

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 327**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/19** (2006.01)

**A61K 8/64** (2006.01)

**C07F 3/04** (2006.01)

**A61Q 7/00** (2006.01)

**A61Q 3/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2010 PCT/US2010/023229**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10091199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2010 E 10739132 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2393470**

54 Título: **Agentes enlazantes de calcio que inducen crecimiento del cabello y/o crecimiento de las uñas**

30 Prioridad:

**06.02.2009 US 150623 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.07.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YARBROUGH, DANIEL, K.;  
WU, XIAOYANG;  
SHI, WENYUAN y  
ANDERSON, MAXWELL**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 626 327 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Agentes enlazantes de calcio que inducen crecimiento del cabello y/o crecimiento de las uñas

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de la USSN 61/150,623, presentada el 6 de febrero de 2009, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad para todos los fines.

Declaración sobre los derechos a invenciones realizadas bajo investigación o desarrollo con patrocinio federal

No aplicable

Referencia a una "lista de secuencias", una tabla o un apéndice de listado de programas informáticos presentados en un disco compacto

10 No aplicable

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general a métodos para promover el crecimiento de pelo y/o uñas en un mamífero, y más particularmente relacionados con un uso novedoso de péptidos que se unen al calcio para promover el crecimiento del cabello y/o para reducir la pérdida del cabello y/o para inducir o para aumentar la tasa de crecimiento de las uñas.

Antecedentes de la invención

20 En la actualidad, los métodos eficaces para el tratamiento de la alopecia androgenética incluyen formulaciones orales y tópicas de finasterida (PROPECIA®) o minoxidil (óxido de 6-(1-piperidinil)-2,4-pirimidano-diamina, véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,382,247 y 3,644,363), y diversas técnicas quirúrgicas para el autotrasplante de folículos pilosos de zonas no afectadas por la pérdida del cabello o para la redistribución de los folículos desde una zona afectada por la caída del cabello. Debido en gran medida al coste y/o invasividad de estos tratamientos, también existe un mercado significativo para remedios para la pérdida del cabello cuya eficacia permanece sin demostrar (ver, por ejemplo, Sawaya y Shapiro (2000), Dermatologic Clinics 18: 47-61). El documento JP2005239695 describe un péptido, Asn-Ser-Ala-Ser-Ala, para su uso como restaurador de cabello. El documento 25 WO98/06844 describe el péptido, KGF-2, que comprende la secuencia EAT-NSS, para promover el crecimiento del cabello. El documento US2004/220094 describe péptidos, tales como péptido TIP que contiene Asp-Ala-Ala en su extremo N, para estimular/inhibir el crecimiento del cabello. El documento WO2007/085846 describe un péptido que tiene la secuencia Glu-Ser-Ser, que retarda el crecimiento del cabello. El documento WO2008/114082 describe calmodulina para promover el crecimiento del cabello. La pérdida de cabello de patrón femenino puede tratarse 30 adicionalmente, con tasas mucho más bajas de éxito, usando terapia antiandrogénica, acetato de ciproterona, espironolactona, flutamida (ver, por ejemplo, Ross y Shapiro (2005), Dermatologic Clinics 23: 227-243). Más allá de estos, la pérdida de cabello es tratada más a menudo por la ocultación o mediante tratamiento cosmético. La alopecia areata es una enfermedad autoinmune que puede ser tratada con inmunomoduladores y tratamientos inmunomoduladores, tales como la terapia con psoraleno/UVA. La finasterida también se ha utilizado con resultados 35 muy variados.

Breve resumen de la invención

40 En diversas realizaciones esta invención se refiere al descubrimiento de que los péptidos que enlazan al calcio y/u otros agentes de unión al calcio (por ejemplo, como se describe en el presente documento) pueden inducir el re-crecimiento del cabello en mamíferos y se cree que son útiles para inducir el crecimiento del vello y/o para prevenir la pérdida de cabello en hombres o mujeres (por ejemplo, para calvicie en el cuero cabelludo para hombres (alopecia androgenética), alopecia inducida por fármacos y similares).

45 La presente invención proporciona un péptido de unión al calcio para su uso en la inducción del crecimiento del cabello o la inhibición de la pérdida del cabello y/o la inducción del crecimiento de las uñas en un mamífero, donde dicho péptido de unión al calcio comprende la secuencia de aminoácidos (X-Y-Z)<sub>n</sub>, donde X es ácido aspártico, Y y Z son serina, y n es un número de 2 a 100.

50 En diversas realizaciones, el mamífero es un mamífero humano o no humano. En diversas realizaciones, la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido que se une al calcio se formulan para administración tópica. En diversas realizaciones, la invención es para inducir el crecimiento del cabello o inhibir la pérdida del cabello, incluyendo el tratamiento de un ser humano diagnosticado con una condición seleccionada del grupo que consiste en alopecia areata, alopecia androgenética, alopecia inducida farmacéuticamente y alopecia inducida por radiación y similares. En diversas realizaciones, la unidad estructural de unión al calcio y/o dicho péptido de unión al calcio es un componente de una formulación seleccionada del grupo que consiste en un champú, un acondicionador del cabello, un desenredante del cabello, un agente colorante del cabello, un tónico para el crecimiento del cabello, un protector solar, crema, gel, bálsamo, aclarado, tónico, solución, emulsión, espuma, ungüento, polvos, linimento, bálsamo y loción. En

