizarse usando una pasta de dientes, gel, colutorio, enjuague bucal, píldora, tableta, cápsula, gel o polvo. Alternativamente, las composiciones se pueden incorporar en alimento, goma de mascar, dulce, o una bebida. "Parenteral" se refiere a la vía de administración que se asocia generalmente con la inyección, incluyendo infusión infraorbitaria, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. La administración "transdérmica" puede realizarse usando una crema tópica, ungüento, o pomada, o por medio de un parche transdérmico. En aquellas modalidades en donde las composiciones se usan para tratar una afección dental o alterar las características dentales tales como la densidad mineral, se puede administrar en o cerca del sitio del diente afectado u objetivo. Del mismo modo, en las modalidades en donde la composición que se usa para tratar una afección ósea o alterar las características óseas, se puede administrar en o cerca del sitio del hueso afectado u objetivo.
- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no se deben interpretar como limitante del alcance de la invención. Hasta el punto que se mencionan los materiales específicos, es sólo para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. Una persona con experiencia en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención. Se entenderá que muchas variaciones se pueden hacer en los procedimientos descritos en la presente mientras que permanezcan aun dentro de los límites de la presente invención. Es intención de los inventores que tales variaciones se incluyen dentro del alcance de la invención.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1: Unión de péptidos DSS a hidroxiapatita de calcio:

- Se generaron cuatro péptidos DSS que contienen dos (2DSS, sec. con núm. de ident.: 12), cuatro (4DSS, sec. con núm. de ident.: 13), seis (6DSS, sec. con núm. de ident.: 14), u ocho (8DSS, sec. con núm. de ident.: 15) repeticiones (DSS) Asp- Ser-Ser. Los péptidos se marcaron con fluoresceína, y diversas concentraciones de los péptidos marcados (0-100 μM) se mezclaron con una cantidad fija (0.3 mg) de nanocristales de hidroxiapatita con un área de superficie específica de 100 m^2/g (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc.). Las muestras se incubaron durante diez minutos, seguido de la eliminación de la hidroxiapatita por centrifugación. La cantidad de péptido en la mezcla se midió tanto antes como después de la eliminación de la hidroxiapatita por absorbancia espectroscópica a 480 nm (la absorbancia máxima del marcador de fluoresceína). La cantidad de péptido unido se calculó comparando la relación de las absorbancias final (A_f) e inicial (A_i) con la concentración inicial (P_o) [$P_{\text{unido}} = (A_f / A_i) P_o$]. Los gráficos se generaron ilustrando la cantidad de péptido unido por m^2 del área de superficie de hidroxiapatita en función de la concentración de péptido no unido en el equilibrio. Las isothermas resultantes se ajustaron a la isoterma de Langmuir ($x/m = (K_A N_{\text{Max}} C_{\text{eq}}) / (1 + K_A C_{\text{eq}})$) (Calis 1995), que describe la actividad de unión de una molécula en términos de una combinación de la afinidad de unión (K_A) y la avidez (N_{Max}). K_A representa la constante de afinidad del péptido para la superficie de hidroxiapatita. En esta ecuación, x/m representa la cantidad molar de péptido unido por unidad de área de superficie de hidroxiapatita, N_{Max} representa la concentración superficial máxima (mol/m^2), y C_{eq} representa la concentración molar de péptido no unido en el equilibrio. La isoterma de Langmuir describe la unión de moléculas a las superficies con las condiciones que 1) todos los sitios de unión tienen la misma afinidad por el péptido, y 2) el péptido formará una monocapa en la superficie pero no podrá acumularse a niveles más altos. El ajuste excelente de la isoterma de Langmuir a los datos experimentales valida estas condiciones, y las constantes de afinidad se usaron para las comparaciones entre los péptidos. Como se muestra en la Figura 1A, la afinidad de unión de los varios péptidos para la hidroxiapatita aumentó con un aumento en el número de repeticiones DSS (2DSS (sec. con núm. de ident.: 12), $K_A = 57,000 \text{ M}^{-1}$; 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13), $K_A = 94,000 \text{ M}^{-1}$; 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) $K_A = 300,000 \text{ M}^{-1}$).
- Diversas variantes de péptidos DSS se ensayaron para determinar el efecto de varias alteraciones de aminoácidos en la afinidad de unión. Estas variantes de péptidos incluyen un péptido de cuatro repeticiones que contiene la cadena lateral más larga en la primera posición (4ESS, sec. con núm. de ident.: 16), tres péptidos de cuatro repeticiones que contienen grupos hidroxilo estéricamente más impedidos en las posiciones segunda y tercera (4DTT, sec. con núm. de ident.: 17; 4NTT, sec. con núm. de ident.: 18; y 4ETT, sec. con núm. de ident.: 19), un péptido de cuatro repeticiones que carece de un grupo con carga en la primera posición (4NSS, sec. con núm. de ident.: 20), un péptido de ocho repeticiones que carece de un grupo con carga en la primera posición (8ASS, sec. con núm. de ident.: 21), y dos péptidos de ocho repeticiones que carecen de grupos hidroxilo en las posiciones segunda y tercera (8DAA, sec. con núm. de ident.: 22; 8NAA, sec. con núm. de ident.: 23). Mediante la comparación de isothermas de unión de cada una de las variantes de péptidos que contienen DSS del mismo tamaño, se determinó que la eliminación del residuo negativamente cargado (4NSS (sec. con núm. de ident.: 1), $K_A = 41,000 \text{ M}^{-1}$; 4NTT (sec. con núm. de ident.: 18), $K_A = 18,000 \text{ M}^{-1}$; 8ASS (sec. con núm. de ident.: 21), $K_A = 170,000 \text{ M}^{-1}$) (Figura 1B, 1C) o la sustitución de los residuos de serina con treonina o alanina (4DTT (sec. con núm. de ident.: 17), $K_A = 161,000 \text{ M}^{-1}$; 4ETT (sec. con núm. de ident.: 19), $K_A = 61,000 \text{ M}^{-1}$; 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22), $K_A = 300,000 \text{ M}^{-1}$) (Figura 1B, 1C) disminuye significativamente la actividad de unión. La sustitución tanto del residuo ácido en la primera posición como las serinas condujo a una pérdida casi total de la afinidad de unión (4NTT (sec. con núm. de ident.: 18); 8NAA (sec. con núm. de ident.: 23), $K_A = 20,000 \text{ M}^{-1}$).

¹) (Figura 1B, 1C). La sustitución del residuo de ácido aspártico con un residuo de ácido glutámico causó sólo una ligera disminución de la afinidad de unión (4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), $K_A=81,000 \text{ M}^{-1}$) (Figura 1 B). Estos datos sugieren que tanto el residuo ácido como las repeticiones de serina son cruciales para la afección de estos péptidos en las superficies de hidroxiapatita. Se encontró que el DSS era la secuencia de repetición óptima para la generación de la actividad de unión a hidroxiapatita, no obstante los péptidos variantes mostraron unión marcadamente reducida a hidroxiapatita in vitro.

Un péptido DSS parcialmente fosforilado de cuatro repeticiones (4DS_PS, sec. con núm. de ident.:25) se examinó también y mostró que tiene una afinidad de unión para la hidroxiapatita similar a la de 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13) ($K_A=83,000 \text{ M}^{-1}$, en función de $K_A=94,000 \text{ M}^{-1}$ para 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13). Sin embargo, el péptido 4DS_PS tuvo un número significativamente mayor de sitios de unión disponibles en la superficie HA mol/m^2 para 4DS_PS (sec. con núm. de ident.: 25) en función de $5.8 \times 10^8 \text{ mol/m}^2$ para 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13)).

Ejemplo 2: Unión de péptidos DSS a los dientes:

Para demostrar la unión de péptidos DSS al tejido biológico, dientes humanos sagitalmente seccionados se incubaron durante diez minutos en una solución de $12,5 \mu\text{M}$ 5(6) del péptido 6DSS marcado con carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 14) que contiene 10 mM de NaCl y 50 mM de HEPES, pH 7.0. Las muestras control se prepararon sin el péptido. Las muestras se lavaron después del tratamiento y fotografiaron por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) usando iluminación láser azul (longitud de onda (λ) de excitación=488 nm) y un filtro de emisión FITC. La tinción fluorescente intensa indicó que 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14) se une a la superficie del diente (Figura 1 D). Secciones control tratadas con Mock no presentaron fluorescencia. La unión del péptido se limitó a la dentina (Figura 1D, región de color claro, lado izquierdo), sin unión visible en la región del esmalte (Figura 1D, región de color oscuro, lado derecho).

