(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 570 855**

(51) Int. CI.:

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)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2006 E 12170747 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2510936**

(54) Título: **Péptidos de unión al calcio**

(30) Prioridad:

28.09.2005 US 722071 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2016

(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

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 al calcio

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 al calcio tales como fosfoproteína de la dentina (DPP, a menudo denominada como fosfoforina) y amelogenina, DPP es una de las principales proteínas no colágenas encontradas en la matriz extracelular de la dentina y durante mucho tiempo se ha implicado en la nucleación de la hidroxiapatita (HA) durante la mineralización de la dentina (Lee 1980; Lussi 1988; Veis 1998; Hao 2004). La DPP humana se deriva de la escisión proteolítica de sialofosfoproteína de la dentina (DSPP). La 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 (Gu 2000). Las características bioquímicas de DPP se han investigado ampliamente. Estas investigaciones han revelado que DPP inmovilizada causa marcados aumentos en la tasa de nucleación hidroxiapatita, aunque este efecto no se ve con DPP en solución o con DPP desfosforilado. Además, se ha demostrado que altas concentraciones de DPP inhiben el crecimiento de cristales HA (Lussi 1988; Veis 1998; Saito 2000). Además, Gorge et al. (J Biol. Chem. 1996 Doc 20;271 (51):32869-73) describen la repetición de tripletes de aminoácidos del dominio terminal C de fosfoforina. US 6673900 B2 revela un péptido que comprende la secuencia (DSS) 4 y discute el papel de un péptido relacionado para la mineralización de huesos y dientes. US 2005/288299 A1 describe péptidos que comprenden un motivo de aminoácidos de PG, GP, PI o IG y estimulan el desarrollo, mantenimiento y reparación de hueso, cartílago y tejido conectivo asociado.

Resumen

Se proporciona una composición que incluye uno o más péptidos de unión al calcio. Estos péptidos de unión al calcio comprenden la secuencia de repetición de tres aminoácidos $(XYZ)_n$, en donde X es ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina o glutamina, alanina Y y Z, serina o treonina, y n es un número de 3 a 15, en donde dichos péptidos no son fosforilados y en donde dichos péptidos de unión al calcio se unen al fosfato de calcio. Los péptidos de unión al calcio tienen una longitud de hasta 100 aminoácidos. En ciertas realizaciones, n es un número de 2 a 8. En ciertas realizaciones, X es ácido aspártico e Y y Z son serina. En algunas de estas realizaciones, los péptidos de unión al calcio pueden tener la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NOs: 4-10.

En ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio proporcionados en este documento pueden estar unidos a un marcador detectable, seleccionado del grupo que consiste en un fluoróforo, cromóforo, etiqueta de afinidad, etiqueta de antígeno, marcador radioactivo, y marcador de espín, o un péptido antimicrobiano. En ciertas realizaciones, el conjugado o unidad estructural pueden estar unidos a los péptidos de unión al calcio a través de un enlazante de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento. Como se revela en este documento, la administración de estos péptidos de unión al calcio es capaz de inducir la remineralización de la superficie de los dientes.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un defecto óseo caracterizado por la desmineralización ósea o disminución de la densidad ósea en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento. Como se revela en este documento, la administración de estos péptidos de unión al calcio es capaz de inducir la remineralización de las superficies óseas y el aumento de la densidad ósea.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para la identificación de un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento, en donde los péptidos se conjugan con un marcador detectable, y luego la detección de este marcador utilizando ya sea un dispositivo de detección o a simple vista. Como se revela en este documento, estos péptidos de unión al calcio son capaces de unir selectiva o preferencialmente partes del diente que presenta la desmineralización.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para la identificación de un defecto óseo caracterizado por la desmineralización ósea en un sujeto mediante la administración de una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento, en donde los péptidos se conjugan con un marcador detectable, y luego la detección de este marcador utilizando ya sea un dispositivo de detección o a simple vista. Como se revela en este documento, estos péptidos de unión al calcio son capaces de unir selectiva o preferencialmente partes del hueso que presenta desmineralización.

Además, se revelan métodos para la identificación de calcificación en un sujeto en el tejido distinto de los huesos o de los dientes mediante la administración de una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento, en donde los péptidos se conjugan con un marcador detectable y, a continuación, la detección de este marcador utilizando ya sea un dispositivo de detección o a simple vista. Como se revela en este documento, estos péptidos de unión al calcio son capaces de unirse al calcio y el oxalato de calcio. Las calcificaciones que se pueden identificar mediante este método incluyen, por ejemplo, placa arterial, cálculos renales, y sesamoideos. Los péptidos se pueden utilizar para tratar estas calcificaciones inapropiadas, por ejemplo, mediante la conjugación de los péptidos con una unidad estructural terapéutica y utilizando los péptidos para dirigir la unidad estructural terapéutica al sitio de la calcificación.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se proporcionan para su uso en el tratamiento de defectos dentales caracterizados por desmineralización del diente o defectos del hueso caracterizados por la desmineralización ósea. En ciertas realizaciones, estas composiciones se pueden utilizar para detectar o diagnosticar defectos dentales u óseos caracterizados por la desmineralización.

Además, se revelan kits que contienen una composición que comprende los péptidos de unión al calcio revelados en este documento. Los kits pueden incluir instrucciones para uso o administración. Estos kits se pueden utilizar para el tratamiento de defectos dentales caracterizados por desmineralización del diente o defectos del hueso caracterizados por la desmineralización ósea. Estas composiciones se pueden utilizar para detectar o diagnosticar defectos dentales u óseos caracterizados por la desmineralización.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Afinidades de unión de DSS y péptidos variantes de DSS para hidroxiapatita y las superficies de los dientes. A-C. Péptidos marcados con fluoresceína en concentraciones que varían desde 0-100 μM se incubaron con 0.3 mg de nanocristales de hidroxiapatita (arena de superficie específica = 100 m^2/g) durante diez minutos, seguido de la eliminación de la hidroxiapatita por centrifugación. 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 la hidroxiapatita. D. Dientes humanos seccionados sagitalmente se incubaron con péptido 6DSS 12.5 μM, marcado con 5(6) carboxifluoresceína durante diez minutos, seguido de un enjuague. La unión del péptido a la superficie de los dientes se visualizó mediante microscopía de escaneo láser confocal (CLSM) utilizando iluminación láser azul (λ = 488 nm) y un filtro de emisión de FITC. Lado izquierdo, región de color claro: dentina. Lado derecho, región de color oscuro: esmalte.

Figura 2: La unión del péptido 6DSS con nódulos mineralizados de médula ósea de ratón (MBMN). Los cultivos de médula ósea de ratón se cultivaron hasta confluencia, después se trataron durante tres semanas con péptido de control codificado 2.5 μM o 6DSS 2.5 μM. Se obtuvieron imágenes de los cultivos por microscopía de fluorescencia utilizando un conjunto de filtros FITC. A. Imagen de campo claro de MBMN mineralizados de un cultivo tratado con 6DSS. B. Imagen de fluorescencia del campo mostrada en (A). La tinción fuerte (coloración ligera) de la masa de nódulo central indica la unión por el péptido 6DSS marcado con fluorescencia. C. Imagen de campo claro de MBMN mineralizados de un cultivo tratados con péptidos de control codificados. D. Imagen de fluorescencia del campo se muestra en (C), que ilustra tanto la falta de unión del péptido de control con MBMN y la falta de autofluorescencia dentro de las muestras.

Figura 3: Interacción del péptido 8DSS inmovilizado con $CaHPO_4$. Perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina se incubaron con 8DSS conjugado con biotina (A y C) o biotina no conjugada (B) y (D). Las perlas se lavaron y se incubaron en una solución de PBS + $CaCl_2$ 1 mM + $NaHPO_4$ 1 mM durante doce días antes de la obtención de imágenes. A. Micrografías de campo claro de agregados de fosfato de calcio amorfo que se acumularon alrededor de 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 claro de las perlas bloqueadas con biotina representativas (sin péptido DSS). Ninguna cantidad significativa de precipitado se asocia 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 (tener en cuenta el centro esférico del objeto). Estos objetos no se observaron en muestras de control (biotina bloqueada, sin péptido DOSS), como se ilustra en (D). Barras de escala = 4 μm.

Figura 4: Remineralización de superficies del diente con péptidos DSS. Dientes humanos extraídos se seccionaron sagitalmente y se desmineralizaron con gel de EDTA al 19%, durante 1 hora, seguido de inmersión en agua desionizada y ultrasonidos para eliminar el exceso de residuos. Las muestras se trataron como se ha indicado, a continuación, se hicieron imágenes por microscopía electrónica de barrido. Barras de escala = 50 μm. A. Muestras de control desmineralizada. B. Tratadas con 8DSS durante 1 hora, se enjuagaron y desmineralizaron utilizando Desensibilizador Quell. C. Tratadas sólo con solución reguladora, se remineralizan utilizando Desensibilizador Quell. D. Sin tratamiento, se remineralizaron utilizando Desensibilizador Quell.

Figura 5: Nucleación de la hidroxiapatita en las superficies de esmalte (parte superior) y dentina (abajo). Las superficies se prepararon y trataron como se describe en el Ejemplo 6 y como se indica por los marcadores, seguido de la obtención de imágenes utilizando microscopía electrónica de barrido. El grupo superior (dos filas superiores) representa las muestras de esmalte, mientras que el grupo inferior (dos filas inferiores) representa las muestras de dentina. Dentro de cada grupo, la fila superior representa las muestras que no fueron desmineralizadas antes del tratamiento, y la fila inferior representa muestras que se desmineraliza mediante tratamiento con ácido fosfórico. Micrografías electrónicas de barrido se muestran, barras de escala = 10 μM. Columna de la izquierda: las muestras que no se expusieron a ningún tipo de tratamiento antes de la nucleación y crecimiento de cristales. Columna del centro: muestras que fueron expuestas sólo a solución reguladora antes de la nucleación y crecimiento de cristales. Columna derecha: muestras que fueron expuestas al péptido 8DSS 12.5 μM antes de la nucleación y crecimiento de cristales. El crecimiento de cristales indica la nucleación temprana.

Figura 6: Especificidad tisular de la unión del péptido 8DSS y su dependencia de estado mineralización. Las muestras de dientes humanos desmineralizados y no desmineralizados se incubaron con péptido 8DSS 12.5 μM, marcado con 5 (6) carboxifluoresceína como se ha descrito en el Ejemplo 9, y las secciones se enjuagaron y se obtuvieron las imágenes por CLSM. El panel izquierdo muestra el patrón de unión del péptido 8DSS con el tejido desmineralizado. La unión primaria es con el 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 con la dentina (D) con poca o ninguna unión al esmalte (E). La unión dentina-esmalte, DEJ marcada, está claramente delimitada en ambos casos.

Figura 7: Mineralización del hueso. Se obtuvieron fémures de rata a partir de animales sacrificados mediante un protocolo de tejido compartido. Las muestras fueron desmineralizadas, se enjuagaron, y se sometieron a ultrasonido para eliminar los residuos. Las muestras de ensayo se trataron con el péptido 8DSS durante una hora, se enjuagaron, se reminalizaron utilizando desensibilizador Quell como se describe en el Ejemplo 8, a continuación, se obtiene la imagen 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 harvesianos expuestos por la eliminación de la capa de mineral. Parte inferior: hueso tratado con 8DSS y Desensibilizador Quell (una solución acuosa de $CaCl_2/K_2HPO_4$), que muestra el restablecimiento de la capa mineral.