diversas realizaciones, el uso comprende inducir crecimiento de uñas. En ciertas realizaciones, el medicamento comprende la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio formulado para su aplicación a una región seleccionada del grupo que consiste en una uña, un lecho ungueal, una cutícula, el área de la coronilla de un casco, la base de un cuerno. En ciertas realizaciones, el medicamento comprende la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio como un componente de una formulación seleccionada del grupo que consiste en un esmalte de uñas, un consolidador de uñas y un bálsamo para casco. En diversas realizaciones, los péptidos o dominios peptídicos son un péptido D o un péptido beta o tienen un PEG u otro esqueleto no peptídico. En diversas realizaciones, los péptidos o dominios peptídicos comprenden dos o más copias de la secuencia de aminoácidos de una subunidad peptídica enumerada en la Tabla 2. En ciertas realizaciones, los péptidos o dominios peptídicos tienen una longitud de aproximadamente 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 o 30 a aproximadamente 100 aminoácidos. En ciertas realizaciones, los péptidos o dominios peptídicos tienen una longitud de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 o 30 aminoácidos. En ciertas realizaciones n es un número de 2 a 8 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8). En ciertas realizaciones X es ácido aspártico o una sustitución conservativa de las mismas. En ciertas realizaciones Y y Z son sustituciones de serina o conservativas para las mismas. En una realización, el péptido de unión al calcio comprende un péptido "L", un péptido "D" o péptido beta y X es ácido aspártico, Y es serina o fosfoserina, y Z es serina o fosfoserina. En ciertas realizaciones, el péptido de unión al calcio comprende un péptido "L", un péptido "D", o un péptido beta seleccionado del grupo que consiste en 4DSS, 5DSS, 6DSS, 7DSS, 8DSS, 9DSS y 10DSS. En una realización, el péptido de unión al calcio es un péptido L. En ciertas realizaciones, la unidad estructural de unión al calcio o el péptido de unión al calcio no está fosforilado. En una realización alternativa, la unidad estructural de unión al calcio o el péptido de unión al calcio están fosforilados. En ciertas realizaciones, la unidad estructural de unión al calcio o péptido de unión al calcio lleva un grupo protector en el extremo amino y/o carboxilo. En ciertas realizaciones, el extremo carboxilo del péptido que se une al calcio está amidado.

En ciertas realizaciones, la invención comprende inducir crecimiento del cabello o inhibir la pérdida del cabello (por ejemplo, en un ser humano diagnosticado con una condición seleccionada del grupo que consiste en alopecia areata, alopecia androgenética, alopecia inducida farmacéuticamente y alopecia inducida por radiación). En ciertas realizaciones, la administración comprende administrar la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio a la región del cuero cabelludo, ceja, bigote (labio superior), pecho y similares (es decir, a una región donde se desea el crecimiento capilar). En ciertas realizaciones la administración comprende administrar la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio como un componente de una formulación seleccionada del grupo que consiste en un champú, un acondicionador del cabello, un desenredante del cabello, un agente colorante del cabello, un tónico para el crecimiento del cabello, crema, gel o pomada.

En ciertas realizaciones, la invención comprende inducir crecimiento de uñas. En ciertas realizaciones, la administración comprende administrar la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio a una región seleccionada del grupo que consiste en una uña, un lecho ungueal, una cutícula, el área de coronilla de un casco, la base de un cuerno. En ciertas realizaciones, la administración comprende administrar la unidad estructural de unión al calcio y/o el péptido de unión al calcio como un componente de una formulación seleccionada del grupo que consiste en un esmalte de uñas, un consolidador de uñas, un bálsamo para casco, un barniz, un pegamento para cascos uñas, un sellador, una crema, una loción, un baño para pies, un baño para cascos, y similares.

#### Definiciones

El término "unidad estructural de unión al calcio" incluye péptidos que se unen al calcio así como moléculas no peptídicas que se unen al calcio como se describe en el presente documento.

El término "péptido" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos que varía típicamente en longitud de 2 a aproximadamente 50, 80 o aproximadamente 100 residuos. En ciertas realizaciones el péptido varía en longitud de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10 o 11 residuos a aproximadamente 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 o 15 residuos. En ciertas realizaciones, el péptido varía en longitud de aproximadamente 8, 9, 10, 11 o 12 residuos a aproximadamente 15, 20 o 25 residuos. En ciertas realizaciones los residuos de aminoácidos que comprenden el péptido son residuos de aminoácidos de "forma L", sin embargo, se reconoce que en diversas realizaciones, pueden incorporarse aminoácidos "D" en el péptido. Los péptidos también incluyen polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales. Además, el término se aplica a los aminoácidos unidos por un enlace peptídico o por otros "enlaces modificados" (por ejemplo, cuando el enlace peptídico se sustituye por un  $\alpha$ -éster,  $\beta$ -éster, tioamida, fosfonamida, carbomato, hidroxilato, y similares (véase, por ejemplo, Spatola, (1983) Chem. Biochem. Amino Acids and Proteins 7: 267-357), donde la amida se reemplaza con una amina saturada (véase, por ejemplo, Skiles et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,496,542 y Kaltenbronn et al., (1990) Pág. 969-970 en Proc. 11th American Peptide Symposium, ESCOM Science Publishers, Países Bajos, y similares).