Ejemplo 3: Unión de péptidos DSS a nódulos mineralizados de médula ósea de ratón:

Cultivos de médula ósea de ratón se cultivaron hasta la confluencia en DMEM + FBS al 10%, después se trataron continuamente durante tres semanas, ya sea con $2.5 \mu\text{M}$ de 5(6)-6DSS marcado con carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 14) o $2.5 \mu\text{M}$ de 5(6)-péptido marcado con carboxifluoresceína #3-1 (péptido control codificado, sec. con núm. de ident.: 24) en aMEM+10% FBS con $50 \mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico y 4 mM de β -glicerofosfato. Los cultivos se fotografiaron por microscopía de fluorescencia usando un conjunto de filtro de excitación/emisión FITC, y se obtuvieron imágenes tanto de campo claro como de fluorescencia. Fuerte tinción se observó en las muestras tratadas con DSS, como indicado por la coloración de luz que se muestra en la masa central de nódulos en la Figura 2B. No se observó tinción en la muestra control (Figura 2C, 2D), indicando que el péptido 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14) se une específicamente a nódulos mineralizantes en los cultivos de médula ósea de ratón.

Ejemplo 4: Acumulación del fosfato de calcio (CaHPO_4) por péptidos DSS inmovilizados:

Perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina con un diámetro promedio de $4 \mu\text{m}$ (SpheroTech P.L.C.) se incubaron ya sea con el péptido 8DSS conjugado con biotina (sec. con núm. de ident.: 15) o sin conjugado con biotina. Las perlas se lavaron con PBS para eliminar el péptido no unido (o biotina no unida, en el caso de las perlas control) y se incubaron en una solución de PBS + 1 mM de CaCl_2 + 1 mM de NaHPO_4 durante doce días antes de fotografiarse. Como se ilustra en la Figura 3A, casi todas las perlas recubiertas con péptidos DSS se incorporaron en grandes agregados de fosfato de calcio amorfo precipitado. Todos los agregados de fosfato de calcio de tamaño significativo se asociaron con una o más perlas. En comparación, en la muestra control bloqueada con biotina, casi todas las perlas no se agregaron ni asociaron con el precipitado (Figura 3B). Varias de las perlas recubiertas con péptido se cubrieron con más capas ordenadas de mineral durante el experimento (representativo se muestra en la Figura 3C), mientras que ninguna de las perlas control bloqueadas con biotina/sin recubrimiento acumuló mineral (Figura 3D).

Ejemplo 5: Remineralización de las superficies de dentina degradadas con péptidos DSS:

Dientes humanos extraídos se seccionaron sagitalmente (Accutom-50, hoja de diamante CA-231) y desmineralizaron con 19 % de gel de ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) durante una hora, seguido por la inmersión en agua desionizada y ultrasonificación para eliminar el exceso de detritos. Las muestras se trataron con $12,5 \mu\text{M}$ de péptido 8DSS en 50 mM de tampón HEPES (pH 7.0), sólo tampón (sin péptido), o dejaron sin tratamiento. Después de una hora, las muestras se remineralizaron durante 15 minutos con el Desensibilizador Quell (Pentron technologies, LLC), una solución de remineralización que consiste de soluciones acuosas de cloruro de calcio y fosfato de potasio. Las muestras se enjuagaron exhaustivamente antes de fotografiarse por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras de dentina tratadas con DSS acumularon una capa continua de precipitado de fosfato de calcio, ocluyendo totalmente los túbulos dentarios (Figura 4B). Muestras tratadas con mock y sin tratar mostraron niveles muy inferiores de acumulación de precipitado mineral, con túbulos dentarios que permanecen totalmente expuestos (Figura 4A, 4C, 4D).

Ejemplo 6: Nucleación de la hidroxiapatita en el esmalte dental y dentina por péptidos DSS:

Para determinar si la aplicación de DSS en varias preparaciones de tejido promueve la nucleación de HA, lo que finalmente puede conducir a la remineralización de tejidos, dientes de humano adulto sagitalmente seccionado (obtenido después de la extracción durante la práctica clínica normal) se pulieron usando una rueda de trituración Streurs, y prepararon para experimentos de nucleación. La mitad de las secciones se desmineralizaron con ácido fosfórico al 35% durante 15 minutos, se enjuagaron bien después con agua desionizada. La otra mitad se dejó sin tratar. Todas las muestras se sonicaron después durante cinco minutos para eliminar el exceso de detritos que quedaron del corte y trituración y/o desmineralización. Las muestras se trataron con 12,5 µM de 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) disuelto en 50 mM de solución tamponada HEPES (pH 7.0), sólo solución tamponada, o dejaron sin tratamiento. Las muestras se sumergieron después en un fluido corporal simulado (SBFn), destinado a acelerar la nucleación de los cristales de hidroxiapatita (HA), durante 4 horas. Después de la etapa de nucleación, las muestras se sumergieron en una solución libre de magnesio y bicarbonato (SBFg) para dejar crecer los cristales de HA nucleados. La Tabla 1 muestra la composición de las soluciones SBFn y SBFg en comparación con el plasma sanguíneo. Ambas soluciones se ajustaron a pH 6.8. Los cristales se cultivaron para amplificar los cristales nucleados para una fácil visualización por SEM.

Tabla 1: Composición de solución SBFn y SBFg:

Concentración iónica	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo	142.0	5.0	2.5	1.5	27.0	103.0	1.0	0.5
SBFn	284.0	10.0	5.0	3.0	54.0	206.0	2.0	1.0
SBFg	284.0	4.0	5.0	0	10	294.0	2.0	10

La superficie del esmalte no desmineralizada, tratada, y no tratada con tampón permaneció en gran parte amorfo, lo que indica poco o ningún crecimiento de cristales (y por lo tanto poca o ninguna nucleación) (Figura 5, dos filas superiores). Sin embargo, el crecimiento significativo de cristal (indicando nucleación temprana y robusta) se observó en el esmalte desmineralizado expuesto al péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) (Figura 5, dos filas superiores). Esto indica que los péptidos DSS puede reconocer específicamente el esmalte desmineralizado y el crecimiento de hidroxiapatita nucleado en la superficie del esmalte desmineralizado.

La superficie de la dentina no desmineralizada presentó cierto grado de crecimiento del cristal en las muestras tratadas y sin tratar con tampón. Sin embargo, el crecimiento más significativo, y por lo tanto la nucleación más temprana y más robusta, se produjo en la muestra tratada con el péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) (Figura 5, dos filas inferiores). Mientras que el Ejemplo 5 demostró la capacidad de los péptidos DSS, en conjunto con los regímenes de remineralización existentes, para provocar la deposición de capas gruesas de fosfato de calcio suficientes para ocluir los túbulos dentarios en la dentina desmineralizada, estos resultados indican que con un tratamiento ligeramente diferente se produce la nucleación del cristal principalmente sobre la dentina no desmineralizada. Así, dependiendo del régimen de tratamiento específico empleado, los péptidos DSS se pueden usar para depositar capas de fosfato de calcio sobre la dentina desmineralizada o provocar nucleación robusta del crecimiento del cristal de hidroxiapatita en las superficies totalmente mineralizadas. Esto significa que los péptidos DSS se pueden usar, por ejemplo, para tratar la sensibilidad del diente debido a la exposición de los túbulos dentinarios, para remineralizar caries de implicadas en la dentina mecánicamente desbridadas, o para reparar superficies dentarias fracturadas.

Ejemplo 7: Especificación del tejido en la unión del péptido DSS

Dientes humanos sagitalmente seccionados fueron ya sea desmineralizados mediante la incubación con 0.5 M de EDTA durante 15 minutos o se dejaron sin desmineralizar. Las muestras se incubaron después durante diez minutos en una solución de 12,5 µM de 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15), 10 mM de NaCl, y 50 mM de HEPES, pH 7.0. Las muestras control se incubaron sin péptido. Las secciones se enjuagaron y fotografiaron por CLSM usando parámetros idénticos de láser y cámara.

En las muestras desmineralizadas, la unión del péptido DSS se observó principalmente en el esmalte (Figura 6, panel izquierdo, E), con poca o ninguna unión en la dentina (Figura 6, panel izquierdo, D). De acuerdo con los resultados discutidos en el Ejemplo 1, el patrón opuesto se observó en la muestra no desmineralizada, donde el péptido se unió principalmente con la dentina y presentó poca o ninguna unión con el esmalte (figura 6, panel derecho, comparar D y E). La unión esmalte-dentina fue claramente delimitada tanto en las muestras desmineralizadas como no desmineralizadas (Figura 6, DEJ). La capacidad del péptido DSS para unirse específicamente a la porción de esmalte de las secciones de diente desmineralizado, mientras que no muestra unión significativa al esmalte no desmineralizado es consistente con el hallazgo del Ejemplo 6 donde péptidos DSS pueden reconocer específicamente esmalte desmineralizado y el crecimiento de la hidroxiapatita nucleada en la superficie del esmalte desmineralizado.