Figura 8: Micrografías de fluorescencia que muestran especificidad de tejido en la unión de péptidos y variantes de DSS. Dientes humanos adultos se expusieron a péptido 12.5 μM, marcado con 5(6)-carboxifluoresceína sin desmineralización, se lavaron extensamente, y se obtienen las imágenes por CLSM. Para cada sección, se recogieron varias exploraciones y se reunieron de 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 utilizados para cada sección se marcaron debajo de cada panel, 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 marcaron de la siguiente manera: RTD = dentina de la punta de la raíz, DPC = dentina circumpulpar; MD = dentina del manto; P = pared de la cavidad 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 para las lesiones de caries en los dientes. Dientes humanos adultos se expusieron a péptido 12.5 uM marcado con 5(6)-carboxifluoresceína sin desmineralización, se lavaron extensivamente, y se obtuvieron las imágenes 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 el lado derecho 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 a diversos precipitados de fosfato inorgánico. Fosfato de sodio 100 mM de (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 péptido 8DSS 12.5 μM, marcado con 5(6)-carboxifluoresceína. Después de una incubación de diez minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron y se obtuvieron las imágenes 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 utilizando el GIMP (www.gimp.org) como se describe en el Ejemplo 11. Los valores normalizados de fluorescencia se representan en este documento. En el eje X, se identifican diversos precipitados de fosfato inorgánico. En el eje Y, se representan los valores de intensidad de fluorescencia relativa.

Figura 11: Unión del péptido 8DSS a oxalato de calcio. Los cristales de oxalato de calcio se expusieron a péptido 8DSS 12.5 μM, se lavaron, y se obtuvieron las imágenes 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 claro (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. La imagen de campo claro (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 pretende simplemente ilustrar la invención. Como tal, las modificaciones específicas discutidas no se deben interpretar como limitaciones sobre el alcance de la invención, será evidente para un experto en el arte que diversos equivalentes, cambios y modificaciones se pueden hacer sin apartarse del alcance de la invención, y se entiende que tales realizaciones equivalentes son para ser incluidas en este documento,

Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se usan en este documento: BE, esmalte basal; CE, esmalte cortical; CL, lesión de caries; CLSM, microscopía confocal de barrido láser; CPD, dentina circumpulpar; D, dentina; DEJ, unión dentina-esmalte; DPP, fosfoproteína de la dentina; E, esmalte; DSPP, sialofosfoproteína de la 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; RDT, dentina de la punta de la raíz; λ, longitud de onda de excitación.

Los aminoácidos se abrevian utilizando el sistema estándar establecido a continuación.

Aminoácido	Abreviatura de una letra	Abreviatura de tres letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Ácido glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Fosfoserina	S_P	Sep
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
tirosina	Y	Tyr

Valina	V	Val

A menos que se indique lo contrario por un prefijo "D", por ejemplo, D-Ala, la estereoquímica del carbono alfa de los aminoácidos y residuos aminoácido en los péptidos revelados en este documento es la configuración natural o "L".

Péptidos de unión al calcio

Los compuestos actualmente disponibles para la remineralización directa de los tejidos descalcificados consisten principalmente de diversas formulaciones de fosfato de calcio libre o unido a proteínas y/o fluoruro de sodio. La mejora de la calcificación de los tejidos biológicos generalmente se logra mediante la manipulación de la señalización celular de las células precursoras de dientes y huesos, o mediante el aumento de la concentración de calcio global utilizando alimentos fortificados con calcio, suplementos dietéticos, u otros tratamientos ricos en calcio libre o unido a proteínas. Estudios previos han descrito una formulación que recluta fosfato de calcio a la superficie del diente para mejorar la remineralización (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,780,844). Sin embargo, no se ha demostrado el aumento de la calcificación por la orientación directa y específicamente de calcio a las superficies.

Se revela en este documento una serie de péptidos pequeños de unión al calcio compuestos de variaciones del motivo Asp-Ser-Ser encontrado en DPP. Se ha demostrado que estos péptidos se unen fuerte y específicamente a las superficies de fosfato de calcio. Además, se han demostrado que estos péptidos reclutan fosfato de calcio a tales superficies y para servir como unidades estructurales de unión para la unión de marcadores fluorescentes para superficies calcificados independientemente de su estado de fosforilación.

Los péptidos revelados en este documento, denominados generalmente como péptidos DSS, se componen de diversos números y/o combinaciones del motivo de tres aminoácidos Asp-Ser-Ser de DPP o variaciones de los mismos. Ejemplos de repeticiones de tres aminoácidos que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a, Asp-Ser-Ser (DSS, SEQ, ID NO. 1), Glu-Ser-Ser (ESS, SEQ, ID NO. 2), Asp-Thr-Thr (DTT, SEQ. ID NO. 3), Glu-Thr-Thr (ETT, SEQ, ID NO. 4), Asn-Ser-Ser (NSS, SEQ, ID NO. 5), Asn-Thr-Thr (NTT, SEQ, ID NO. 6), Gln-Ser-Ser (QSS, SEQ. ID NO. 7), Gln-Thr-Thr (QTT, SEQ. ID NO. 8), y variaciones de los mismos. Alternativamente, o además de estas secuencias de repetición, los péptidos revelados en este documento pueden incluir variaciones menores de estas repeticiones, incluyendo, pero no limitado a Asp-Ser-Thr (DST, SEQ. ID NO. 9), Asp-Ala-Ala (DAA, SEQ. ID NO. 10), o Ala-Ser-Thr (as, SEQ. ID NO. 11). Uno o más residuos de aminoácidos dentro de una repetición de tres aminoácidos puede ser modificada químicamente. Por ejemplo, los péptidos pueden contener uno o más residuos de Ser o Thr en el cual un grupo hidroxilo se ha modificado mediante la adición de un grupo fosfato. Los péptidos pueden variar en longitud de tres a más de cincuenta aminoácidos.

La afinidad de unión de los péptidos revelados en este documento para superficies calcificadas se pueden controlar mediante la alteración de la composición y el número de repeticiones. Por ejemplo, la inclusión de uno o más repeticiones de Asp-Ser-Ser (SEQ. ID NO. 1) aumentará la afinidad de unión del péptido, ya que esta secuencia muestra la más alta afinidad de cualquiera de las repeticiones probadas, la afinidad de unión del péptido también se puede incrementar aumentando el número de tres repeticiones de aminoácidos. Los péptidos que contienen más de seis repeticiones generalmente muestran mayor afinidad de unión que aquellos con menos repeticiones, los péptidos revelados en este documento pueden tener una afinidad de unión (K_A) de hidroxiapatita de más de 15,000 M^{-1}, esta afinidad de unión puede ser mayor que 50,000 M^{-1}, mayor de 100,000 M^{-1}, mayor de 200,000 M^{-1}, y mayor que 300,000 M^{-1}.

Los péptidos pueden contener uno o más aminoácidos adicionales que no son parte de una secuencia de repetición de tres aminoácidos. Por ejemplo, la porción de repetición del péptido se puede fusionar a una secuencia de aminoácidos que tiene una funcionalidad adicional, tal como por ejemplo una secuencia de péptido antimicrobiano tal como las secuencias de péptidos 2c-4, PL135, o b-34. La porción de repetición del péptido se puede fusionar a la secuencia de aminoácidos adicional a través de una secuencia enlazante, tal como por ejemplo una secuencia de triglicina.

Los péptidos revelados en este documento pueden comprender la secuencia $(X\text{-}Y\text{-}Z)_n$, en donde X es un aminoácido seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, alanina y glutamina, Y y Z son aminoácidos seleccionados entre alanina, serina, treonina, fosfoserina, fosfotreonina, y sus derivados, y n es un número entre 1 y 20. n puede estar entre 1 y 15, entre 1 y 10, y entre 3 y 8.

Se ha demostrado que los péptidos de unión al calcio revelados en este documento inducen el crecimiento de cristales de fosfato de calcio en el esmalte desmineralizado y en tanto la dentina desmineralizada como la no desmineralizada, dependiendo de las condiciones de tratamiento. Del mismo modo, se ha demostrado que los péptidos inducen la remineralización del hueso. Por lo tanto, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar para mejorar la mineralización mediante la contratación de partículas de fosfato de

calcio que flotan libremente a superficies calcificadas. Estos péptidos se pueden unir a superficies calcificadas y/o agregados de fosfato de calcio de flotación libre. La unión concurrente de las superficies calcificadas y agregados de flotación libre resulta en aumento de la concentración de fosfato de calcio cerca de la superficie calcificada, lo que conduce a una mayor remineralización de la superficie. Al modular el tamaño y la afinidad de unión de los péptidos, es posible alterar la cantidad de calcio unido a la superficie. La remineralización de los dientes puede traducirse en una oclusión completa o parcial de los túbulos de la dentina.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar para remineralizar un diente, prevenir o ralentizar la desmineralización de los dientes, tratar el daño, defectos, enfermedades o anomalías de los dientes, formar capas de mineral en o debajo de la superficie de un diente, alterar la densidad mineral de un diente, tal como por ejemplo aumentando o disminuyendo la densidad mineral, o sellar un sitio dental. Del mismo modo, estas composiciones se pueden utilizar para tratar un defecto óseo, lesión, tumor, crecimiento anómalo, enfermedad, o pérdida de hueso, causar la formación de capas minerales en o por debajo de la superficie de un hueso, o alterar la densidad de un hueso tal como, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la densidad. En estas aplicaciones, una composición que comprende uno o más péptidos de unión al calcio como se describió anteriormente se aplica en o cerca del sitio del hueso o huesos afectados. Composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar para tratar la calcificación, lesiones calcáreas, o defectos de mineralización en los tejidos y órganos distintos de los huesos, incluyendo la placa arterial.

“Tratar" o "tratamiento" de una condición, como se usa en este documento se puede referir para prevenir o reparar la condición, retrasar o retardar la aparición o la velocidad de desarrollo de la condición, reduciendo el riesgo de desarrollar la condición, prevenir o retrasar el desarrollo de los síntomas asociados con la condición, reducir o acabar con los síntomas asociados con la condición, generando una regresión completa o parcial de la condición, o alguna combinación de los mismos.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar como un medio para la unión específica de unidades estructurales químicas deseables o partículas para superficies calcificadas, tales como las de huesos y dientes. A diferencia de los enfoques actuales para la remineralización de las superficies dentales que dependen de la inundación de la cavidad oral con formulaciones de calcio libre o unido a proteínas, estos compuestos causan agregados de fosfato de calcio para adherirse específicamente a la superficie del diente, lo que aumenta la concentración local de calcio y fosfato y aumentando la probabilidad de que este fosfato de calcio se incorporará en regiones desmineralizadas del diente. Terapias farmacéuticas actuales de lesiones o enfermedades de los tejidos calcificados confían en que rodea la zona de la superficie deseada, ya sea directamente (tópicamente) o por administración sistémica, con soluciones libres del compuesto terapéutico de interés en la esperanza de que alguna fracción interactuará con la superficie calcificada.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar en ensayos *in situ* e *in vivo* para la calcificación inadecuada. Por ejemplo, estas composiciones se pueden utilizar para diagnosticar, identificar, localizar o tratar la calcificación, lesiones calcáreas, o defectos de mineralización de los tejidos y órganos distintos del hueso, incluyendo, por ejemplo, placa arterial, cálculos renales, o sesamoideos. Los ensayos actualmente en uso para determinar la presencia de la calcificación incluyen métodos de unión con colorantes, 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 con colorante, una muestra se expone a un colorante fluorescente de quelación de calcio, tal como tetraciclina, calceína, o alizarina, y la incorporación del colorante en el tejido de interés se visualiza. 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) también se puede usar para identificar los sitios de calcificación, pero este método no se puede aplicar *in vivo* y está sujeto a niveles significativos de la tinción de fondo. La incorporación de isótopos radiactivos tales como ^{45}Ca proporciona información precisa y cuantitativa acerca de 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 la transmisión de rayos X proporciona una alta resolución espacial y se puede lograr en animales vivos, pero no puede identificar de manera única los depósitos de calcio entre las diversas otras características visibles en una imagen de rayos X. El análisis químico cuantitativo *in vitro* de depósitos de calcio proporciona determinaciones robustas del tipo y la cantidad de mineral presente, pero estos métodos requieren de mucho trabajo y resultan en la pérdida de información acerca de la ubicación y la estructura del tejido implicado.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento pueden ser etiquetados con fluorescencia o de otra manera y utilizados como un medio mejorado de visualizar regiones calcificadas en un tejido de interés. Estos péptidos se pueden sintetizar fácilmente con altos rendimientos, y que han mejorado la seguridad, toxicidad y facilidad de uso en comparación con los métodos actualmente disponibles. La secuencia o composición del péptido se pueden alterar para cambiar la afinidad relativa del péptido de tipos de tejido o superficie específicos. Esto permitirá que el péptido discrimine entre la dentina, esmalte, hueso y otros tejidos o superficies calcificados, y entre tejidos sanos y enfermos. Esta propiedad permite que estos compuestos sean utilizados como

sondas para heridas o lesiones patológicas en el tejido calcificado. Los péptidos se pueden utilizar solos, o en conjunción con otros métodos conocidos para la detección de calcificación. En contraste con los fluoróforos de unión al calcio disponibles en la actualidad, que están limitados a los que pueden quelar iones de calcio al tiempo que conserva su fluorescencia, los péptidos descritos en este documento pueden estar unidos a cualquier fluoróforo. Esto expande en gran medida la paleta de colores que se pueden utilizar 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 fluorescente, colorimétrico, radiactivo, RMN-activa, u otros colorantes o indicadores y el tratamiento de muestras biológicas con estos conjugados, se hace posible hacer observaciones cuantitativas de la medida 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 una menor tinción de fondo que los métodos de tinción de iones de plata/von Kossa. La amplia variedad de marcadores que se puede conectar a estos péptidos de unión al calcio ofrece una gran flexibilidad en lo que respecta 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 llevar a cabo las investigaciones biológica, de biomedicina, biotecnología, medio ambiente, y otras.