El término "residuo", tal como se utiliza aquí, se refiere a aminoácidos naturales, sintéticos o modificados. Diversos análogos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina (ácido beta aminopropiónico), ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, n-etilglicina, n-etilasparagina,

hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, isodesmosina, alo-isoleucina, n-metilglicina, sarcosina, n-metilisoleucina, 6-n-metililisina, n-metilvalina, norvalina, norleucina, ornitina y similares. Estos aminoácidos modificados son ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Los "péptidos DSS", tal como se usan aquí, incluyen péptidos que se unen al calcio que comprenden repeticiones del motivo Asp-Ser-Ser (por ejemplo, como se describe en la publicación PCT WO 2007/038683) y/o variaciones de los mismos, por ejemplo, como se describe aquí. En ciertas realizaciones, los "péptidos DSS" incluyen péptidos/proteínas de unión al calcio que tienen dominios múltiples que comprenden repeticiones del motivo Asp-Ser-Ser y variaciones de los mismos. Los péptidos "DSS" pueden también comprender conjugados en los que dos o más dominios que comprenden repeticiones del motivo Asp-Ser-Ser y sus variaciones están unidos por ligantes no peptídicos formando de este modo un conjugado de múltiples dominios.

Los "B-péptidos" comprenden "β-aminoácidos", que tienen su grupo amino unido al carbono β y no al carbono α como en los 20 aminoácidos biológicos estándar. El único aminoácido β comúnmente presente en la naturaleza es la p-alanina.

Los peptoides, o glicinas N-sustituidas, son una subclase específica de peptidomiméticos. Están estrechamente relacionados con sus homólogos de péptidos naturales, pero difieren químicamente en que sus cadenas laterales se añaden a los átomos de nitrógeno a lo largo del esqueleto de la molécula, en lugar de hacerlo a los carbonos α (como sucede en los aminoácidos naturales).

Los términos "convencionales" y "naturales" tal como se aplican a péptidos en el presente documento se refieren a péptidos, contruidos únicamente a partir de los aminoácidos naturales: Ala, Cys, Asp, Glu, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gin, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr. Un compuesto de la invención "corresponde" a un péptido natural si provoca una actividad biológica (por ejemplo, actividad de unión a Ca) similar a la del péptido natural. La actividad provocada puede ser la misma que, mayor o menor que la del péptido natural. En general, un peptoides tendrá una secuencia de monómero esencialmente correspondiente, en la que un aminoácido natural se sustituye por un derivado de glicina N-sustituido, si el derivado de glicina N-sustituido se asemeja al aminoácido original en hidrofiliidad, hidrofobicidad, polaridad, etc. A continuación se citan reemplazos de glicina sustituidos en N ilustrativos, pero no limitativos: N-(1-metilprop-1-il)glicina sustituida por isoleucina (Ile), N-(prop-2-il)glicina por valina (Val), N-bencilglicina para fenilalanina (Phe), N-(2-hidroxietil)glicina por serina (Ser), y similares. En ciertas realizaciones las sustituciones no necesitan ser "exactas". Así, por ejemplo, en ciertas realizaciones la N-(2-hidroxietil) glicina puede sustituir a Ser, Thr, Cys y/o Met; la N-(2-metilprop-1-il)glicina puede sustituir a Val, Leu y/o Ile. En ciertas realizaciones se puede usar N-(2-hidroxietil)glicina para sustituir a Thr y Ser, a pesar de las diferencias estructurales: la cadena lateral en N-(2-hidroxietil) glicina es un grupo metileno más largo que el de Ser y difiere de Thr en el sitio de hidroxisustitución. En general, se puede usar una glicina sustituida con N-hidroxialquilo para sustituir cualquier aminoácido polar, una glicina sustituida por N-bencilo o N-aralquilo en sustitución de cualquier aminoácido aromático (por ejemplo, Phe, Trp, etc.), y una glicina N-alquil-sustituida tal como N-butilglicina para reemplazar cualquier aminoácido no polar (por ejemplo Leu, Val, He, etc.) y un derivado N(aminoalquil)glicina para reemplazar cualquier aminoácido polar básico (por ejemplo, Lys y Arg).

Cuando se proporciona una secuencia de aminoácidos en el presente documento, también se contemplan versiones de aminoácidos L-, D- o beta de la secuencia así como isoformas retro, inversión y retroinversión. Además, se contemplan sustituciones conservadoras. También se contemplan esqueletos no proteicos, tales como PEG, alcano, puente de etileno, esqueleto éster y otras cadenas principales. Además, los fragmentos que varían en longitud de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos se contemplan hasta la longitud completa menos un aminoácido del péptido donde el fragmento retiene al menos 50%, preferiblemente al menos 60% 70% u 80%, más preferiblemente al menos 90%, 95%, 98%, 99% , o se contemplan al menos el 100% de la actividad (por ejemplo, especificidad de unión y/o aidez) del péptido no sustituido correspondiente.