Ejemplo 8: Remineralización del hueso:

Para determinar si los resultados de la remineralización observados en los tejidos de los dientes pueden extenderse al hueso, se obtuvieron fémures de rata de animales sacrificados en virtud de un protocolo de tejido compartido. Las muestras de ensayo se desmineralizaron con gel de EDTA al 19% durante una hora, seguido por inmersión en agua desionizada y ultrasonificación para eliminar el exceso de detritos. Las muestras de ensayo se trataron después con el péptido 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) durante una hora, enjuagaron, y la mitad de las muestras se remineralizaron usando el Desensibilizador Quell (Pentron Clinical Technologies, LLC) como se describió en el Ejemplo 5. Todas las muestras se prepararon después para SEM y fotografiaron como en el Ejemplo 5. Se observó una capa continua de mineral que cubre la superficie del tejido en el fémur de rata sin tratar (Figura 7, panel superior). En la muestra desmineralizada, los canales Harversianos fueron claramente expuestos (Figura 7, panel central). Sin embargo, seguido el tratamiento con 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) y el Desensibilizador Quell, se restauró la superficie del mineral y se observó la oclusión de los canales (Figura 7, panel inferior). Así, los péptidos DSS son capaces de promover la remineralización del hueso así como del tejido dental.

Ejemplo 9: Unión específica al tejido de péptidos DSS en dientes humanos:

Para investigar la especificación de tejido de la unión del péptido DSS al tejido dental, las secciones de los dientes humanos se expusieron a péptidos DSS y variantes, después, se fotografiaron por CLSM como se describió en el Ejemplo 2. Los péptidos utilizados para estos experimentos fueron 8DSS (sec. con núm. de ident.: 1), 8ASS (sec. con núm. de ident.: 21), 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22), 8NAA (sec. con núm. de ident.: 23), 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13), 4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), 4NSS (sec. con núm. de ident.: 20), 4DTT (sec. con núm. de ident.: 17), 4ETT (sec. con núm. de ident.: 19), 4NTT (sec. con núm. de ident.: 18), y 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14). Secciones sagitales de dientes humanos extraídos durante la práctica clínica normal se pulieron y después se incubaron durante diez minutos en una solución del péptido apropiado marcado con 5(6) carboxifluoresceína (12.5µM) que contienen 10 mM de NaCl y 50 mM de HEPES, pH 7.0. Las muestras control se prepararon sin el péptido. Las muestras se lavaron extensivamente después del tratamiento y fotografiaron por CLSM usando iluminación láser azul (A=488 nm) y el filtro de emisión FITC, con parámetros idénticos de cámara y microscopio para cada muestra. Para cada sección, varias exploraciones se recogieron y se reunieron de un modo automatizado para generar paneles de imágenes que representan una superficie de 13x13 mm, suficiente en la mayoría de los casos para abarcar la sección completa. Como se sugirió por los resultados de afinidad de unión en el Ejemplo 1, los péptidos que contienen la secuencia (DSS)_n presentaron los más altos niveles de unión a las superficies de los dientes, con 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14) y 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15) mostrando los mayores niveles de tinción. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 8. 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15), 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14), y 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13) se unieron principalmente a la dentina del manto, con una unión dentina-esmalte fuertemente delineada, baja o ninguna unión a la dentina de la punta de la raíz o esmalte de la base, y ninguna unión detectable ya sea al esmalte cortical o la superficie del esmalte. Unión significativa se observó además en los bordes de la cavidad pulpal. 8ASS (sec. con núm. de ident.: 21), 4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), y 4NSS (sec. con núm. de ident.: 20) presentaron patrones similares, aunque a inferiores niveles de unión. 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22) presentó una inversión de este patrón de unión, con la unión primaria a la dentina de la punta de la raíz y el esmalte cortical, así como en la unión dentina-esmalte y la pared de la cavidad pulpal. 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22) mostraron poca o ninguna unión a la dentina del manto, la dentina circumpulpar, esmalte basal. 4DTT (sec. con núm. de ident.: 17) y 4ETT (sec. con núm. de ident.: 19) presentaron patrones de unión similares a los de 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13) y 4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), aunque en niveles rápidamente reducidos. 8NAA (sec. con núm. de ident.: 23) presentó muy poca unión a cualquier tejido sano, pero se unió en cierta forma a una lesión cariada presente en la muestra (ver Ejemplo 10, más abajo). 4NTT (sec. con núm. de ident.: 18) mostró fuerte unión a un fragmento de hueso periodontal unido a la muestra, pero niveles muy bajos de unión al tejido dental sano. Estos resultados sugieren que las capas específicas del diente se pueden orientar con alta especificidad usando péptidos específicos.

Ejemplo 10: Unión preferencial de péptidos DSS a lesiones cariadas en los dientes:

Secciones de dientes humanos que contienen las lesiones cariadas obvias, que consisten en el esmalte desmineralizado, se pulieron y expusieron a péptidos DSS marcados con 5(6)-carboxifluoresceína y variantes usando el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Las secciones se lavaron extensivamente y fotografiaron por CLSM usando iluminación láser azul (λ = 488 nm) y el filtro de emisión FITC, con los parámetros del microscopio y la cámara ajustados para cada muestra para optimizar la señal detectada a partir de cada péptido. Las imágenes se examinaron para identificar los niveles relativos de la unión del péptido de unión en tejido sano frente a tejidoariado. 4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), 4NSS (sec. con núm. de ident.: 20), 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22), 8NAA (sec. con núm. de ident.: 23), 4ETT (sec. con núm. de ident.: 19), 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13), 8ASS (sec. con núm. de ident.: 21), 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15), y 6DSS (sec. con núm. de ident.: 14) presentaron unión altamente específica a las lesiones cariadas, con poca o ninguna unión al esmalte sano circundante (Figura 9; algunas de estas lesiones son visibles también en la Figura 8). Otros péptidos no se probaron, pero basado en estos resultados se presume la unión a las lesiones cariadas. De los péptidos, 4ESS (sec. con núm. de ident.: 16), 4NAA (sec. con núm. de ident.: 37), 8DSS (sec. con núm. de ident.: 15), 6DSS (sec. con núm. de ident.: 15), 4DSS (sec. con núm. de ident.: 13), 8DAA (sec. con núm. de ident.: 22), y 8ASS (sec. con núm. de ident.: 21) presentaron tinción excepcionalmente fuerte de las lesiones cariadas con relativamente débil (frecuentemente ausente completamente) unión del esmalte circundante. La capacidad de los péptidos para unirse a las lesiones cariadas, mientras que presentan poca o ninguna unión a la superficie

completamente mineralizada del esmalte sano, indica que los péptidos se pueden usar para identificar las caries dentales o lesiones de los dientes. Dada su capacidad de remineralizar en los sitios de la degradación del esmalte (Ejemplo 6), ellos también se pueden usar para iniciar la remineralización en los sitios de degradación del esmalte tales como caries o sitios de lesión sin causar la nucleación inapropiada en superficies de tejidos sanos.

Ejemplo 11: Unión selectiva de péptidos DSS a fosfatos de calcio:

Las sales de fosfato de magnesio, calcio, manganeso, cobalto, níquel, cobre, y estroncio se prepararon mediante la combinación de 100 mM de fosfato de sodio (pH 7.5) con 100 mM de soluciones de las sales de cloruro o sulfato de los iones metálicos antes mencionados ($MgCl_2$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $NiSO_4$, $CuSO_4$, y $SrCl_2$, respectivamente). Se recogieron de inmediato los precipitados y se lavaron dos veces con agua desionizada y se secaron para su almacenamiento. Para el análisis de la unión del péptido, la suspensión se hizo de cada sal de fosfato a una concentración de aproximadamente 0,5% (p/v) en una solución que contiene 50 mM de HEPES pH 7,0, 10 mM de NaCl, y 12,5 μM del péptido 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15). Cada muestra se incubó durante diez minutos a temperatura ambiente, después se lavó dos veces con una solución de 50 mM de HEPES pH 7,0 y 10 mM de NaCl, se resuspendió en el mismo tampón, y fotografió por microscopía de fluorescencia. Parámetros idénticos del microscopio y la cámara se usaron para cada muestra, permitiendo comparaciones cuantitativas entre las muestras. Para cada muestra, se recogieron imágenes de campo claro y fluorescencia de un solo campo. La intensidad de tinción fluorescente de las partículas de fosfato inorgánico en cada muestra se evaluó mediante la medición de la intensidad de píxel usando el GIMP (<http://www.gimp.org>) como sigue. Usando la imagen de campo claro como una guía, se seleccionaron áreas de la imagen de fluorescencia correspondientes a agregados de la sal fosfato y registraron las intensidades de los píxeles de estas regiones. Estos se compararon con las intensidades registradas en las regiones de fondo (regiones conocidas que no contienen agregados). Estos datos se expresaron después como la relación de la intensidad de la tinción ($I_{Tinción}$) entre la intensidad de fondo (I_{Fondo}), multiplicado por el valor absoluto de la diferencia entre la intensidad de la tinción y la intensidad de fondo (para corregir los altos niveles de ruido presentes en las muestras con niveles muy bajos de tinción) usando la ecuación: $Fluorescencia\ Relativa = (I_{Tinción}/I_{Fondo}) * (I_{Tinción}/I_{Fondo})$. Aunque un pequeño nivel de tinción se observó en agregados de $NiHPO_4$, los mayores niveles de tinción se observaron en agregados de $CaHPO_4$ y el químicamente similar $SrHPO_4$ (Figura 10). Esto demuestra que la unión de los péptidos DSS no es un fenómeno adhesión superficial no-específica con precipitados inorgánicos, sino más bien implica una interacción muy selectiva con los fosfatos de calcio, incluso hasta el punto que pueden distinguir entre los precipitados de calcio y fosfato de estroncio.