Los péptidos descritos en este documento tienen un 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 revelados en este documento se pueden utilizar para detectar tales eventos sin dependencia en el ojo humano. Se ha demostrado que los péptidos DSS revelados en este documento se orientan específicamente al esmalte desmineralizado y la dentina no desmineralizada. En particular, estos péptidos han exhibido la capacidad de unirse preferencialmente a lesiones de dientes con caries. Además, diversas variantes de péptidos DSS han exhibido la capacidad de orientarse a subporciones precisas de la estructura del diente, tal como por ejemplo la dentina de la punta de la raíz, esmalte basal, dentina del manto, esmalte cortical, y la superficie de esmalte. Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio conjugados con diversas unidades estructurales detectables, tales como por ejemplo fluorescente, colorimétrico, radiactivo, RMN-activa u otros colorantes o indicadores, se pueden administrar a un sujeto para orientarse a partes específicas del diente y para identificar las partes del diente que presentan la desmineralización u otros daños. La composición de aminoácidos de los péptidos se puede seleccionar de tal manera que los tipos específicos de tejido o daño en los tejidos pueden ser el objetivo. El uso de estos péptidos permitirá la identificación específica de las regiones dañadas incluyendo aquellos que pueden haber sido demasiado pequeños para ver o de otra manera oculta, lo que aumenta en gran medida la facilidad y precisión en el diagnóstico de estas lesiones. Del mismo modo, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar como agentes de contraste para rayos X, tomografía computarizada u obtención de imágenes de resonancia magnética.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar para orientar los compuestos terapéuticos a las superficies de 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 puede unir al péptido, conjugación de un compuesto terapéutico a uno de estos péptidos se pueden utilizar para localizar el compuesto terapéutico a una superficie calcificada, lo que aumenta la concentración local del compuesto y una mayor eficacia. 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 que no son objeto de efectos potencialmente dañinos del compuesto. La composición o la longitud del péptido se pueden ajustar para permitir la orientación específica a las regiones lesionadas o enfermas del tejido.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden utilizar para tratar una infección microbiana, tal como por ejemplo una infección bacteriana. Los péptidos se pueden unir a un péptido antimicrobiano, tal como por ejemplo un péptido 2c-4, B-34, o PL-135 (SEQ ID NOs: 26, 30, y 32, respectivamente).

Basándose en la capacidad de los péptidos de unión al calcio descritos en este documento 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. Del mismo modo, estas composiciones se pueden utilizar para controlar la deposición de minerales de calcio en, por ejemplo, aplicaciones industriales, fabricación, médica, de investigación, de uso doméstico, o personal. Además, estas composiciones se pueden emplear para determinar la presencia o cantidad de diversos minerales de calcio, por ejemplo, cultivos celulares, tejidos, animales experimentales, sujetos humanos experimentales, u otras aplicaciones de investigación.

Los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden unir directa o indirectamente, ya sea de forma covalente o no covalente, a uno o más conjugados o unidades estructurales. Tales conjugados son unidades estructurales que incluyen, pero no se limitan a, otros péptidos, polipéptidos, proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, compuestos organometálicos, unidades estructurales

terapéuticas, tales como por ejemplo un agente anticáncer o antimicrobiano. Otros ejemplos de conjugados o unidades estructurales que se pueden unir con los péptidos de unión al calcio revelados en este documento 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 al calcio o un conjugado o unidad estructural de unión se puede sustituir con un isótopo radiactivo o activo-RMN. La unión entre un péptido de unión al calcio y un conjugado o unidad estructural se puede producir en el extremo amino del péptido, el extremo carboxi terminal del péptido, o a través de un sitio interno en el péptido. El péptido se puede unir a un conjugado o unidad estructural a través de un enlazante de aminoácidos, tal como por ejemplo una secuencia enlazante de triglicina.

Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio revelados en este documento se pueden administrar a través de cualquier método conocido en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, oral, parenteral, transdérmica, aerosol, o enteral. La administración "oral" se puede realizar utilizando una pasta de dientes, gel, colutorio, enjuague bucal, pastilla, comprimido, cápsula, gel, o polvo. Alternativamente, las composiciones se pueden incorporar en alimentos, goma de mascar, dulces, o una bebida. "Parenteral" se relaciona con una vía de administración que se asocia generalmente con la inyección, incluyendo infusión infraorbital, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal, o transtraqueal. La administración "transdérmica" se puede llevar a cabo utilizando una crema tópica, ungüento, o pomada, o por medio de un parche transdérmico. En aquellas aplicaciones en donde las composiciones se utilizan para tratar una afección dental o alterar las características de los dientes tales como la densidad mineral, se puede administrar en o cerca del sitio del diente diana o afectado. Del mismo modo, cuando la composición se está utilizando para tratar una afección ósea o para alterar las características de los huesos, se puede administrar en o cerca del sitio del hueso diana o afectado.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es solo para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención. Un experto en el arte puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención. Se entenderá que muchas variaciones se pueden hacer en los procedimientos revelados en este documento mientras que aún permanecen dentro de los límites de la presente invención. Es intención de los inventores de que tales variaciones estén incluidas dentro del alcance de la invención.

Ejemplos

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

Se generaron cuatro péptidos DSS que contienen dos (2DSS, SEQ ID NO: 12), cuatro (4DSS, SEQ ID NO: 13), seis (6DSS, SEQ ID NO: 14), u ocho (8DSS, SEQ ID NO: 15) repeticiones Asp-Ser-Ser (DSS). Los péptidos se marcaron con fluoresceína, y diversas concentraciones de los péptidos marcados (0-100 μM) fueron mezcladas con una cantidad fija (0.3 mg) de nanocristales de hidroxiapatita que tienen un área de superficie específica de 100 m^2/g (Berkeley Advanced Biomateriales, 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 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_0) [$P_{unido} = (A_f/A_i)\ P_0$]. 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 isotermas resultantes se ajustan a la isoterma de Langmuir ($x/m = (K_A N_{Max} C_{eq})/(1 + K_A C_{eq})$) (Calis 1995), que describe la actividad de unión de una molécula en términos de una combinación de la afinidad de unión (K_A) y avidez (N_{Max}). K_A representa la constante de afinidad del péptido para la superficie de la hidroxiapatita. En esta ecuación, x/m representa la cantidad molar de péptido unido por unidad de área de la superficie de hidroxiapatita, N_{Max} representa la concentración máxima de la superficie (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 de que 1) todos los sitios de unión tienen la misma afinidad por el péptido, y 2) el péptido formará una monocapa sobre la superficie, pero no se puede acumular a niveles más altos. El excelente ajuste de la isoterma de Langmuir a los datos experimentales valida estas condiciones, y las constantes de afinidad se utilizaron para las comparaciones entre los péptidos. Como se muestra en la Figura 1A, la afinidad de unión de los diversos péptidos de hidroxiapatita aumentó con un aumento en el número de repeticiones de DSS (2DSS, KA = 57,000 M^{-1}; 4DSS, K_A = 94.000 M^{-1}; 8DSS, K_A = 300000 M^{-1}).

Se ensayaron diversas variantes de péptidos DSS para determinar el efecto de diversas 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, SEQ. ID NO. 16), tres péptidos de cuatro repeticiones que contienen grupos hidroxilo más impedidos estéricamente en la segunda y tercera posiciones (4DTT, SEQ. ID NO. 17;. 4NTT, SEQ ID NO 18;. y 4ETT, SEQ ID NO 19), un péptido de cuatro repeticiones que carece de un grupo cargado en la primera

posición (4NSS, SEQ ID NO 20), un péptido de ocho repeticiones que carece de un grupo cargado en la primera posición (8ASS, SEQ ID NO 21..), y dos péptidos de ocho repeticiones que carecen de grupos hidroxilo en la segunda y tercera posiciones (8DAA, SEQ ID NO 22;.. 8NAA, SEQ ID NO. 23). Mediante la comparación de las isotermas de unión de cada una de estas variantes de péptidos que contienen DSS del mismo tamaño, se determinó que la eliminación del residuo cargado negativamente (4NSS, K_A = 41,000 M^{-1}; 4NTT, K_A = 18,000 M^{-1} ; 8ASS, K_A = 170,000 M^{-1}) (Figura 1B, 1C) o la sustitución de los residuos de serina con treonina o alanina (4DTT, K_A = 161,000 M^{-1}; 4ETT, K_A = 61.000 M^{-1}; 8DAA, K_A = 300,000 M^{-1}) (Figura 1B, 1C) disminuyó significativamente la actividad de unión. La sustitución de tanto el residuo ácido en la primera posición como las serinas condujo a una pérdida casi total de la afinidad de unión (4NTT; 8NAA, K_A = 20,000 M^{-1}) (Figura 1B, 1C). La sustitución del residuo de ácido aspártico con un residuo de ácido glutámico causó sólo una ligera disminución en la unión de afinidad (4ESS, K_A = 81,000 M^{-1}) (Figura 1B). Estos datos sugieren que tanto la unidad estructural ácido y las repeticiones de serina son cruciales para la avidez de estos péptidos para superficies de hidroxiapatita. Se encontró que DSS fue la secuencia de repetición óptima para la generación de actividad de unión a hidroxiapatita, con todos los péptidos variantes mostraron la unión reducida notablemente a hidroxiapatita *in vitro*.

Un péptido DSS cuatro repeticiones parcialmente fosforilada (4DSpS, SEQ ID NO: 25) también fue examinado y se demostró que tiene una afinidad de unión por hidroxiapatita similar a la de 4DSS (K_A = 83,000 M^{-1}, en comparación K_A = 94,000 M^{-1} para 4DSS). Sin embargo, el péptido 4DSPS tenía un número significativamente mayor de sitios de unión disponibles en la superficie de HA (N_{Max} = 1.2x10^{-7} mol/m^2 para 4DSPS frente 5.8x10^{-8} mol/m^2 para 4DSS).