En ciertas realizaciones, se contemplan sustituciones conservadoras de los aminoácidos que comprenden cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento. En diversas realizaciones se sustituyen uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos diferentes. El término "sustitución conservativa" se usa para reflejar sustituciones de aminoácidos que no alteran sustancialmente la actividad (por ejemplo, actividad antimicrobiana y/o especificidad) de la molécula. Típicamente, las sustituciones conservadoras de aminoácidos implican la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). Ciertas sustituciones conservadoras incluyen "sustituciones análogas" en las que un aminoácido estándar se reemplaza por un aminoácido no estándar (por ejemplo, raro, sintético, etc.) que difiere mínimamente del residuo parental. Se considera que los análogos de aminoácidos se derivan sintéticamente de los aminoácidos estándar sin cambio suficiente a la estructura del progenitor, son isómeros o son precursores de metabolitos. Ejemplos de tales "sustituciones análogas" incluyen, pero no se limitan a 1) Lys-Orn, 2) Leu-Norleucina, 3) Lys-Lys [TFA], 4) Phe-Phe [Gly] y 5) δ-aminobutilglicina-ξ-amino hexilglicina, donde Phe [gly] se refiere a fenilglicina (un derivado de Phe con un componente H en lugar de CH<sub>3</sub> en el grupo R), y Lys [TFA] se refiere a un Lys en el que un ión cargado negativamente (por ejemplo TFA) está unido al grupo amina R. Otras sustituciones conservativas incluyen "sustituciones funcionales" en las que las químicas generales de los dos residuos son similares y pueden ser suficientes para imitar o recuperar parcialmente la función del péptido nativo. Las sustituciones funcionales fuertes incluyen, pero no se limitan a 1) Gly/Ala, (2) Arg/Lys, 3)

Ser/Tyr/Thr, 4) Leu/Ile/Val, 5) Asp/Glu, 6) Gln/Asn y 7) Phe/Trp/Tyr, mientras que otras sustituciones funcionales incluyen, pero no se limitan a, 8) Gly/Ala/Pro, 9) Tyr /His, 10) Arg/Lys/His, 11) Ser/Thr/Cys, 12) Leu/Ile/Val/Met y 13) Met/Lys (caso especial bajo condiciones hidrófobas). Diversas "sustituciones conservadoras amplias" incluyen sustituciones donde los aminoácidos reemplazan a otros aminoácidos del mismo grupo bioquímico o biofísico. Esta es la similitud en un nivel básico y se deriva de los esfuerzos para clasificar los 20 aminoácidos naturales originales. Dichas sustituciones incluyen 1) cadenas laterales no polares:

Gly/Ala/Val/Leu/Ile/Met/Pro/Phe/Trp, y/o 2) cadenas laterales polares no cargadas Ser/Thr/Asn/Gln/Tyr/Cys. En ciertas realizaciones, las sustituciones de nivel amplio también pueden ocurrir como sustituciones emparejadas. Por ejemplo, cualquier par hidrofílico neutro [Ser, Thr, Gln, Asn, Tyr, Cys]+[Ser, Thr, Gln, Asn, Tyr, Cys] puede ser reemplazado por un par cargado con carga neutra [Arg, Lys, His]+[Asp, Glu]. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que, en ciertas realizaciones, son sustituciones conservativas típicas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), triptófano (W). Cuando se describen aquí secuencias de aminoácidos, también se contemplan las secuencias de aminoácidos que comprenden una o más de las sustituciones conservativas identificadas anteriormente.

En ciertas realizaciones, los péptidos que comprometen al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85% o 90%, y más preferiblemente al menos el 95% o el 98% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias descritas aquí (y preferiblemente retienen al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 95%, 98% o 100% o más especificidad de unión y/o aidez del péptido no modificado). Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" se refieren a dos o más secuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, medida con uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Con respecto a los péptidos de esta invención, la identidad de secuencia se determina sobre toda la longitud del péptido. Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros de programa designados. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Mates. 2: 482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 2444, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr, Madison, WI) o mediante inspección visual.

"Tratar" o "tratamiento" de una condición tal como se utiliza en el presente documento puede referirse a prevenir la afección, retardar la aparición o tasa de desarrollo de la afección, reducir el riesgo de desarrollar la afección, prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con la afección, reducir o terminar síntomas asociados con la condición, generando una regresión completa o parcial de la enfermedad, o alguna combinación de los mismos.

El término "que consiste esencialmente en" cuando se usa con respecto a un péptido que se une al calcio u otra unidad estructural como se describe aquí, indica que el péptido u otra unidad estructural comprendida por variantes, análogos o derivados de los mismos poseen sustancialmente la misma o mayor actividad y/o especificidad y/o aidez de unión como unidad estructural referenciada.

Los términos "aislado" "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. En el caso de un péptido, un péptido aislado (natural) típicamente está sustancialmente libre de componentes con los que está asociado en la célula, tejido u organismo. El término aislado también indica que el péptido no está presente en un despliegue de fagos, un despliegue de levaduras u otra biblioteca de péptidos.

Los términos "coadministración" o "administración conjunta con" cuando se usa en referencia al uso de un péptido que se une al calcio o una unidad estructural que se une al calcio y otro agente (por ejemplo, agente desensibilizante y/o remineralizante) un péptido de unión o una unidad estructural de unión al calcio y otro agente se administran de manera que haya al menos una cierta superposición cronológica en la actividad de los dos agentes. En la administración secuencial puede haber incluso cierto retraso sustancial (por ejemplo, minutos o incluso horas) entre la administración de los dos agentes, siempre y cuando el agente de administración presente la actividad de cada uno de manera que proporcione un resultado aumentado/mejorado.