Ejemplo 12: Unión de péptidos DSS a oxalato de calcio:

Oxalato de calcio se preparó usando el método descrito previamente (Wang 2006). Los cristales de oxalato de calcio se lavaron con agua desionizada, se resuspendieron después en una solución que contiene 50 mM de HEPES pH 7,0, 10 mM de NaCl, y 12,5 μM del péptido 8DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína (sec. con núm. de ident.: 15). La suspensión de cristal se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos. Los cristales se recogieron después por centrifugación, lavaron dos veces con una solución de 50 mM de HEPES pH 7,0 y 10 mM de NaCl, y se visualizaron por microscopía de fluorescencia como se describió en el Ejemplo 11. La presencia del péptido marcado condujo a tinción significativa de los agregados de oxalato de calcio (Figura 11). Debido a que el oxalato de calcio es el compuesto más común presente en los cálculos renales (nefrolitiasis) (Coe 2005), estos resultados sugieren que los péptidos DSS se pueden usar para focalizar cálculos renales en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas, y que pueden ser capaces de modular el crecimiento de cálculos renales.

Ejemplo 13: Actividades antimicrobianas de fusiones del compuesto antimicrobiano-péptido DSS:

Para determinar la idoneidad de los péptidos DSS para servir como porciones dirigidas para suministrar compuestos terapéuticos a superficies mineralizadas, se sintetizaron péptidos que contienen un péptido N-terminal (DSS)₄, (DSS)₅, o (DSS)₆, un enlazador de triglicina (GGG), y un péptido antimicrobiano 2c-4 (sec. con núm. de ident.: 26) (J. He, sin publicar). Las secuencias de las proteínas de fusión se muestran en sec. con núms. de ident.: 27-29, respectivamente. La actividad antimicrobiana de estos péptidos contra bacterias anaerobias planctónica se determinó mediante una modificación de un ensayo descrito anteriormente (Qi 2005). En resumen, las células de *Streptococcus mutans* cepa UA159 se diluyeron a $\sim 1 \times 10^5$ ufc/mL en medio de caldo Todd-Hewitt (TH) y mezclaron ya sea con nanocristales de hidroxiapatita en suspensión (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., 0,03% p/v) o, para las muestras control, con un volumen equivalente de agua desionizada. Alícuotas se transfirieron en placas de 96 pocillos (Fisher). Diluciones seriadas de los péptidos se fabricaron después y se añadieron a la bacteria. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada péptido se determinó mediante la identificación de la concentración del péptido que inhibió completamente el crecimiento bacteriano después de una incubación de aproximadamente 24 horas, según medido por la absorbancia de las suspensiones celulares a una longitud de onda de 600 nm. El péptido 2c-4 muestra una MIC de 2 μM contra *S. mutans* planctónica en sí. Cuando se conjuga con una porción (DSS)₄ (sec. con núm. de ident.: 13) para generar el péptido 4DSS-2c4, su MIC se eleva a 52,5 μM , una pérdida significativa de eficacia que no se afecta por la adición de 0,03% (p/v) de hidroxiapatita. Sin embargo, como se mostró en el Ejemplo 1, la porción (DSS)₄ (sec. con núm. de ident.: 13) muestra menor afinidad por la hidroxiapatita que los péptidos con más repeticiones DSS, y la alta carga positiva del

péptido 2c-4 puede interactuar con la alta carga negativa de la porción (DSS)₄ (sec. con núm. de ident.: 13) para inhibir de cierta forma la actividad. No obstante, alguna actividad antimicrobiana se retiene mediante este péptido.

5 Alternativamente, la conjugación de una porción(DSS)₆ (sec. con núm. de ident.: 14) con el péptido antimicrobiano b-34 (sec. con núm. de ident.: 30) (J. He, sin publicar) para generar el péptido 6DSS-b-34 (sec. con núm. de ident.: 31) conduce a una mejoría en la actividad antimicrobiana por encima del péptido parental (MIC= 3.1 µM para 6DSS-b-34 en función de 5,6 µM para b-34). Aunque la adición de 0,03% de HA reduce de cierta forma la actividad antimicrobiana de 6DSS-b-34, la MIC resultante de 12,5 µM representa todavía una actividad considerable contra *Streptococcus mutans*.
10 Aun en otra alternativa, el péptido PL-135 (sec. con núm. de ident.: 32) (R. Lehrer, sin publicar) muestra una MIC de 21 µM contra *S. mutans* planctónica, en el medio solo. La conjugación de este péptido con una porción (DSS)_s (sec. con núm. de ident.: 35) para generar el péptido 5DSS-PL135 (sec. con núm. de ident.:33) reduce su actividad antimicrobiana contra *S. mutans* a >170 µM en medio solo. La adición de 0,03% de suspensión de hidroxiapatita al medio conduce a la recuperación de la mayor parte de esta actividad, reduciendo la MIC a 42.5 µM.

15 Esto demuestra que otros compuestos pueden mantener su actividad cuando se conjuga con los péptidos DSS. Además, esto demuestra compuestos que se pueden fácilmente generar sólo tienen una actividad significativa en la presencia de un péptido DSS objetivo, lo que sugiere un medio fácil de desarrollar compuestos que sean sólo activos en superficies calcificadas (hueso, diente, etc.) y sean inertes en otros entornos. Tales compuestos representan un gran
20 paso de avance en la mejoría de la seguridad y eficacia de los enfoques terapéuticos para los trastornos del tejido mineralizado.

Como se indicó anteriormente, lo anterior sólo pretende ilustrar diversas modalidades de la presente invención. Las modificaciones específicas discutidas anteriormente no se deben interpretar como limitaciones en el alcance de la invención. Será evidente para un experto en la técnica varios equivalentes, cambios y modificaciones pueden realizarse
25 sin apartarse del alcance de la invención, y se entiende que tales modalidades equivalentes deben incluirse en la presente.

Referencias

- 30 1. Calis, S., y otros 1995. Pharm Res 12:1072-1076.
2. Coe, F.L., y otros 2005. J Clin Invest 115:2598-2608.
3. Cross, K.J., y otros 2005. J Pept Res 66:59-67.
4. Gu1 K., y otros 2000. Eur J Oral Sci 108:35-42.
5. Hao, J., y otros 2004. Bone 34:921-932.
35 6. Lee, S. L., y otros 1980. Int J Pept Protein Res 16:231-240.
7. Lussi, A., y otros 1988. Arch Oral Biol 33:685-691.
8. Qi, F., y otros 2005. FEMS Microbiol Lett 251 :321-326.
9. Saito, T., y otros 2000. J Bone Miner Res 15:1615-1619.
10. Veis, A., y otros 1998. Eur J Oral Sci 106 Suppl 1 :234-238.
40 11. Wang, L., y otros 2006. Langmuir 22:7279-7285.
12. George A., y otros 1996. JBC 271(5):32869-32873
13. US 6,673,900 B2
14. US 2005/0288229

Lista de secuencia

5	<110>	The Regents of the University of California
	<120>	Péptidos de unión a calcio
	<130>	563-4
10	<140>	EP 06 804 228.2
	<141>	2007-03-31
	<150>	US 60/722,071
15	<151>	2005-09-28
	<160>	39
	<170>	FastSEQpara Windows Versión 4.0
20	<210>	1
	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
25	<220>	
	<223>	fosfoproteína de dentina humana (DPP, fosforina)
		motivo DSS, tres repeticiones de aminoácidos, péptido DSS de unión a calcio
30	<400>	1
		Asp Ser Ser
		1
	<210>	2
35	<211>	3
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
40	<223>	variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
	<400>	2
		Glu Ser Ser
45		1
	<210>	3
	<211>	3
	<212>	PRT
50	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
	<223>	variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
	<400>	3
55		Asp Thr Thr
		1
	<210>	4
	<211>	3
55	<212>	PRT
	<213>	Secuencia artificial
	<220>	
55	<223>	variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
	<400>	4
		Glu Thr Thr
		1