Ejemplo 2: Unión de péptidos DSS a los dientes:

Con el fin de demostrar la unión de péptidos DSS al tejido biológico, dientes humanos sagitalmente seccionados se incubaron durante diez minutos en una solución del péptido 6DSS 12.5 μM, marcado con 5(6) carboxifluoresceína que contiene NaCl 10 mM y HEPES 50 mM, pH 7.0. Las muestras control se prepararon sin el péptido. Las muestras se lavaron después del tratamiento y se obtuvieron las imágenes por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) utilizando iluminación láser azul (longitud de onda de excitación (λ) = 488 nm) y un filtro de emisión de FITC. La tinción fluorescente intensa indicó que 6DSS se une a la superficie del diente (Figura 1D). Las secciones de control tratadas de forma simulada no presentaron fluorescencia. La unión del péptido se limita 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:

Los cultivos de médula ósea de ratón se cultivaron hasta la confluencia en DMEM + FBS al 10%, después se trataron de forma continua durante tres semanas ya sea con 6DSS 2.5 μM, marcado con 5(6)-carboxifluoresceína o péptido # 3 -1 2.5 μM, marcado con 5(6) carboxifluoresceína (péptido control codificado, SEQ. ID NO. 24) en aMEM+10% FBS con 50 μg/mL de ácido ascórbico y β-glicerofosfato 4 mM. Se obtuvieron las imágenes por microscopía de fluorescencia de los cultivos utilizando un conjunto de filtro de excitación/emisión de FITC, y se obtuvieron imágenes tanto de campo claro como de fluorescencia. Se observó una fuerte tinción 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 se une específicamente a nódulos mineralizantes en los cultivos de médula ósea de ratón.

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

Perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina con un diámetro promedio de 4 μm (Spherotech P.L.C.) se incubaron ya sea con el péptido 8DSS conjugado con biotina o sin conjugar 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 + $CaCl_2$ 1 mM + $NaHPO_4$ 1 mM durante doce días antes de obtener la imagen. 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 y no se 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 recubrir 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 se desmineralizaron con 19 % de gel de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) durante una hora, seguido por la inmersión en agua desionizada y ultrasonicación para eliminar el exceso de residuos. Las muestras se trataron con péptido 8DSS 12.5 μM en solución reguladora HEPES 50 mM (pH 7.0), solución reguladora sola (sin péptido), o se dejaron sin tratamiento. Después de una hora, las muestras se desmineralizaron 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 obtener la imagen 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 de forma simulada y sin tratar mostraron niveles muy inferiores de acumulación de precipitado mineral, con túbulos dentinarios 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 seccionados sagitalmente (obtenidos después de la extracción durante la práctica clínica normal) se pulieron utilizando una rueda de trituración Streurs, y preparados 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 residuos que quedaron del corte y la trituración y/o desmineralización. Las muestras se trataron con 8DSS 12.5 μM disuelto en solución reguladora HEPES 50 mM (pH 7.0), solución reguladora sola, o se 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 la 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	0

La superficie del esmalte no desmineralizada, no tratada, y tratada con solución reguladora permaneció en gran parte amorfa, 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 (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 solución reguladora. 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 (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 utilizar 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 utilizar, por ejemplo, para tratar la sensibilidad del diente debido a la exposición de los túbulos dentinarios, para remineralizar caries de implicadas en la dentina desbridada mecánicamente, o para reparar superficies dentarias fracturadas.

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

Dientes humanos sagitalmente seccionados fueron ya sea desmineralizados mediante la incubación con EDTA 0.5 M, durante 15 minutos o se dejaron sin desmineralizar. Las muestras se incubaron después durante diez minutos en una solución de 8DSS 12.5 μM marcado con 5(6)-carboxifluoresceína, NaCl 10 mM, y HEPES 50 mM, pH 7.0. Las muestras control se incubaron sin péptido. Las secciones se enjuagaron y se obtuvieron las imágenes por CLSM utilizando 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 de un 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:

Con el fin de 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 siguiendo 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 ultrasonicación para eliminar el exceso de residuos. Las muestras de ensayo se trataron después con el péptido 8DSS durante una hora, se enjuagaron, y la mitad de las muestras se desmineralizaron utilizando el Desensibilizador Quell (Pentron Clinical Technologies, LLC) como se describe en el Ejemplo 5. Todas las muestras se prepararon después para SEM y se obtuvieron las imágenes 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, después del tratamiento con 8DSS 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 la del tejido dental.

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

Con el fin de investigar la especificidad 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 obtuvieron las imágenes por CLSM como se describió en el Ejemplo 2. Los péptidos utilizados para estos experimentos fueron 8DSS, 8ASS, 8DAA, 8NAA, 4DSS, 4ESS, 4NSS, 4DTT, 4ETT, 44NTT, y 6DSS. 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 (12.5 μM) que contienen NaCl 10 mM y HEPES 50 mM, pH 7.0. Las muestras control se prepararon sin el péptido. Las muestras se lavaron extensivamente después del tratamiento y se obtuvieron las imágenes por CLSM utilizando iluminación láser azul (λ=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 niveles de unión más altos a las superficies de los dientes, con 6DSS y 8DSS mostrando los mayores niveles de tinción. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 8. 8DSS, 6DSS, y 4DSS 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. La unión significativa se observó además en los bordes de la cavidad pulpal. 8ASS, 4ESS, y 4NSS presentaron patrones similares, aunque a niveles de unión inferiores. 8DAA 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 mostró poca o ninguna unión a la dentina del manto, la dentina circumpulpar, esmalte basal. 4DTT y 4ETT presentaron patrones de unión similares a los de 4DSS y 4ESS, aunque en niveles rápidamente reducidos. 8NAA 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 mostró fuerte unión a un fragmento de hueso periodontal unido a la muestra, pero muy bajos niveles de unión al tejido dental sano. Estos resultados sugieren que las capas específicas del diente se pueden orientar con alta especificidad utilizando 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 utilizando el protocolo descrito en el Ejemplo 2. Las secciones se lavaron extensivamente y se obtuvieron las imágenes por CLSM utilizando 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 tejido cariado. 4ESS, 4NSS, 8DAA, 8NAA, 4ETT, 4DSS, 8ASS, 8DSS, y 6DSS 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 basándose en estos resultados se presume la unión a las lesiones cariadas. De los péptidos, 4ESS, 4NAA, 8DSS, 6DSS, 4DSS, 8DAA, y 8ASS presentaron tinción excepcionalmente fuerte de las lesiones cariadas con relativamente unión débil (frecuentemente ausente completamente) 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 utilizar 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 utilizar 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 fosfato de sodio 100 mM (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 HEPES 50 mM pH 7.0, NaCl 10 mM, y péptido 8DSS 12.5 μM, marcado con 5(6)-carboxifluoresceína. Cada muestra se incubó durante diez minutos a temperatura ambiente, después se lavó dos veces con una solución de HEPES 50 mM pH 7.0 y NaCl 10 mM, se resuspendió en la misma solución reguladora, y se obtuvo una imagen por microscopía de fluorescencia. Se utilizaron parámetros idénticos del microscopio y la cámara 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 utilizando el GIMP (http://www.gimp.org) como sigue. Utilizando 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 ($I_{tinción}$) con 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 (con el fin de corregir los altos niveles de ruido presentes en las muestras con niveles de tinción muy bajos) utilizando la ecuación: Fluorescencia relativa=$(I_{tinción}/I_{fondo})$ *$(I_{tinción}/I_{fondo})$. Aunque, se observó un pequeño nivel de tinción en agregados de $NiHPO_4$, los mayores niveles de tinción se observaron en $CaHPO_4$ y agregados $SrHPO_4$ químicamente similares (Figura 10). Esto demuestra que la unión de los péptidos DSS no es un fenómeno de 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:

Se preparó oxalato de calcio utilizando un método descrito previamente (Wang 2006). Los cristales de oxalato de calcio se lavaron con agua desionizada, se resuspendieron después en una solución que contiene HEPES 50 mM pH 7.0, NaCl 10 mM, y péptido 8DSS 12.5 μM marcado con 5(6)-carboxifluoresceína. 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 HEPES 50 mM pH 7.0 y NaCl 10 mM, 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 utilizar 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:

Con el fin de determinar la idoneidad de los péptidos DSS para servir como unidades estructurales 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 enlazante de triglicina (GGG), y un péptido antimicrobiano 2c-4 (SEQ ID NO:26) (J. He, sin publicar). Las secuencias de las proteínas de fusión se muestran en SEQ ID NOs: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 ~$1X10^5$ ufc/mL en medio de caldo Todd-Hewitt (TH) y se 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. Se transfirieron las alícuotas en placas de 96 pozos (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, como se mide 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 unidad estructural $(DSS)_4$ 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 unidad estructural $(DSS)_4$ 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 unidad estructural $(DSS)_4$ para inhibir de cierta actividad. No obstante, alguna actividad antimicrobiana se retiene mediante este péptido.

Alternativamente, la conjugación de una unidad estructural $(DSS)_6$ con el péptido antimicrobiano b-34 (SEQ ID No:30) (J. He, sin publicar) para generar el péptido 6DSS-b-34 (SEQ ID NO:31) conduce a una mejoría en la actividad antimicrobiana por encima del péptido parental (MIC= 3.1 μM para 6DSS-b-34 contra 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*. Aun en otra alternativa, el péptido PL-135 (SEQ ID NO: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 unidad estructural $(DSS)_5$ para generar el péptido 5DSS-PL135 (SEQ ID NO: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.

Esto muestra que otros compuestos pueden mantener su actividad cuando se conjugan con péptidos DSS. Además, esto demuestra que los compuestos pueden ser generados fácilmente que sólo tienen una actividad significativa en la presencia de un péptido DSS diana, lo que sugiere un medio fácil de desarrollar compuestos que sólo son activos en superficies calcificadas (hueso, diente, etc.) y son inertes en otros entornos. Tales compuestos representarían un gran paso de avance en la mejora de la seguridad y eficacia de los enfoques terapéuticos para trastornos de los tejidos mineralizados.

REFERENCIAS

1. Calis, S., et al. 1995. Pharm Res 12:1072-1076.

2. Coe, F.L., et al, 2005. J Clin Invest 115:2598-2608.

3. Cross, K,J., et al. 2005. J Pept Res 66:59-67.

4. Gu, K., et al. 2000. Eur J Oral Sci 108:35-42.

5. Hao, J., et al. 2004. Bone 34:921-932.

6. Lee, S.L., et al, 1980. Int J Pept Protein Res 16:231-240.

7. Lussi, A., et al. 1988. Arch Oral Biol 33:685-691.

8. Qi, F., et al. 2005. FEMS Microbiol Lett 251:321-326.

9. Saito, T., et al. 2000. J Bone Miner Res 15:1615-1619.

10. Veis, A., et al. 1998. Eur J Oral Sci 106 Suppl 1:234-238.

11. Wang, L., et al. 2006. Langmuir 22:7279-7285.

Se revelan además los siguientes ítems:

El ítem 1 se relaciona con una composición que comprende uno o más péptidos de unión al calcio, en donde dichos péptidos de unión al calcio comprenden cada uno la secuencia $(X\text{-}Y\text{-}Z)_n$, en donde X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, alanina y glutamina, Y Z son aminoácidos seleccionados entre alanina, serina, treonina, fosfoserina y fosfotreonina y n es un número de 1 a 40, y en donde dichos péptidos de unión al calcio se unen al fosfato de calcio.

El ítem 2 se relaciona con la composición del ítem 1, en donde en donde dicho uno o más péptidos de unión al calcio tiene una longitud de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos.

El ítem 3 se relaciona con la composición del ítem 1, en donde n es un número desde 2 a 8.

El ítem 4 se relaciona con la composición del ítem 1, en donde X es ácido aspártico.

El ítem 5 se relaciona con la composición del ítem 4, en donde Y y Z son serina.

El ítem 6 se relaciona con la composición del ítem 5, en donde dichos péptidos de unión al calcio tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N0: 12.

El ítem 7 se relaciona con la composición del ítem 5, en donde dichos péptidos de unión al calcio tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N0: 13.

El ítem 8 se relaciona con la composición del ítem 5, en donde dichos péptidos de unión al calcio tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N0: 14.

El ítem 9 se relaciona con la composición del ítem 5, en donde dichos péptidos de unión al calcio tienen la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N0: 15.

El ítem 10 se relaciona con la composición del ítem 1, en donde dichos péptidos de unión al calcio comprenden además un conjugado.

El ítem 11 se relaciona con la composición del ítem 10, en donde el conjugado se selecciona del grupo que consiste en un fluoróforo, cromóforo, etiqueta de afinidad, etiqueta de antígeno, marcador radiactivo, o marcador de espín.