En diversas realizaciones se usan las abreviaturas de aminoácidos mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Abreviaturas de aminoácidos.

| Nombre                                                                       | Abreviaturas |         |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------|
|                                                                              | 3 letras     | 1 letra |
| Alanina                                                                      | Ala          | A       |
| $\beta$ -Alanina ( $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ )       | $\beta$ Ala  |         |
| Arginina                                                                     | Arg          | R       |
| Asparagina                                                                   | Asn          | N       |
| Ácido aspártico                                                              | Asp          | D       |
| Cisteína                                                                     | Cys          | C       |
| Ácido glutámico                                                              | Glu          | E       |
| Glutamina                                                                    | Gln          | Q       |
| Glicina                                                                      | Gly          | G       |
| Histidina                                                                    | His          | H       |
| Homoserina                                                                   | Hse          | -       |
| Isoleucina                                                                   | Ile          | I       |
| Leucina                                                                      | Leu          | L       |
| Lisina                                                                       | Lys          | K       |
| Metionina                                                                    | Met          | M       |
| Sulfóxido de metionina                                                       | Met (O)      | -       |
| Metionina metilsulfonio                                                      | Met (S-Me)   | -       |
| Norleucina                                                                   | Nle          | -       |
| Fenilalanina                                                                 | Phe          | F       |
| Prolina                                                                      | Pro          | P       |
| Serina                                                                       | Ser          | S       |
| Treonina                                                                     | Thr          | T       |
| Triptófano                                                                   | Trp          | W       |
| Tirosina                                                                     | Tyr          | Y       |
| Valina                                                                       | Val          | V       |
| Ácido epsilon-aminocaproico<br>( $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_5\text{-COOH}$ ) | Ahx          | J       |
| Ácido 4-aminobutanoico<br>( $\text{NH}_2\text{-(CH}_2)_3\text{-COOH}$ )      | gAbu         |         |
| Ácido tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico                                   |              | O       |
| Lys (N (épsilon)-trifluoroacetilo)                                           |              | K[TFA]  |
| Ácido $\alpha$ -aminoisobutírico                                             | Aib          | B       |

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra ratones tratados con DSS (abajo) y simulados (arriba) que muestran rebrote del cabello 13 días después del afeitado del cuero cabelludo.

5 La Figura 2 ilustra el efecto de los compuestos de unión al calcio sobre el crecimiento del cabello en ratones. El panel más a la izquierda de cada serie muestra ratones en el día 0 después de la preparación y antes del tratamiento. Los paneles de la derecha muestran los ratones en el día 23, la fecha del punto final. La serie superior muestra el control negativo que recibe tratamiento diario con solución salina tópica. La serie inferior muestra ratones que reciben tratamiento diario con una formulación tópica de un compuesto DSS aplicado en parches delineados, lo que demuestra un crecimiento significativo del cabello en comparación con los controles.

10 La Figura 3 ilustra la nucleación de hidroxiapatita en superficies de esmalte (superior) y de dentina (inferior). Las superficies se prepararon y trataron como se indica mediante las etiquetas, seguido de formación de imágenes utilizando Microscopía Electrónica de Barrido. El grupo superior (dos filas superiores) representa las muestras de esmalte, mientras que el grupo inferior (las dos filas inferiores) representa las muestras de dentina. Dentro de cada grupo, la fila superior representa muestras que no fueron desmineralizadas antes del tratamiento, y la fila inferior representa muestras que fueron desmineralizadas por tratamiento con ácido fosfórico. Se muestran micrografías electrónicas de barrido, barras de escala = 1 0 pM. Columna izquierda: muestras que no fueron expuestas a ningún tratamiento previo a la nucleación y crecimiento del cristal. Columna central: muestras que se expusieron a regulador sólo antes de la nucleación y crecimiento de cristales. Columna derecha: muestras que fueron expuestas a péptido 8DSS 12.5 pM antes de la nucleación y crecimiento de cristales. El crecimiento cristalino indica la nucleación temprana.

20 La Figura 4 proporciona micrografías de fluorescencia que muestran la especificidad del tejido en la unión de péptidos y variantes de DSS. Los dientes humanos adultos se expusieron a péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína 12.5 pM sin desmineralización, se lavaron exhaustivamente y se formaron imágenes por CLSM. Para cada sección se recolectaron y ensamblaron múltiples escáneres en un modo automatizado para generar paneles de imágenes que representan un área de 13x13 mm, suficientes en la mayoría de los casos para abarcar toda la sección. Los péptidos usados para cada sección se etiquetan debajo de cada panel y dentro de cada panel el diente está orientado con la raíz hacia la parte superior de la imagen y la corona hacia el fondo. Las capas de tejido están marcadas como sigue: RTD = Dentina de punta de raíz; CPD = Dentina Circumpulpa; MD = manto dentina; P = pared de la cavidad pulpar; DEJ = unión dentina-esmalte; E = esmalte; BE = esmalte basal; CE = esmalte cortical; CL = Lesión Cariosa; PB = hueso periodontal.

30 La Figura 5 proporciona micrografías de fluorescencia que muestran unión específica de péptidos DSS y variantes a lesiones cariosas en dientes. Los dientes humanos adultos se expusieron a un péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína 12.5 pM sin desmineralización, se lavaron extensamente y se formaron imágenes por CLSM. Los 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 cariosa. Las 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 manchada.