5
 <210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
 <400> 5
Asn Ser Ser
 1
 10
 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
 <400> 6
Asn Thr Thr
 1
 20
 <210> 7
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
 <400> 7
Gln Ser Ser
 1
 30
 <210> 8
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
 <400> 8
Gln Thr Thr
 40
 <210> 9
 <211> 3
 <212> PRT
 45
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos
 50
 <400> 9
Asp Ser Thr
 <210> 10
 <211> 3
 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos

	<400> 10 Asp Ala Ala 1	
5	<210> 11 <211> 3 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> variante de repetición de unión a calcio de tres aminoácidos	
15	<400> 11 Ala Ser Thr 1	
20	<210> 12 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> péptido de unión a calcio que contienen dos repeticiones DSS, 2DSS	
30	<400> 12 Asp Ser Ser Asp Ser Ser 1 5	
35	<210> 13 <211> 12 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> péptido de unión a calcio que contienen cuatro repeticiones DSS, 4DSS, (DSS)-4	
45	<400> 13 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser 1 5 10	
50	<210> 14 <211> 18 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> péptido de unión a calcio que contienen seis repeticiones DSS, 6DSS, (DSS)-6	
	<400> 14 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp 1 5 10 15	
	<210> 15 <211> 24 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> péptido de unión a calcio que contienen ocho repeticiones DSS, 8DSS	
	<400> 15 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp 1 5 10 15 Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser 20	

- 5
 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10
 <220>
 <223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene cadena lateral más larga en la primera posición, 4ESS
 <400> 16
 Glu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser Glu Ser Ser
 1 5 10
- 15
 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 20
 <220>
 <223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo más estéricamente impedidos en las posiciones segunda y tercera, 4DTT
 <400> 17
 Asp Thr Thr Asp Thr Thr Asp Thr Thr Asp Thr Thr
 1 5 10
- 25
 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30
 <220>
 <223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo más estéricamente impedidos en las posiciones segunda y tercera, 4NTT
 <400> 18
 Asn Thr Thr Asn Thr Thr Asn Thr Thr Asn Thr Thr
 1 5 10
- 35
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 40
 <220>
 <223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo más estéricamente impedidos en las posiciones segunda y tercera, 4ETT
 <400> 19
 Glu Thr Thr Glu Thr Thr Glu Thr Thr Glu Thr Thr
 1 5 10
- 45
 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 50
 <220>
 <223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que carece del grupo negativamente cargado en la primera posición, 4NSS
 <400> 20
 Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asn Ser Ser
 1 5 10
- 55
 <210> 21
 <211> 24

- <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> variante de péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo negativamente cargado en la primera posición, 8ASS
- <400> 21
Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser Ala
1 5 10 15
Ser Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser
20
- 10 <210> 22
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 15 <220>
<223> variante de péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo hidroxilo en las posiciones segunda y tercera, 8DAA
- <400> 22
Asp Ala Ala Asp Ala Ala Asp Ala Ala Asp Ala Ala Asp Ala Ala Asp
1 5 10 15
Ala Ala Asp Ala Ala Asp Ala Ala
20
- 20 <210> 23
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> variante de péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo hidroxilo en las posiciones segunda y tercera, 8NAA
- 30 <400> 23
Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn
1 5 10 15
Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala
20
- <210> 24
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido control codificado #3-1
- 40 <400> 24
Leu Ile Lys His Ile Leu His Arg Leu
1 5
- <210> 25
<211> 12
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> péptido de unión a calcioque contiene cuatro repeticiones DSS parcialmente fosforiladas, 4DS-PS
- 50 <221> MOD_RES
<222> (2)...(2)
<223> fosfoserina
- 55 <221> MOD_RES
<222> (5)...(5)
<223> fosfoserina

<221> MOD_RES
 <222> (8)...(8)
 <223> fosfofoserina

5

<221> MOD_RES
 <222> (11)...(11)
 <223> fosfofoserina

<400> 25
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
 1 5 10

10

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> péptido antimicrobiano 2c-4

20

<221> AMIDACIÓN
 <222> (7)... (7)
 <223> fenilalaninamida

<400> 26
 Arg Trp Arg Trp Arg Trp Phe
 1 5

25

<210> 27
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> proteína de fusión de N-terminal (DSS)-4, enlazador (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano 2c-4, péptido 4DSS-2c4

35

<221> AMIDACIÓN
 <222> (22)...(22)
 <223> fenilalaninamida

<400> 27
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gly Gly Gly Arg
 1 5 10 15
 Trp Arg Trp Arg Trp Phe
 20

40

<210> 28
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> proteína de fusión de N-terminal (DSS)-5, enlazador (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano 2c-4

<221> AMIDACIÓN
 <222> (25)...(25)
 <223> fenilalaninamida

50

<400> 28
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Arg Trp Arg Trp Arg Trp Phe
 20 25

55

<210> 29
 <211> 28

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> proteína de fusión de N-terminal (DSS)-6, enlazador (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano 2c-4

<221> AMIDACIÓN
<222> (28)...(28)
<223> fenilalaninamida

10 <400> 29
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Gly Gly Arg Trp Arg Trp Arg Trp Phe
 20 25

<210> 30
<211> 11
15 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> péptido antimicrobiano b-34

<221> AMIDACIÓN
<222> (11)...(11)
<223> fenilalaninamida

<400> 30
25 Leu Lys Arg Phe Leu Lys Trp Phe Lys Arg Phe
 1 5 10

<210> 31
<211> 32
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> proteína de fusión de N-terminal (DSS)-6, enlazador (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano b-34, péptido 6DSS-b-34

35 <221> AMIDACIÓN
<222> (32)...(32)
<223> fenilalaninamida

<400> 31
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Gly Gly Leu Lys Arg Phe Leu Lys Trp Phe Lys Arg Phe
 20 25 30

40 <210> 32
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> péptido antimicrobiano PL-135

<221> AMIDACIÓN
50 <222> (7)...(7)
<223> fenilalaninamida

<400> 32
 Phe His Phe His Leu His Phe
 1 5

55 <210> 33
<211> 25

- <212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 5 <220>
<223> proteína de fusión de N-terminal (D55)-5, enlazador (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano PL-135, péptido 5DSS-PL135
- 10 <221> AMIDACIÓN
<222> (25)...(25)
<223> fenilalaninamida
- <400> 33
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Gly Phe His Phe His Leu His Phe
 20 25
- 15 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> péptido de unión a calcio que contiene tres repeticiones DSS
- <400> 34
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
 1 5
- 25 <210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> péptido de unión a calcio que contiene cinco repeticiones DSS, 5DSS, (DSS)-5
- <400> 35
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
 1 5 10 15
- 35 <210> 36
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> péptido de unión a calcio que contiene siete repeticiones DSS
- <400> 36
 Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
 1 5 10 15
 Ser Ser Asp Ser Ser
 20
- 45 <210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> variante de péptido DSS de cuatro repeticiones que carece de grupo hidroxilo en las posiciones segunda y tercera, 4NAA
- <400> 37
 Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala
 1 5 10
- 55 <210> 38
<211> 120

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> (X-Y-Z)-n péptido de unión a calcio de tres repeticiones de aminoácidos, donde n = 1-40 and x = Asp

<221> MOD_RES
 <222> (1)...(120)
 <223> xaa = Ala, Ser, Thr, fosfoserina o fosfotreonina

<221> MOD_RES
 <222> (4)...(120)
 <223> tres repeticiones de aminoácidos (Asp-Xaa-Xaa) desde las posiciones 4-120 pueden estar presentes o ausentes

<400> 38

```

  Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
  1   5   10  15   20  25   30  35   40  45   50  55   60  65   70  75   80
  Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa
  Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
  Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
  Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa
  Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
  Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
  Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
  115 120
  
```

<210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de unión a calcio (X-Y-Z)-n con tres repeticiones de aminoácidos, donde n = 1-40, x = Asp, Y yZ = ser

<221> MOD_RES
 <222> (4)...(120)
 <223> tres repeticiones de aminoácidos (Asp-Ser-Ser) desde las posiciones 4-120 pueden estar presentes o ausentes

<400> 39

```

  Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
  1   5   10  15   20  25   30  35   40  45   50  55   60  65   70  75   80
  Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
  Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
  Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
  Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
  Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
  Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
  Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
  115 120
  