El ítem 12 se relaciona con la composición del ítem 10, en donde dicho conjugado se selecciona del grupo que consiste en un péptido, proteína, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, compuesto orgánico, compuesto inorgánico o compuesto organometálico.

El ítem 13 se relaciona con la composición del ítem 10, en donde dicho conjugado es un compuesto contra el cáncer o antimicrobiano.

El ítem 14 se relaciona con la composición del ítem 13, en donde el compuesto antimicrobiano es un péptido antimicrobiano.

El ítem 15 se relaciona con la composición del ítem 14, en donde dicho péptido antimicrobiano está unido a dicho uno o más péptidos de unión al calcio a través de una secuencia enlazante de aminoácidos.

El ítem 16 se relaciona con un método de tratamiento de un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto, que comprende administrar la composición del ítem 1 a dicho sujeto, en donde dicha administración resulta en la remineralización del diente.

El ítem 17 se relaciona con un método de tratamiento de un defecto óseo caracterizado por una disminución de la densidad ósea en un sujeto, que comprende administrar la composición del ítem 1 a dicho sujeto, en donde dicha administración resulta en un aumento en la densidad ósea.

El ítem 18 se relaciona con un método de identificación de un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto, que comprende administrar la composición del ítem 1 a dicho sujeto, en donde dichos péptidos de unión al calcio en dicha composición se conjuga con un marcador detectable, y en donde dichos péptidos de unión al calcio se unen preferencialmente a superficies desmineralizadas de los dientes.

El ítem 19 se relaciona con un método de identificación de un defecto óseo caracterizado por la desmineralización ósea en un sujeto, que comprende administrar la composición del ítem 1 a dicho sujeto, en donde dichos péptidos de unión al calcio en dicha composición se conjugan con un marcador detectable, y en donde dichos péptidos de unión al calcio se unen preferencialmente a las superficies de hueso desmineralizado.

El ítem 20 se relaciona con un kit que comprende la composición del ítem 1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los reactivos de la Universidad de California

<120> Péptidos de unión al calcio

<130> 563-4EPT2

<140> EP 06 804 228.2

<141> 2007-03-31

<150> US 60/722,071

<151> 2005-09-28

<160> 39

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> motivo DSS de fosfoproteína de dentina humana (DPP, fosfoforina), repeticiones de tres aminoácidos DSS, péptido DSS de unión al calcio

<400> 1

Asp Ser Ser
1

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 2

Glu Ser Ser
1

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 3

Asp Thr Thr
1

<210> 4

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 4

Glu Thr Thr
1

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 5

Asn Ser Ser
1

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 6

Asn Thr Thr
1

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 7

Gln Ser Ser
1

<210> 8

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 8

Gln Thr Thr
1

<210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 9

Asp Ser Thr
1

<210> 10

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 10

Asp Ala Ala
1

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante de repetición de tres aminoácidos de unión al calcio

<400> 11

Ala Ser Thr
1

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene dos repeticiones de DSS, 2DSS

<400> 12

Asp Ser Ser Asp Ser Ser
1 5

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene cuatro repeticiones de DSS, 4DSS, (DSS)-4

<400> 13

Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
1 5 10

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene seis repeticiones de 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
Ser Ser
```

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene ocho repeticiones de 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 Ser Asp Ser Ser
            20
```

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del 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
```

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo impedidos más estéricamente en la segunda y tercera posiciones, 4DTT

<400> 17

```
Asp Thr Thr Asp Thr Thr Asp Thr Thr Asp Thr Thr
 1               5                  10
```

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo impedidos más estéricamente en la segunda y tercera posiciones, 4NTT

<400> 18

```
Asn Thr Thr Asn Thr Thr Asn Thr Thr Asn Thr Thr
 1               5                  10
```

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de cuatro repeticiones que contiene grupos hidroxilo impedidos más estéricamente en la segunda y tercera posiciones, 4ETT

<400> 19

```
Glu Thr Thr Glu Thr Thr Glu Thr Thr Glu Thr Thr
 1               5                  10
```

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de cuatro repeticiones que carece del grupo cargado negativamente en la primera posición, 4NSS

<400> 20

```
Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asn Ser Ser Asn Ser Ser
 1               5                  10
```

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo cargado negativamente 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
```

<210> 22

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo hidroxilo en la segunda y tercera posiciones, 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
```

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de ocho repeticiones que carece del grupo hidroxilo en la segunda y tercera posiciones, 8NAA

<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

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido control codificado #3-1

<400> 24

```
Leu Ile Lys His Ile Leu His Arg Leu
 1               5
```

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene cuatro repeticiones de DSS parcialmente fosforiladas, 4DS-PS

<221> MOD_RES

<222> (2) ... (2)

<223> fosfoserina

<221> MOD_RES

<222> (5)...(5)

<223> fosfoserina

<221> MOD_RES

<222> (8)...(8)

<223> fosfoserina

<221> MOD_RES

<222> (11)...(11)

<223> fosfoserina

<400> 25

```
Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
 1               5                  10
```

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido antimicrobiano 2c-4

<221> AMIDACIÓN

<222> (7)...(7)

<223> fenilalaninamida

<400> 26

```
Arg Trp Arg Trp Arg Trp Phe
 1               5
```

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<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
```

<210> 28

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<221> AMIDACIÓN

<222> (25)...(25)

<223> fenilalaninamida

<400> 28

```
Asp Ser Ser 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
```

<210> 29

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<221> AMIDACIÓN

<222> (28)...(28)

<223> fenilalaninamida

<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

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido antimicrobiano b-34

<221> AMIDACIÓN

<222> (11)...(11)

<223> fenilalaninamida

<400> 30

```
Leu Lys Arg Phe Leu Lys Trp Phe Lys Arg Phe
 1               5                  10
```

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<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
```

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido antimicrobiano PL-135

<221> AMIDACIÓN

<222> (7)...(7)

<223> fenilalaninamida

<400> 32

```
Phe His Phe His Leu His Phe
 1               5
```

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> proteína de fusión de (DSS)-5 terminal N, enlazante (GGG) de triglicina y péptido antimicrobiano PL-135, péptido 5DSSPL135

<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
```

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene tres repeticiones de DSS

<400> 34

```
Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
 1               5
```

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene cinco repeticiones de 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
```

<210> 36

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de unión al calcio que contiene siete repeticiones de 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
```

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> variante del péptido DSS de cuatro repeticiones que carece del grupo hidroxilo en la segunda y tercera posiciones, 4NAA

<400> 37

```
Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala Asn Ala Ala
 1               5                  10
```

<210> 38

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> (X-Y-Z)-n péptido de unión al calcio de tres repeticiones de aminoácidos, donde n = 1-40 y 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
Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa
            20                  25                  30
Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
        35                  40                  45
Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
    50                  55                  60
Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa
65                  70                  75                  80
Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
                85                  90                  95
Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp
            100                 105                 110
Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
        115                 120
```

<210> 39

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> (X-Y-Z)-n péptido de unión al calcio con tres repeticiones de aminoácidos, donde n = 1-40, X = Asp y Y y Z = 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
Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
            20                  25                  30
Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
        35                  40                  45
Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
    50                  55                  60
Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser
65                  70                  75                  80
Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
                85                  90                  95
Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser Asp
            100                 105                 110
Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Ser
        115                 120
```

Reivindicaciones

1. Un péptido de unión al calcio que comprende una secuencia de repetición de tres aminoácidos que tiene la fórmula $(X\text{-}Y\text{-}Z)_n$, en donde:

X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina;

Y y Z son aminoácidos seleccionados entre alanina, serina, y treonina;

n es un número de 3 a 15;

dicho péptido tiene una longitud de hasta 100 aminoácidos;

dicho péptido no es fosforilado; y

dicho péptido se une al fosfato de calcio.

2. El péptido de la reivindicación 1, en donde dicho uno o más péptidos de unión al calcio tiene una longitud de 9 a 60 aminoácidos.

3. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde n está entre 3 y 10.

4. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X es ácido aspártico (Asp).

5. El péptido de la reivindicación 4, en donde Y y Z son serina.

6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Glu-Thr-Thr (SEQ. ID NO. 4).

7. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Asn-Ser-Ser (SEQ. ID NO. 5).

8. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Asn-Thr-Thr (SEQ. ID NO. 6).

9. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Gln-Ser-Ser (SEQ. ID NO. 7).

10. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Gln-Thr-Thr (SEQ ID NO: 8).

11. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde X-Y-Z es Asp-Ser-Thr (SEQ ID NO: 9.), o Asp-Ala-Ala (SEQ. ID NO: 10).

12. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde dichos péptidos de unión al calcio están conjugados a un marcador detectable.

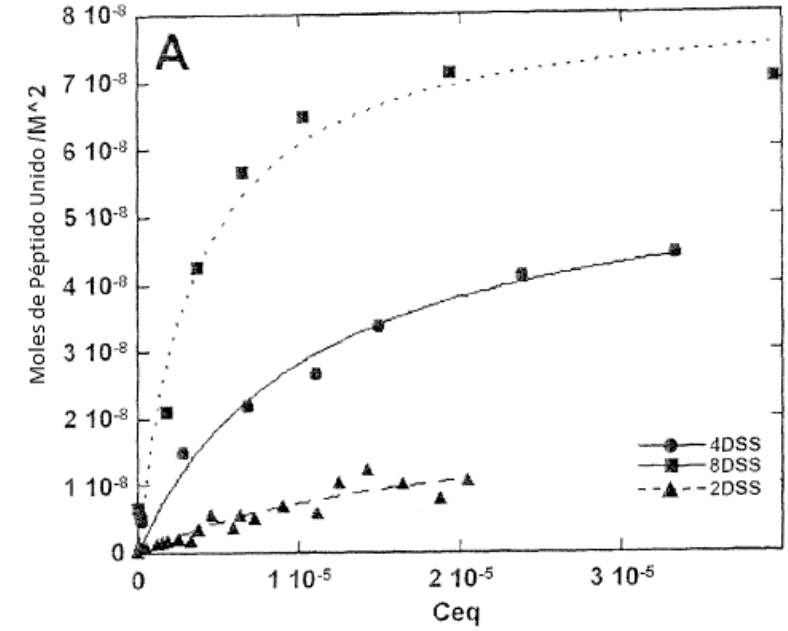
13. El péptido de la reivindicación 12, en donde dicho péptido está conjugado con un marcador detectable seleccionado del grupo que consiste en un fluoróforo, un cromóforo, una etiqueta de afinidad, una etiqueta de antígeno, un marcador radiactivo y un marcador de espín.

14. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicho péptido de unión al calcio está conjugado a un péptido antimicrobiano.

15. El péptido de la reivindicación 14, en donde dicho péptido antimicrobiano está unido a dicho péptido de unión al calcio a través de una secuencia enlazante de aminoácidos.

16. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en el tratamiento de un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto o para el uso en el tratamiento de un defecto óseo caracterizado por una disminución de la densidad ósea en un sujeto.

17. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, para su uso en la identificación de un defecto de dientes caracterizado por la desmineralización de los dientes en un sujeto o para uso en la identificación de un defecto óseo caracterizado por la desmineralización ósea en un sujeto.