La Figura 6 ilustra que las unidades estructurales de fijación de calcio descritos en el presente documento aumentan sustancialmente la velocidad de cicatrización en defectos de bóveda craneal de rata de diámetro crítico. La microTC muestra deposición ósea a las 3 semanas (escala incrustada en foto CT).

40 Las Figuras 7A, 7B y 7C muestran isotermas de equilibrio para la unión de péptidos y variantes seleccionados (DSS)<sub>n</sub> con HA. Figura 7A: Unión de péptidos que contienen (DSS)<sub>n</sub> de diversas longitudes. Figuras 7B y 7C: unión de variantes de secuencia,

La Figura 8, paneles A-D, muestran la unión de péptido 6DSS marcado fluorescentemente a nódulos de médula ósea mineralizados. Los cultivos de MBM se cultivaron y se formaron imágenes como se describe en el Ejemplo 6. Panel A: Imagen de campo brillante de nódulos de médula ósea de ratón mineralizados (MBMN) de un cultivo tratado con 6DSS. Panel B: Imagen de fluorescencia del campo mostrado en el panel A. Panel C: Imagen de campo brillante de MBMNs mineralizadas de un cultivo tratado con péptido de control mezclado. Panel D: Imagen de fluorescencia del campo mostrado en el panel C. Barras = 600 µm.

50 La Figura 9, paneles A-D, muestra la interacción del péptido 8DSS inmovilizado con CaHPO<sub>4</sub>. Se incubaron perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina (diámetro medio de 4 µm) con péptido 8DSS conjugado con biotina (Paneles A, C) o biotina no conjugada (Paneles B, D). Panel A: Micrografías de campo luminoso de agregados de fosfato de calcio amorfo acumulados alrededor de perlas recubiertas con DSS. Barra = 4 µm. Panel B: Imagen de campo brillante de perlas representativas bloqueadas con biotina (sin péptido DSS). Barra = 12 µm. Panel C: Micrografía de contraste de fase de un cordón recubierto con DSS con una acumulación más ordenada de fosfato de calcio alrededor de su exterior. Barra = 4 µm. Panel D: Muestra de control (bloqueada con biotina, sin péptido DSS). Barra = 4 µm

La Figura 10 muestra la unión de DSS marcado a dentina en dientes humanos. Superior: Imagen confocal de un péptido marcado con fluorescencia (DSS)<sub>8</sub> en un diente humano seccionado, mostrando el esmalte (E) y la dentina (D). Las flechas indican la DEJ. Parte inferior: Imagen confocal del mismo diente, en la región entre la dentina del

manto (derecha) y la cavidad pulpar (izquierda), mostrando preferencia de este péptido por la dentina del manto sobre la dentina circumpulpar y el esmalte. Baras = 50  $\mu$ m

La Figura 11, paneles A-D, muestran micrografías electrónicas de barrido de secciones de diente sagital, tratadas como se indica: Panel A: control no tratado; Panel B: pretratado con 8DSS durante 1 h, enjuagado y remineralizado usando desensibilizador Quel1; Panel C: preincubado con regulador (50 mM HEPES, pH 7,0), seguido por remineralización como en el panel B; Panel D: sin preincubación, remineralización como en el panel B. Barras = 50  $\mu$ m.

Figura 12 Figura 1: Comparación de las uñas tratadas con péptido (izquierda 2 dedos, marcadas con "A") y tratadas simultáneamente (dientes a la derecha, marcadas con "P") el día 19 del experimento. Los dedos 1 y 2 se trataron con (D)-DSS en la nanoemulsión de AOT/isopropanol cada tres días durante 19 días. Significativamente más crecimiento se observa en estos clavos que en los dedos 3 y 4, que fueron tratadas con PBS.

La Figura 13 muestra una comparación del crecimiento de uñas relacionado con diversos tratamientos. Después de 19 días de tratamiento, se midieron las uñas y se determinó la cantidad de nuevo crecimiento para cada tratamiento. El nuevo crecimiento fue significativamente mayor en las uñas tratadas con formulaciones (D)-DSS

Descripción detallada de la invención

En ciertas realizaciones esta invención se refiere al descubrimiento de que los agentes de unión al calcio (por ejemplo, los péptidos) descritos en el presente documento y en la publicación PCT No. WO/2007/038683 inducen crecimiento del cabello y/o crecimiento de las uñas. Se cree que los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento pueden usarse para restaurar el cabello y/o para inhibir la pérdida del cabello en los mamíferos y/o para inducir el crecimiento y/o la reparación de las uñas.

En ciertas realizaciones, los métodos implican administrar a un sujeto que lo necesite uno o más péptidos de unión al calcio (por ejemplo, como se describe en el presente documento y/o solicitud PCT WO/2007/038683) y/o uno o más de las demás unidades estructurales descritas en el presente documento. En diversas realizaciones, los péptidos que se unen al calcio y/u otras unidades estructurales se proporcionan en formas no degradables. Los péptidos no degradables ilustrativos pueden consistir, por ejemplo, en péptidos con todos los aminoácidos constituyentes en el estereoisómero (D), péptidos con esqueletos modificados, peptidomiméticos o polímeros derivatizados tales como polímeros, copolímeros o dendrímeros lineales conjugados con péptidos.