```

Reivindicaciones

- 5 1. La composición que comprende uno o más péptidos de unión a calcio, la secuencia de aminoácidos de uno o más de dichos péptidos consistente de la secuencia (X-Y-Z)_n, en donde:
X es ácido aspártico;
Y y Z son aminoácidos seleccionados independientemente de serina y fosfoserina;
n es un intervalo numérico de 3 a 15;
dichos péptidos tienen una longitud de hasta 100 aminoácidos; y
10 dicho(s) péptido(s) se une(n) a fosfato de calcio.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde n está entre 3 y 10.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1, en donde n es un número de 3 a 8.
4. La composición de la reivindicaciones 1-3, en donde Y y Z son serina.
5. La composición de la reivindicaciones 1-3, en donde Y y Z son fosfoserina.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en donde la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos de unión a calcio consiste en la secuencia DSSDSSDSSDSS (sec. con núm. de ident.:13).
7. La composición de la reivindicación 4, en donde la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos de unión de calcio consiste en la secuencia DSSDSSDSSDSSDSSDSS (sec. con núm. de ident.:14).
- 25 8. La composición de la reivindicación 4, en donde la secuencia de aminoácidos de dichos péptidos de unión a calcio consiste en la secuencia DSSDSSDSSDSSDSSDSSDSSDSS (sec. con núm. de ident.:15).
- 30 9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dichos péptidos de unión a calcio se conjugan con un marcador detectable
10. La composición de la reivindicación 9, en donde dichos péptidos de unión a calcio se conjugan con un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste de un fluoróforo, cromóforo, una etiqueta de afinidad, una etiqueta de antígeno, un marcador radiactivo, y un marcador de espín.
- 35 11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dichos péptidos de unión a calcio se conjugan con un péptido antimicrobiano.
- 40 12. La composición de la reivindicación 11, en donde dicho péptido antimicrobiano está enlazado a dicho uno o más péptidos de unión a calcio a través de una secuencia enlazadora de aminoácidos.
13. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para usar en el tratamiento de un defecto dental **caracterizado por** la desmineralización de los dientes en un sujeto.
- 45 14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para usar en el tratamiento de un defecto óseo **caracterizado por** la disminución de la densidad ósea en un sujeto.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 para usar en la identificación de un defecto dental **caracterizado por** la desmineralización de los dientes en un sujeto.
- 50 16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 para usar en la identificación de un defecto óseo **caracterizado por** la desmineralización ósea en un sujeto.