A
Moles de Péptido Unido /M^2
8 10-8
7 10-8
6 10-8
5 10-8
4 10-8
3 10-8
2 10-8
1 10-8
0
0
1 10-5
2 10-5
3 10-5
Ceq
4DSS
8DSS
2DSS

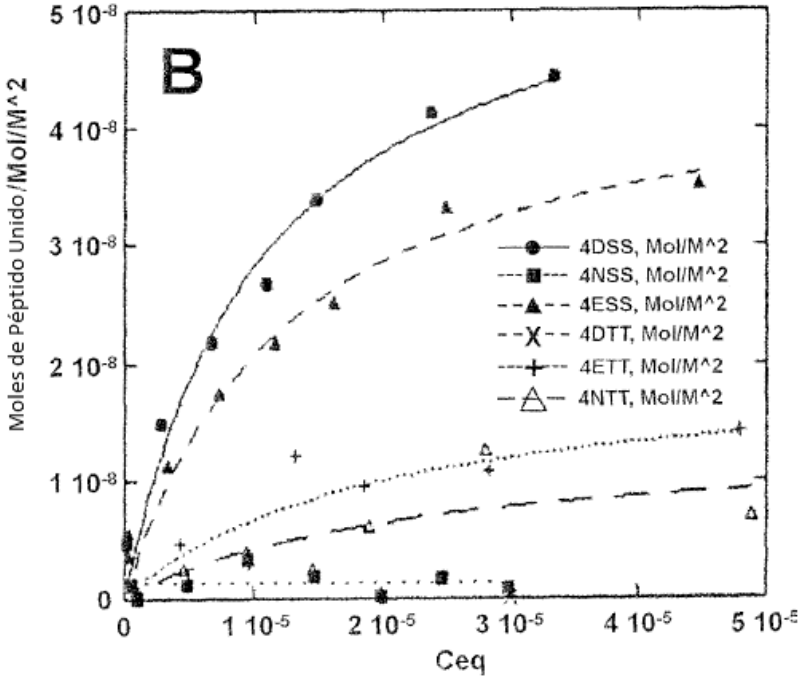
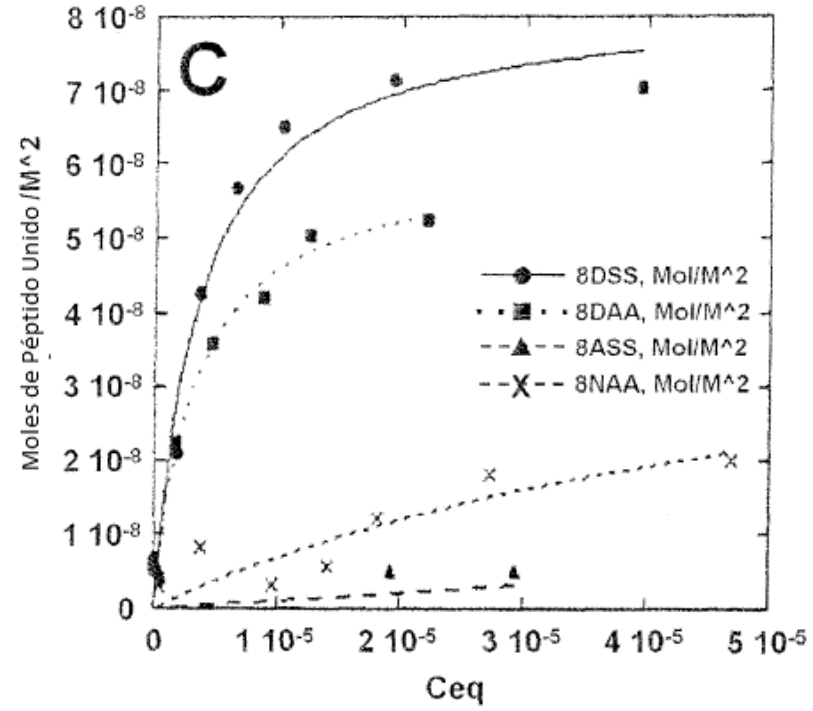

B
Moles de Péptido Unido /Mol/M^2
5 10-8
4 10-8
3 10-8
2 10-8
1 10-8
0
0
1 10-5
2 10-5
3 10-5
4 10-5
5 10-5
Ceq
4DSS, Mol/M^2
4NSS, Mol/M^2
4ESS, Mol/M^2
4DTT, Mol/M^2
4ETT, Mol/M^2
4NTT, Mol/M^2