La administración de estos péptidos a sitios con pérdida de cabello hace que el cabello crezca a velocidades significativamente mayores que las normalmente observadas. En ciertas realizaciones, esta administración puede conseguirse mediante administración tópica, administración dérmica, administración intradérmica, administración transdérmica, administración subdérmica, inyección transdérmica, iontoforesis transdérmica (véase la Patente de los Estados Unidos No. 6,526,316), implantación quirúrgica u otros medios. En ciertas realizaciones, el compuesto se formula con un vehículo aceptable tal como, por ejemplo, micelas inversas de polímero, dimetilsulfóxido (DMSO), y similares para administración tópica, o solución salina normal para inyección o implantación quirúrgica. Además, las formas de dendrímeros en sí mismas pueden mostrar una penetración transdérmica mejorada en aplicación tópica sin el uso de portadores exóticos.

Las ventajas de este enfoque incluyen, pero no se limitan a su eficacia, ya que los enfoques actualmente existentes, incluyendo la finasterida, proporcionan sólo un rebrote limitado del cabello. El crecimiento observado hasta ahora usando péptidos de unión al calcio en un modelo de ratón es más significativo que el informado para otros compuestos usando otros sistemas experimentales. Estos métodos han sido probados en un modelo animal (ratón) y han demostrado ser seguros y eficaces en ensayos en este sistema.

Además, los diversos unidades estructurales de unión a calcio descritos en el presente documento pueden unirse a superficies de una manera específica del tejido. En ciertas realizaciones se han identificado variantes que se unen específicamente a dentina o esmalte (ver, por ejemplo, Figura 3), hueso periodontal (humano), huesos largos (rata), superficies minerales degradadas (caries en el modelo dental) y titanio (con una interfaz de unión). Las pruebas de toxicidad no muestran toxicidad aguda, ningún daño en los órganos y ninguna respuesta antigénica.

En diversas realizaciones, estas construcciones se pueden dirigir a 1) reclutar capas de fosfato de calcio a superficies de dientes pretratadas (véase la Figura 3); 2) formación de cristales nucleares de hidroxiapatita en el esmalte, dentina y superficies abióticas; 3) proporcionar la administración dirigida de compuestos antimicrobianos a biopelículas microbianas portadoras de calcio; 4) aumentar sustancialmente la tasa de curación en defectos críticos; 5) unirse a cristales de oxalato de calcio; y 6) distinguir entre los fosfatos de calcio y los cristales de fosfato de estroncio. Estos usos son ilustrativos y no limitativos.

En diversas realizaciones, los péptidos que enlazan al calcio y/o las unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento y/o las construcciones químicas que los comprenden pueden usarse para remineralizar defectos dentales; diagnosticar defectos óseos y dentales, mejorar la osteointegración en implantes dentales y otros implantes óseos; mejorar la curación ósea; tratar la osteomielitis y la osteoporosis; inhibir la mineralización inapropiada; y dirigir los efectos terapéuticos a defectos de tejido mineralizado o sitios de mineralización inapropiados. Estos usos

son ilustrativos y no limitativos.

Agentes de unión al calcio.

Péptidos de unión al calcio (péptidos "DSS").

En ciertas realizaciones, los agentes de unión al calcio incluyen, pero no se limitan a, péptidos que se unen al calcio. Los péptidos de unión al calcio son unidades estructurales que comprenden o consisten en uno o más dominios peptídicos de unión al calcio (por ejemplo, dominios peptídicos DSS tales como los descritos en la Publicación PCT WO 2007/038683 que se incorpora en el presente documento como referencia para los péptidos que enlazan al calcio descritos aquí). Cuando están presentes múltiples dominios peptídicos de unión al calcio, pueden conjugarse químicamente conjuntamente o pueden unirse directamente, por ejemplo, a un enlace peptídico o unirse, por ejemplo a través de un enlazante peptídico para formar péptidos de unión al calcio de múltiples dominios.

En ciertas realizaciones, se proporcionan una serie de péptidos de unión al calcio formados por variaciones del motivo Asp-Ser-Ser (péptidos "DSS"), así como porciones que comprenden múltiples péptidos que se unen al calcio. Se ha demostrado que estos péptidos "DSS" se unen firmemente y específicamente a las superficies de fosfato de calcio. Además, se ha demostrado que estos péptidos reclutan fosfato de calcio a tales superficies y sirven como unidades estructurales de unión para la unión de marcadores fluorescentes a superficies calcificadas independientemente de su estado de fosforilación.

Los péptidos/dominios peptídicos descritos en el presente documento, referidos generalmente como péptidos DSS, pueden estar compuestos de varios números y/o combinaciones de una subunidad; el motivo de Asp-Ser-Ser de tres aminoácidos de DPP o variaciones de los mismos. Ejemplos de tres repeticiones de aminoácidos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, Asp-Ser-Ser (DSS), Glu-Ser-Ser (ESS), Asp-Thr-Thr (DTT), Glu-Thr-Thr (ETT), Asn-Ser-Ser (NSS), Asn-Thr-Thr (NTT), Gln-Ser-Ser (QSS), Gln-Thr-Thr (QTT) y sus variaciones. Alternativamente o además de estas secuencias repetidas, los péptidos descritos en el presente documento pueden incluir variaciones menores de estas repeticiones, incluyendo pero sin limitarse a Asp-Ser-Thr (DST), Asp-Ala-Ala (DAA) o Ala-Ser-Thr (AST), y similares. En diversas realizaciones uno o más residuos de aminoácidos dentro de una repetición de tres aminoácidos pueden ser modificados químicamente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones los péptidos pueden contener uno o más residuos Ser o Thr en los que un grupo hidroxilo ha sido modificado por la adición de un grupo fosfato (pSer, pThr), etc. En diversas realizaciones los péptidos varían en longitud desde tres a más de cincuenta o 100 aminoácidos. En ciertas realizaciones otros residuos modificados incluyen, pero no se limitan a, la versión fosforilada, sulfatada, sulfonada o acilada de Ser, Thr, Gly o Ala.