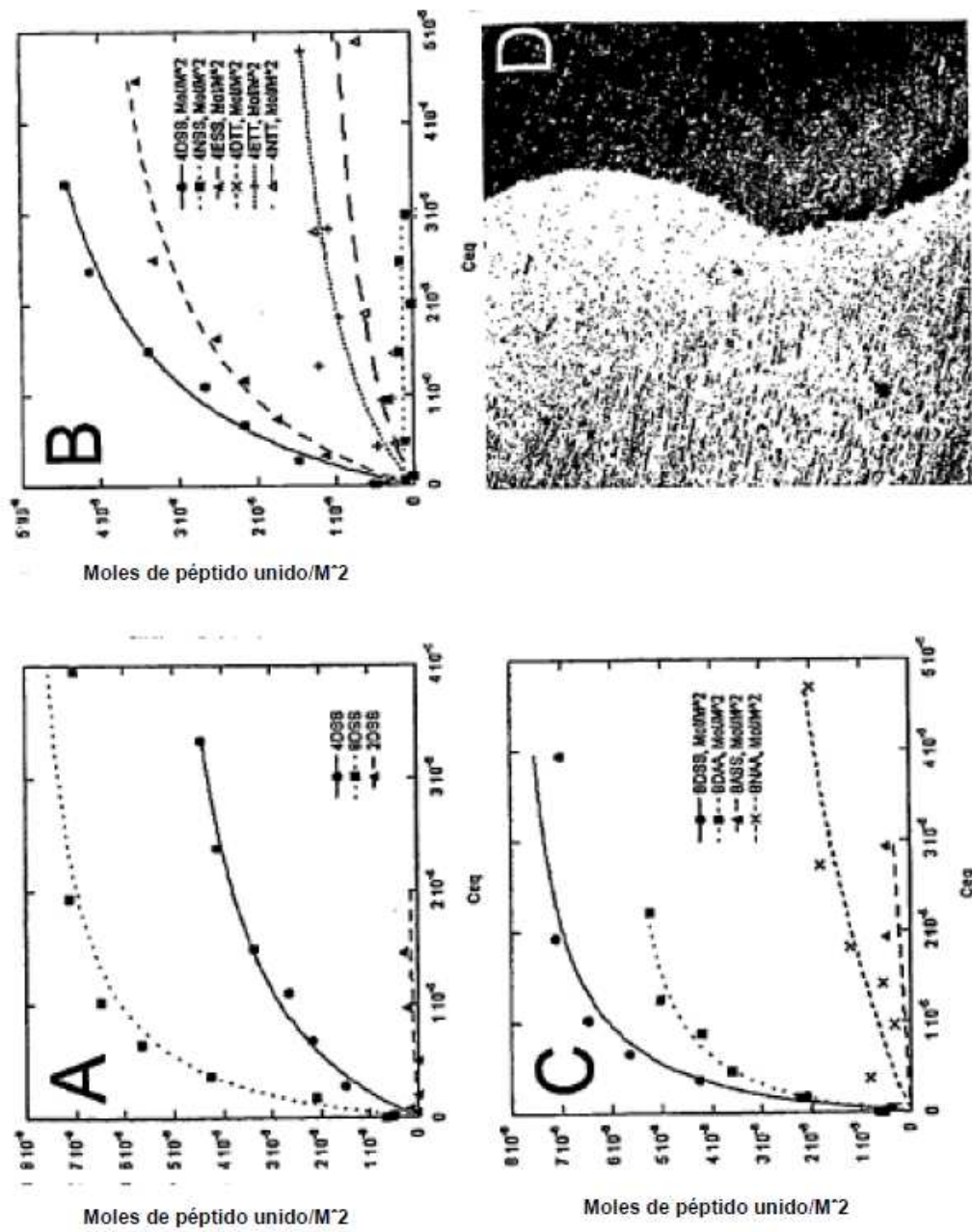


Figura 1

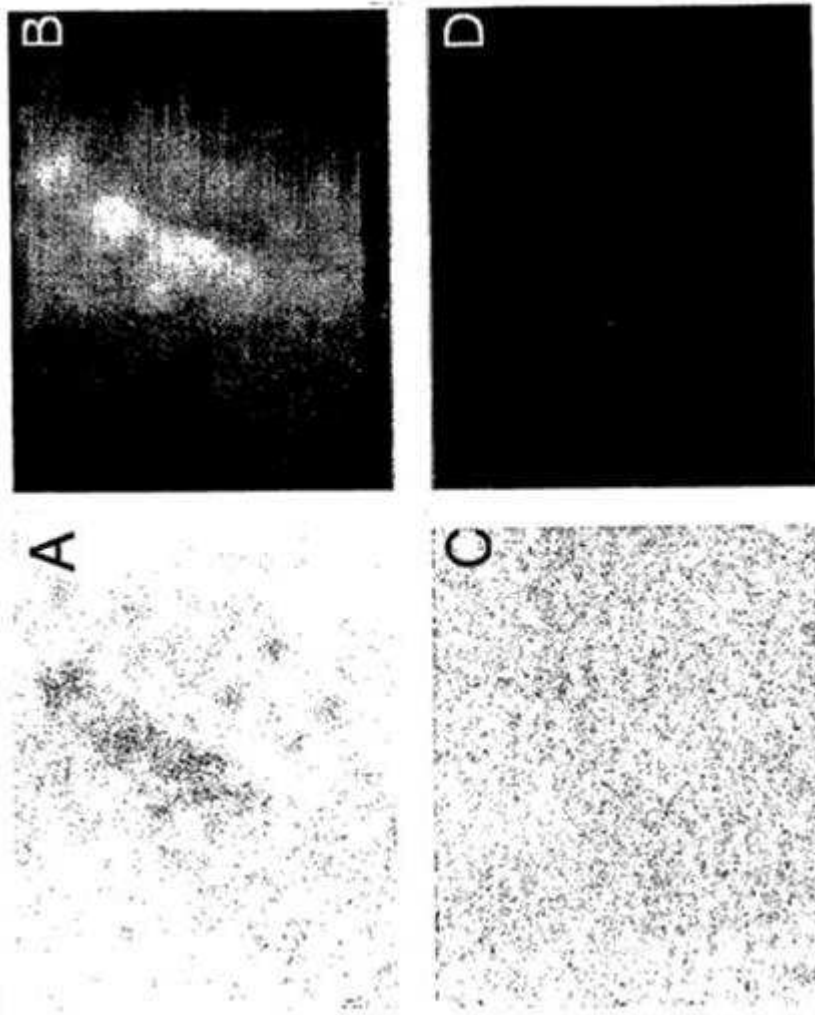


Figura 2

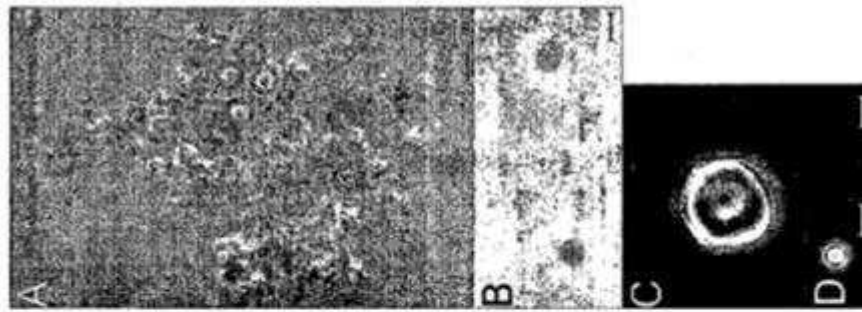


Figura 3

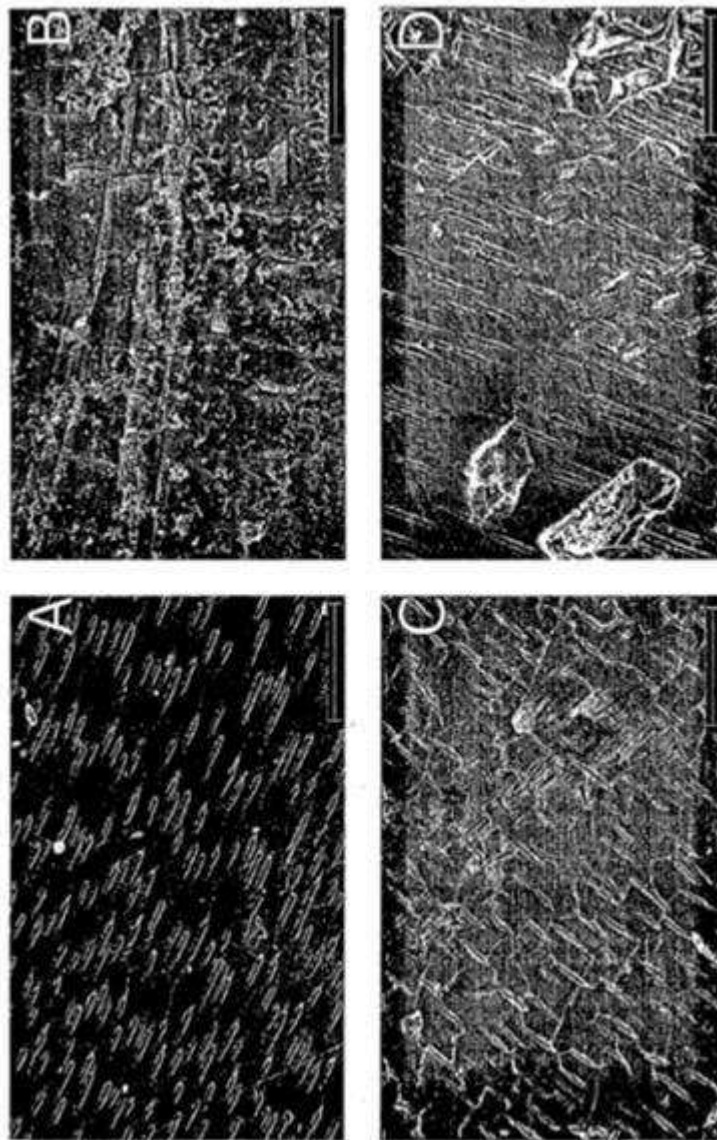


Figura 4

Figura 5

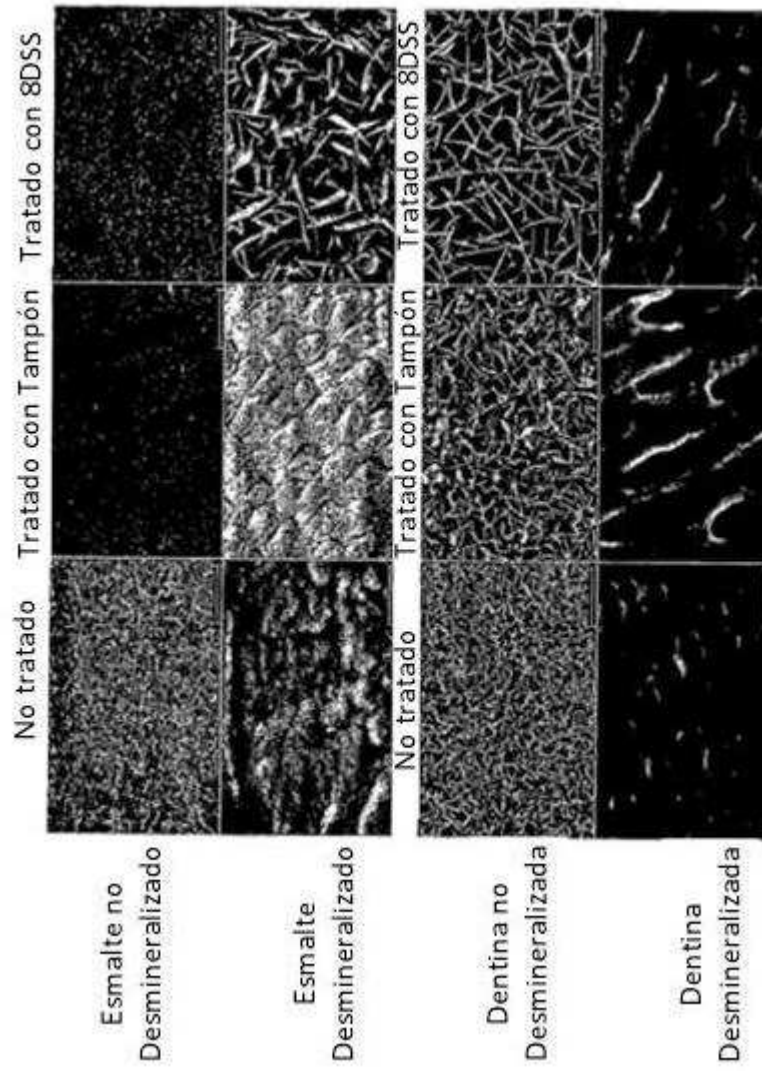
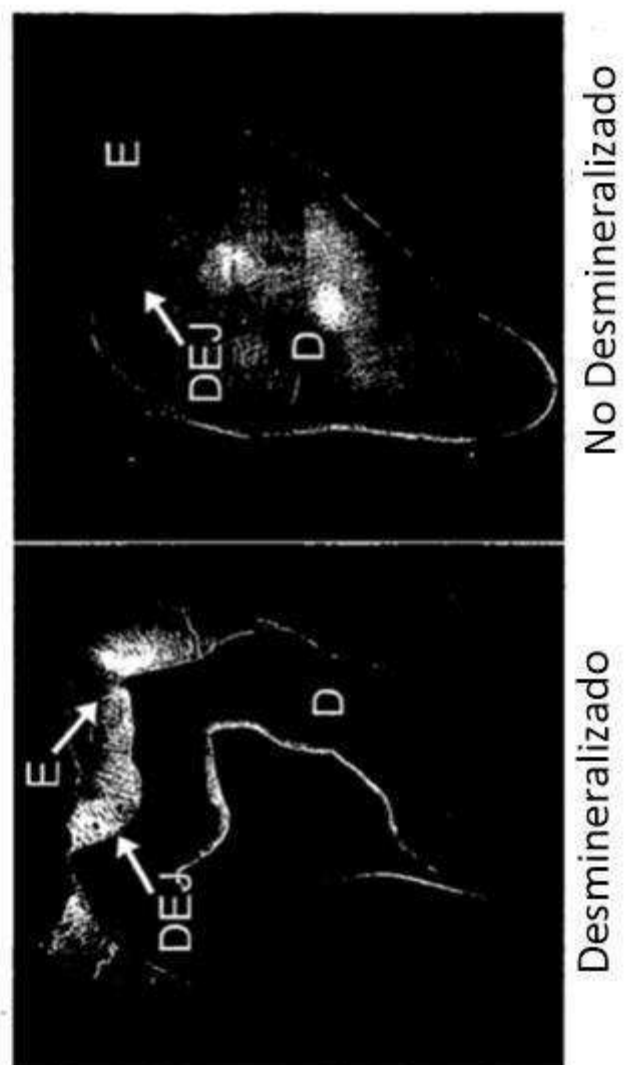