Fig. 1



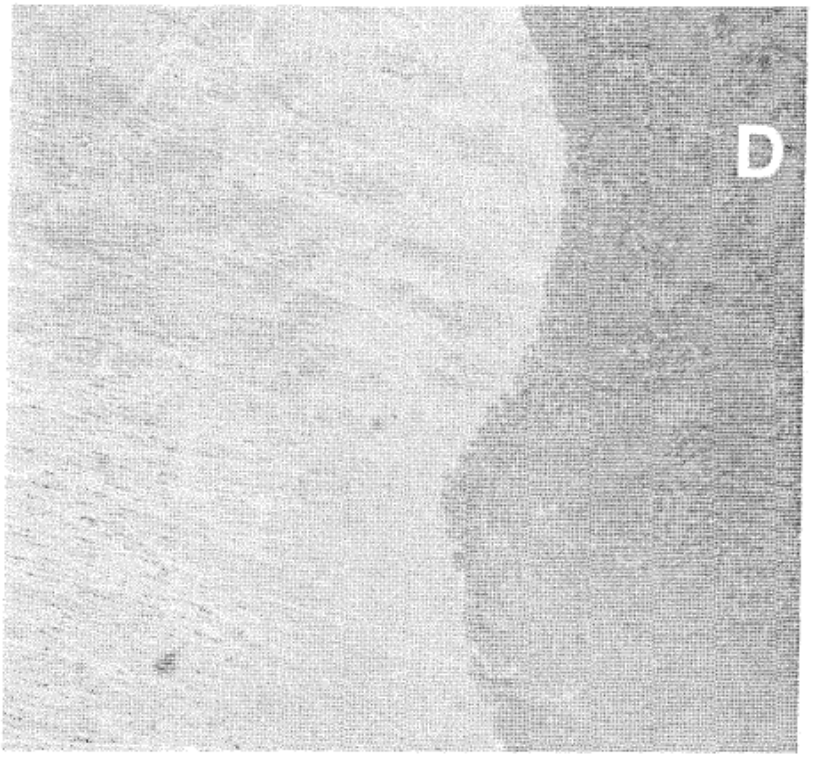


Fig. 1, continuación

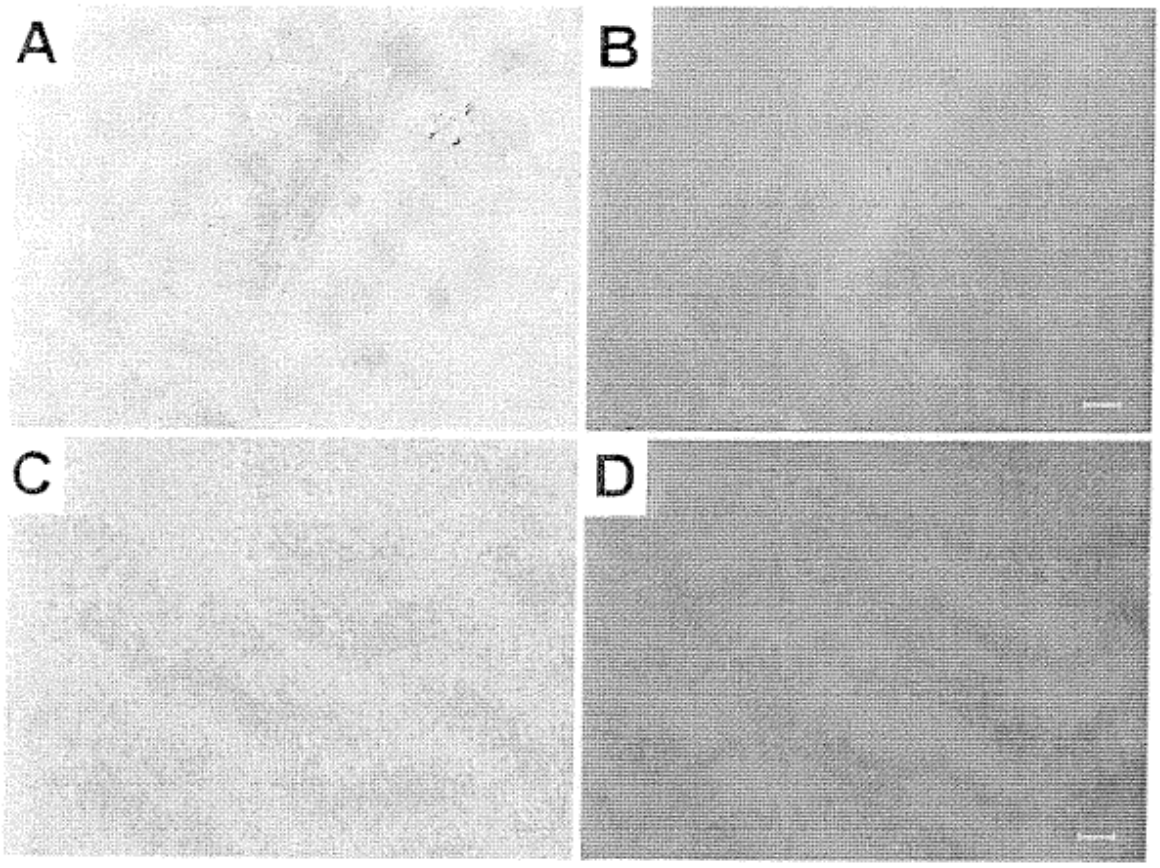


Fig. 2

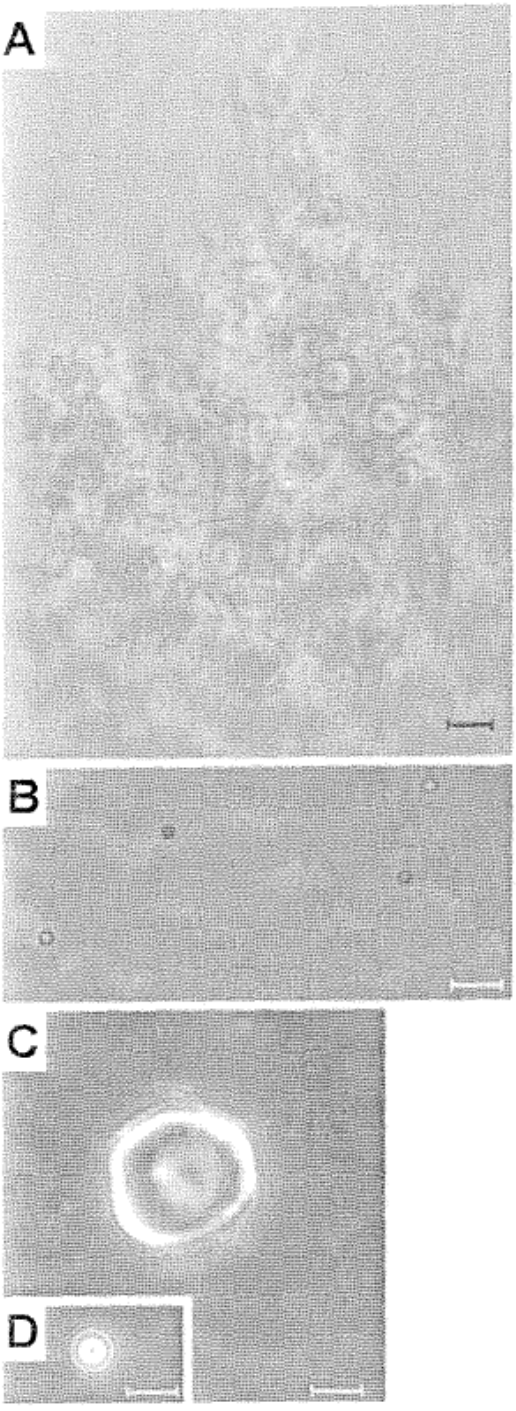


Fig. 3

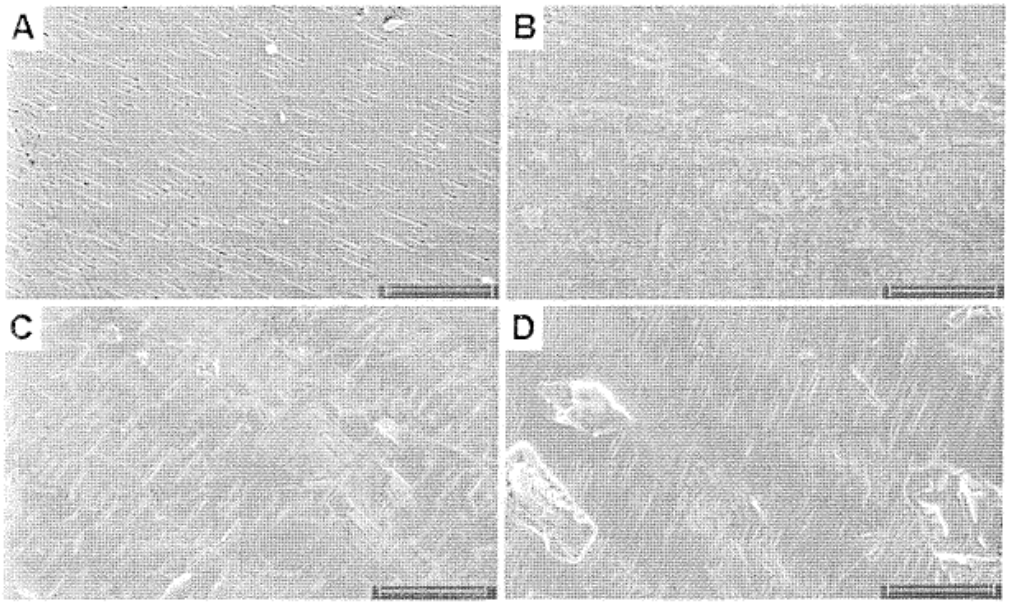
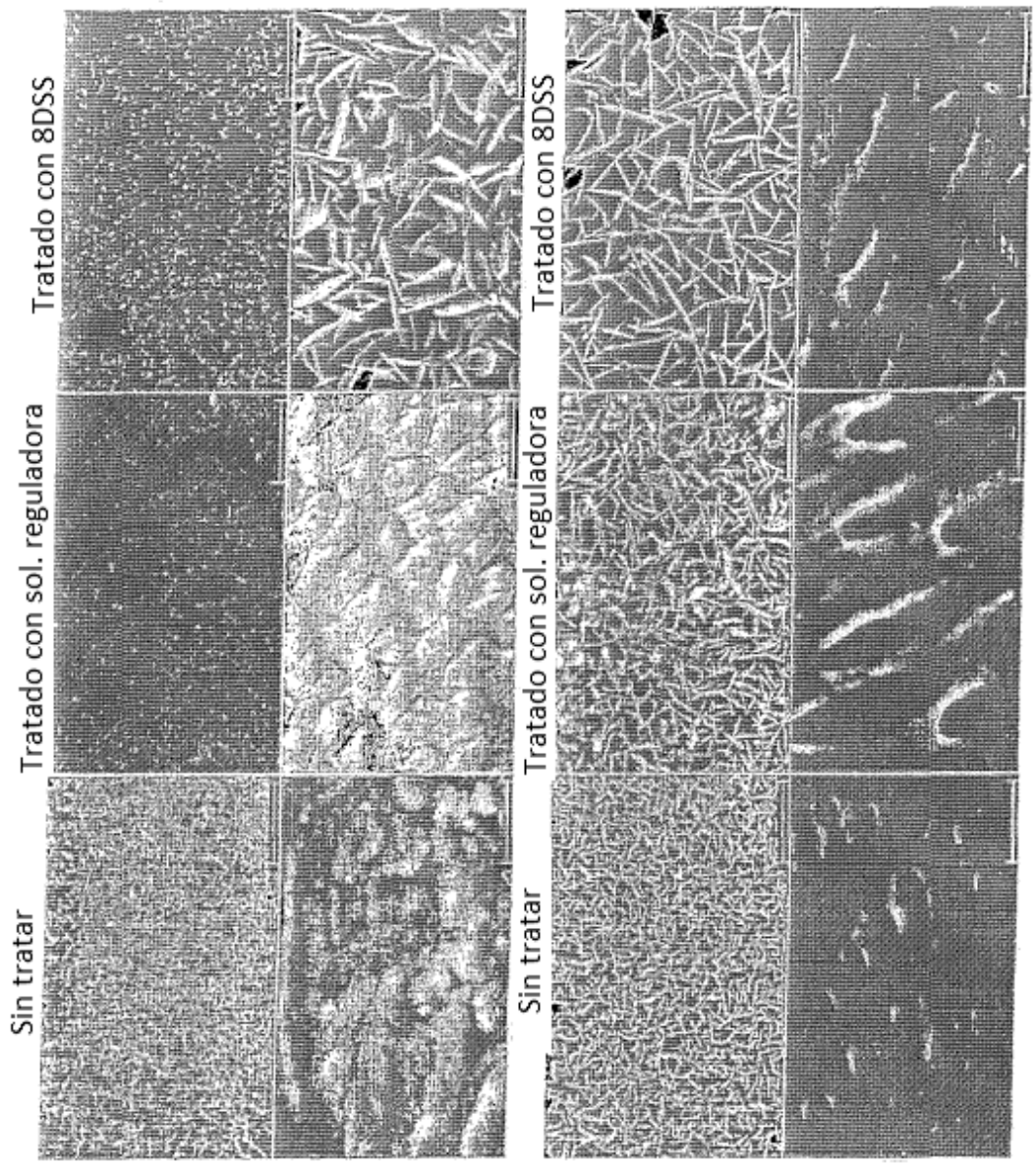


Fig. 4

Figura 5


Sin tratar
Tratado con sol. reguladora
Tratado con 8DSS
Esmalte no desmineralizado
Esmalte desmineralizado
Sin tratar
Tratado con sol. reguladora
Tratado con 8DSS
Dentina no desmineralizada
Dentina desmineralizada

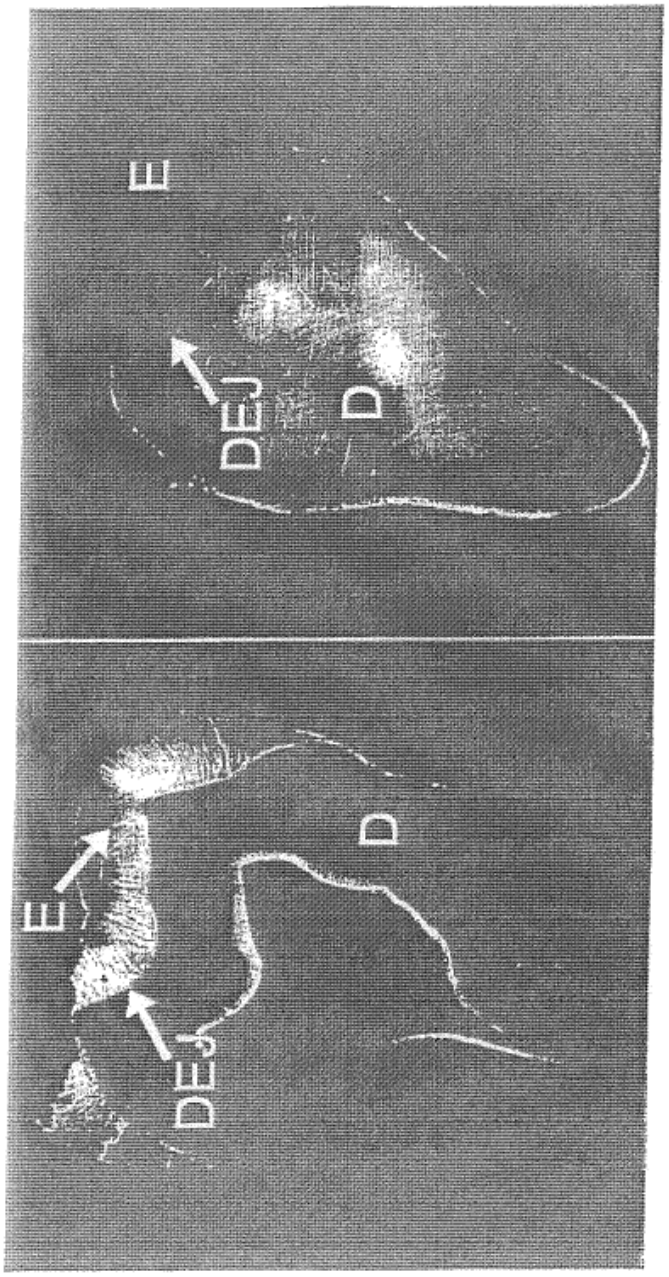


Figura 6

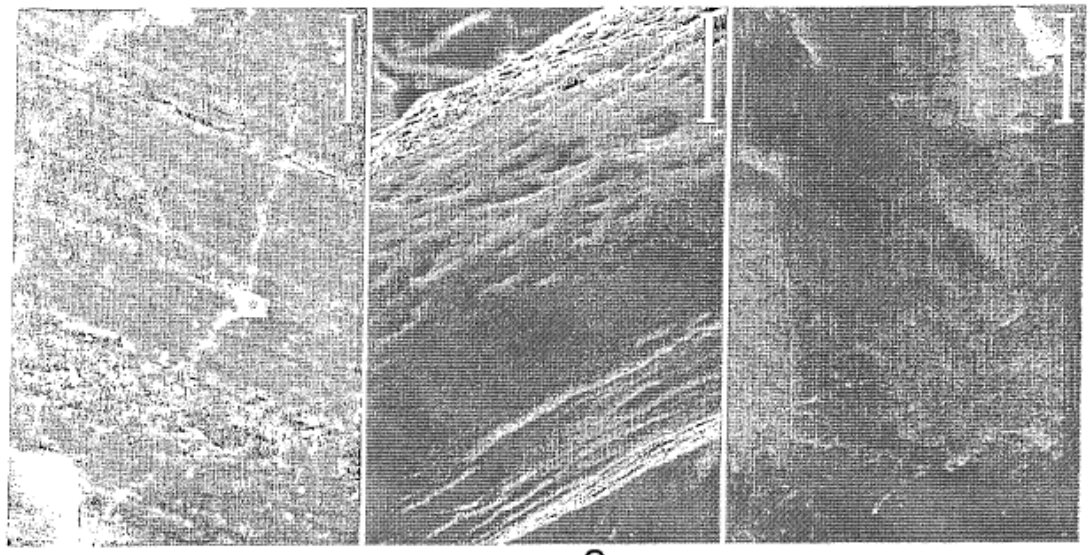

Femur
de rata
no tratado
Femur
de rata
desmineralizado
Femur
de rata
remineralizado