Figura 6



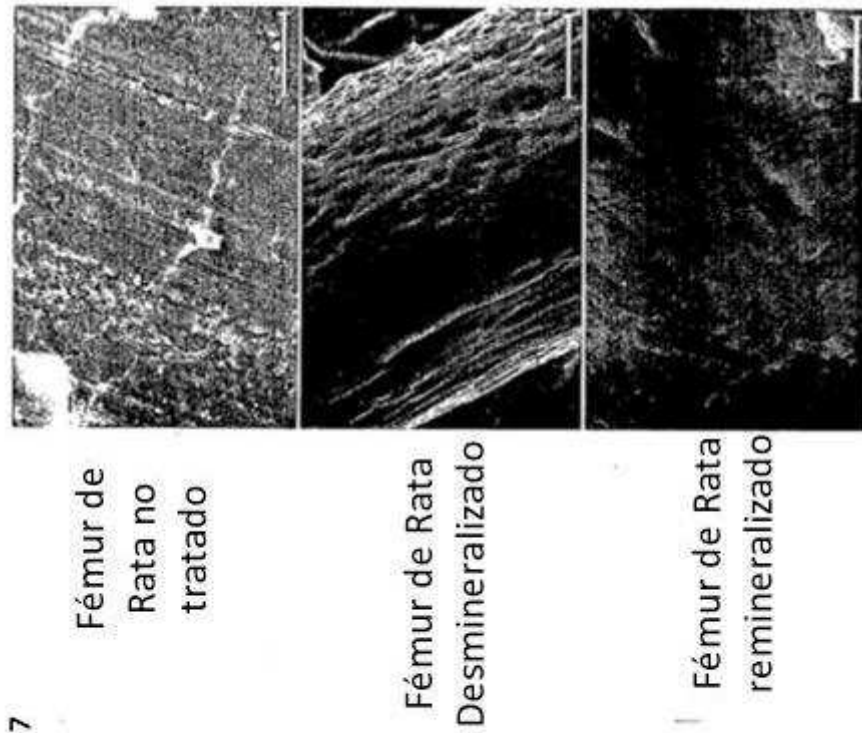


Figura 7

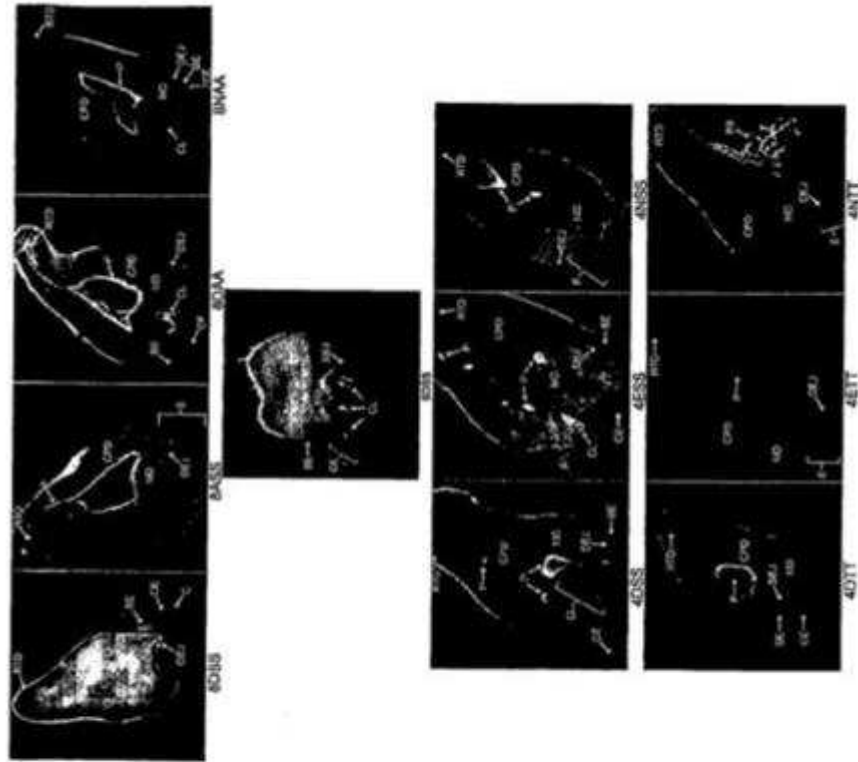
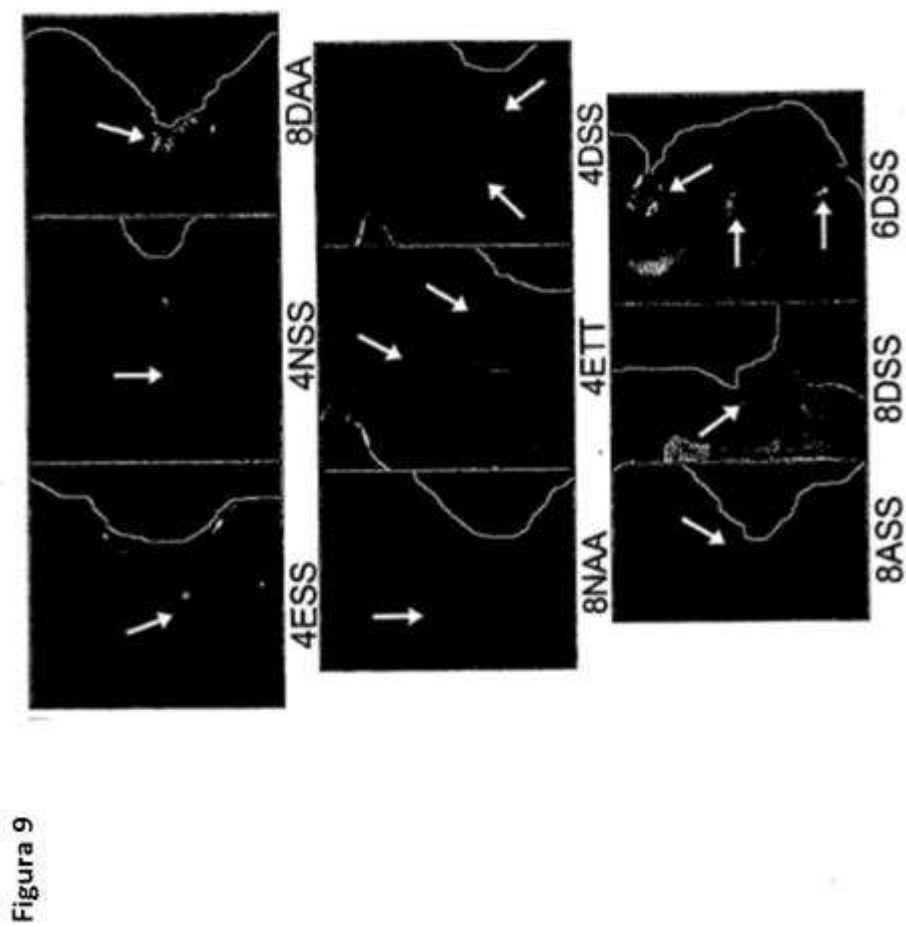


Figura 8



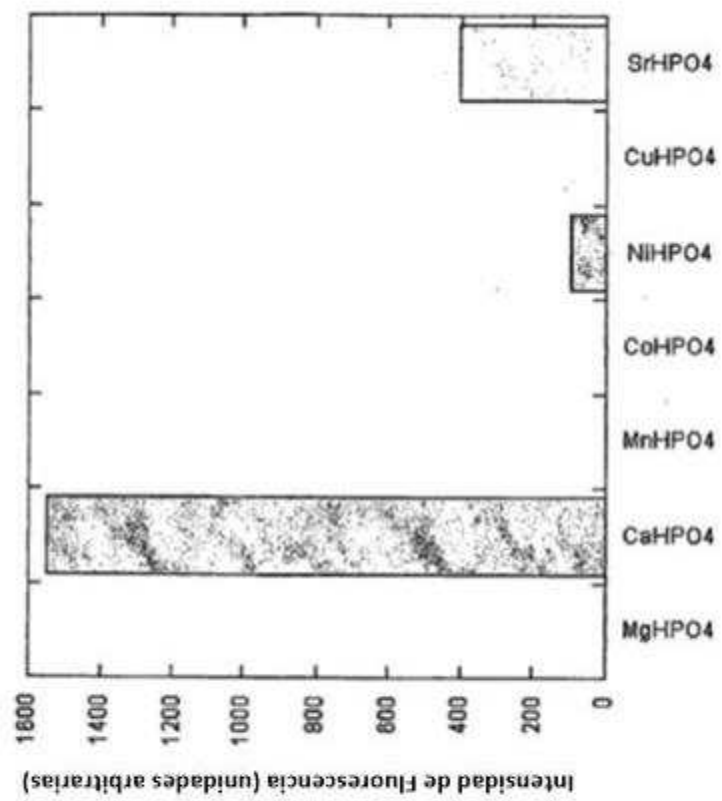


Figura 10

Figura 11