Figura 7

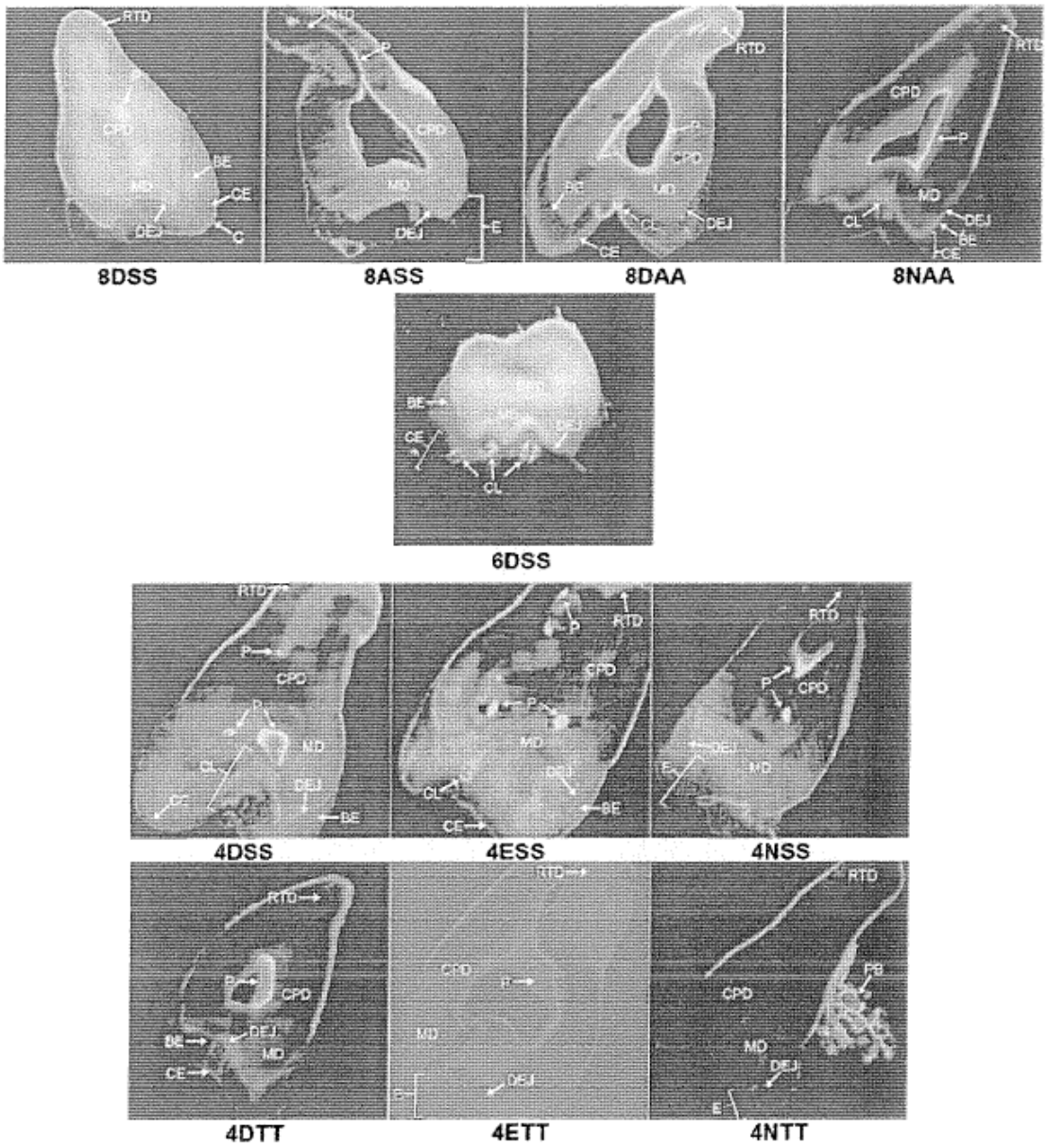

RTD
CPD
BE
MD
CE
DEJ
P
E
8DSS
8ASS
8DAA
8NAA
6DSS
4DSS
4ESS
4NSS
4DTT
4ETT
4NTT

Fig. 8

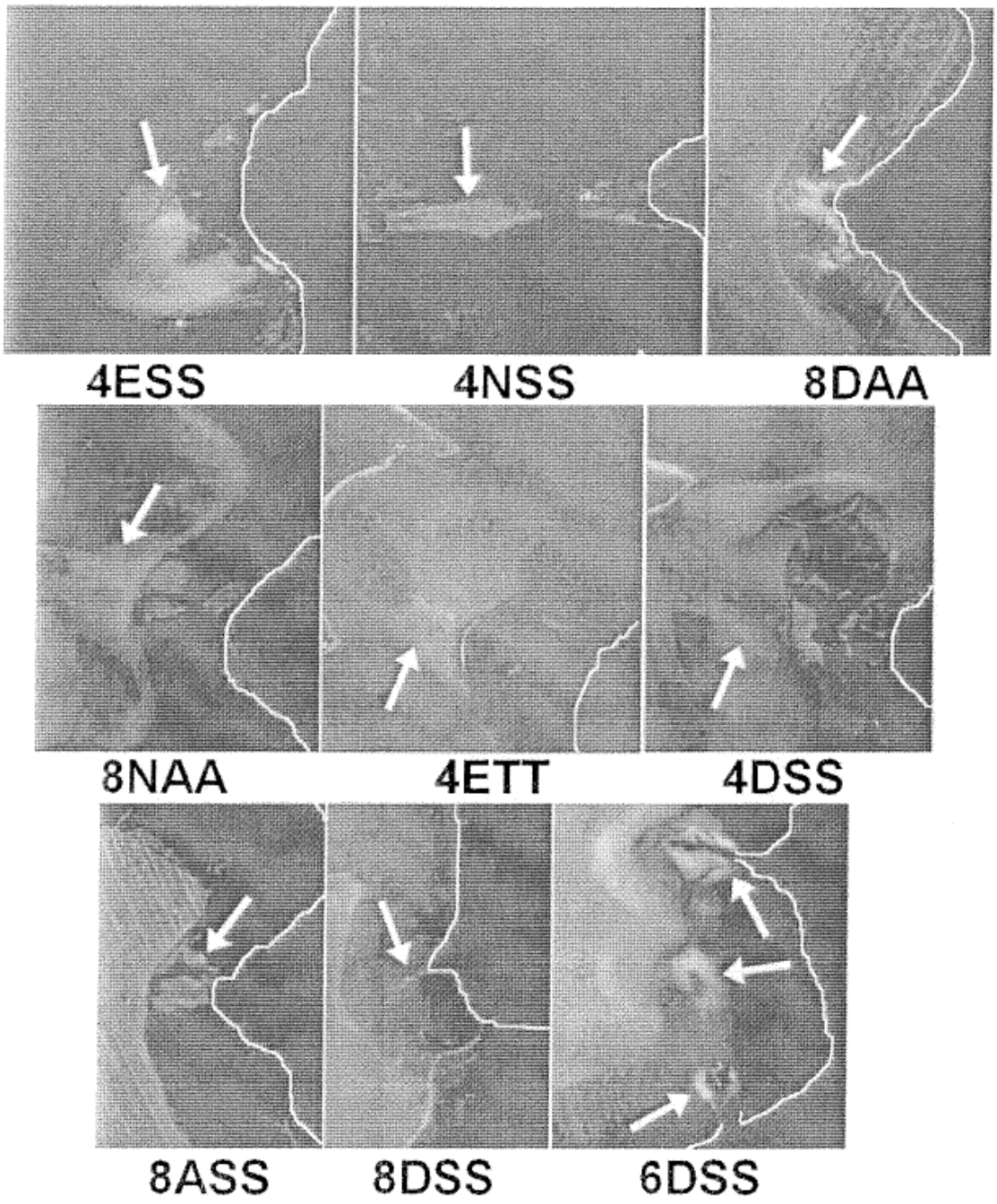


Fig. 9

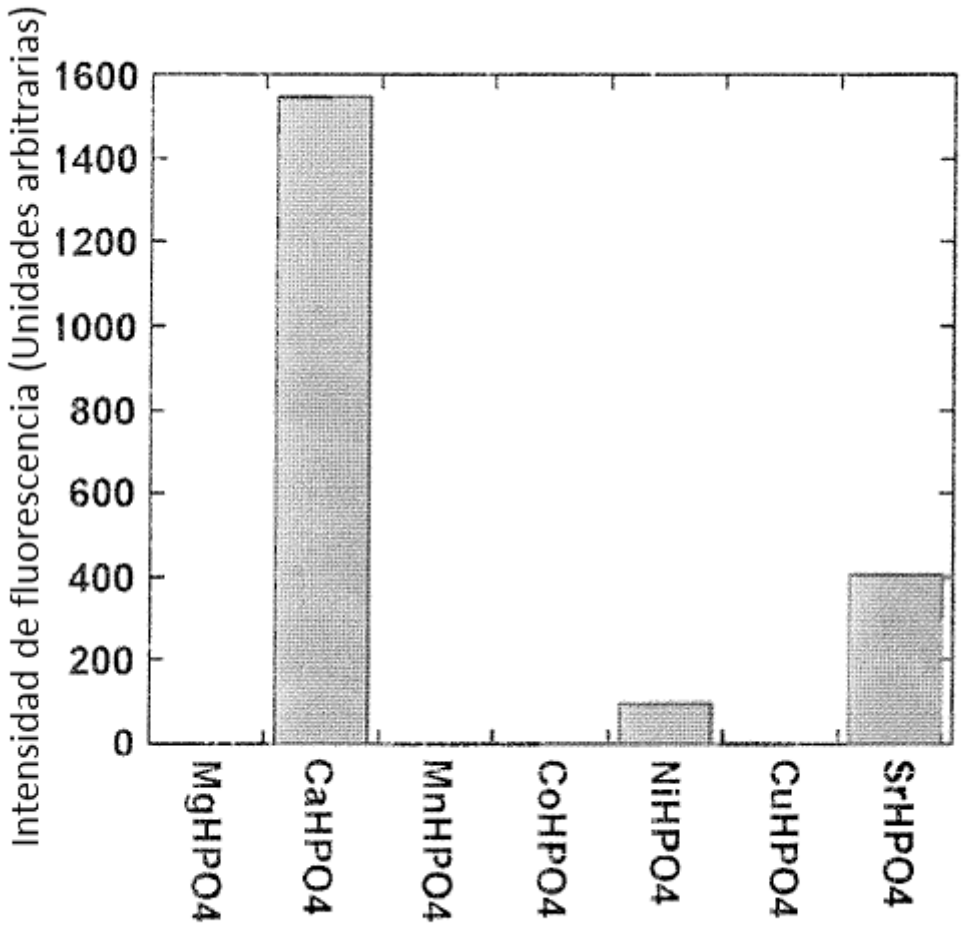

Intensidad de fluorescencia (Unidades arbitrarias)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
MgHPO4
CaHPO4
MnHPO4
CoHPO4
NiHPO4
CuHPO4
SrHPO4

Fig. 10

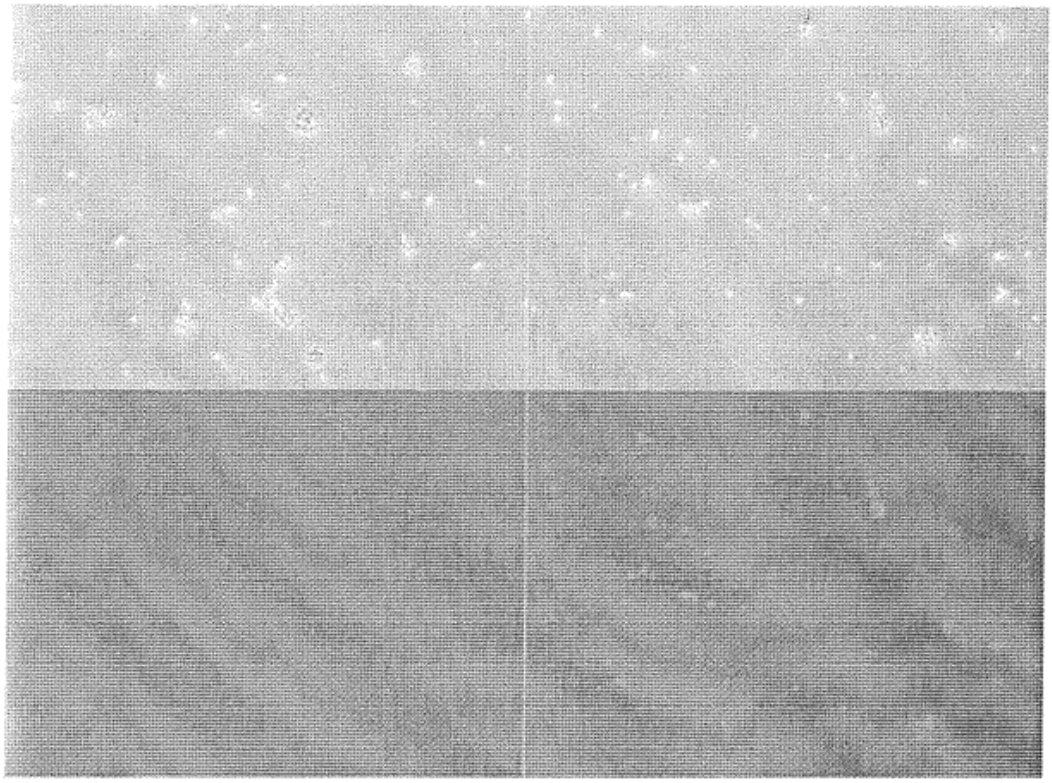


Fig. 11