La afinidad de unión de los péptidos descritos en el presente documento para las superficies calcificadas se puede controlar alterando la composición y el número de repeticiones. Por ejemplo, la inclusión de una o más repeticiones de Asp-Ser-Ser aumentará la afinidad de unión del péptido, porque esta secuencia exhibe la afinidad más alta de cualquiera de las repeticiones probadas. La afinidad de unión del péptido también puede aumentarse aumentando el número de tres repeticiones de aminoácidos. Los péptidos que contienen más de seis repeticiones muestran generalmente una mayor afinidad de unión que aquellos con menos repeticiones. En ciertas realizaciones, los péptidos descritos en el presente documento pueden tener una afinidad de unión (KA) para hidroxiapatita superior a  $15.000 \text{ M}^{-1}$ . En ciertas realizaciones, esta afinidad de unión puede ser superior a  $50.000 \text{ M}^{-1}$ , en otras realizaciones superiores a  $100.000 \text{ M}^{-1}$ , en otras realizaciones superiores a  $200.000 \text{ M}^{-1}$ , y en otras realizaciones superiores a  $300.000 \text{ M}^{-1}$ .

En ciertas realizaciones, los péptidos pueden contener uno o más aminoácidos adicionales que no forman parte de una secuencia de repetición de tres aminoácidos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la porción repetida del péptido puede fusionarse con una secuencia de aminoácidos que tiene una funcionalidad adicional, tal como por ejemplo una secuencia de péptidos antimicrobiana tal como 2c-4 (RWRWRWF, SEQ ID NO: 1), PL135 (FHFHLHF, SEQ ID NO: 2), b-34 (LKRF LKWF KRF, SEQ ID NO: 3), y similares. En ciertas de estas realizaciones, la porción repetida del péptido puede fusionarse a la secuencia de aminoácidos adicional a través de una secuencia enlazante, tal como por ejemplo una secuencia de triglicina.

En ciertas realizaciones, los péptidos descritos en la presente invención comprenden la secuencia de subunidad (X-Y-Z)<sub>n</sub>, en la que X es un aminoácido seleccionado entre ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), asparagina (Asn), alanina (Ala) y glutamina (Gln), Y y Z son aminoácidos seleccionados de alanina (Ala), serina (Ser), treonina (Thr), fosfoserina (pSer), fosfotreonina (pThr) y sus derivados y n es un número entre 1 y 100, con preferencia entre aproximadamente 2 a aproximadamente 50 o 100, variando más preferiblemente entre aproximadamente 4 y aproximadamente 20. En ciertas realizaciones, n oscila entre 1 y 15, en otras realizaciones, n oscila entre 1 y 10 y en ciertas realizaciones n oscila entre 3 y 4, 6, u 8. En ciertas realizaciones, n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25. Se muestran en la Tabla 2 subunidades ilustrativas de 3 aminoácidos "DSS" ("XYZ").

Tabla 2. Subunidades "DSS" (XYZ) ilustrativas.

# ES 2 626 327 T3

| X   | Y    | Z    |  | X   | Y    | Z    |
|-----|------|------|--|-----|------|------|
| Asp | Ala  | Ala  |  | Asn | Thr  | pSer |
| Asp | Ala  | Ser  |  | Asn | Thr  | pThr |
| Asp | Ala  | Thr  |  | Asn | pSer | Ala  |
| Asp | Ala  | pSer |  | Asn | pSer | Ser  |
| Asp | Ala  | pThr |  | Asn | pSer | Thr  |
| Asp | Ser  | Ala  |  | Asn | pSer | pSer |
| Asp | Ser  | Ser  |  | Asn | pSer | pThr |
| Asp | Ser  | Thr  |  | Asn | pThr | Ala  |
| Asp | Ser  | pSer |  | Asn | pThr | Ser  |
| Asp | Ser  | pThr |  | Asn | pThr | Thr  |
| Asp | Thr  | Ala  |  | Asn | pThr | pSer |
| Asp | Thr  | Ser  |  | Asn | pThr | pThr |
| Asp | Thr  | Thr  |  | Ala | Ala  | Ala  |
| Asp | Thr  | pSer |  | Ala | Ala  | Ser  |
| Asp | Thr  | pThr |  | Ala | Ala  | Thr  |
| Asp | pSer | Ala  |  | Ala | Ala  | pSer |
| Asp | pSer | Ser  |  | Ala | Ala  | pThr |
| Asp | pSer | Thr  |  | Ala | Ser  | Ala  |
| Asp | pSer | pSer |  | Ala | Ser  | Ser  |
| Asp | pSer | pThr |  | Ala | Ser  | Thr  |
| Asp | pThr | Ala  |  | Ala | Ser  | pSer |
| Asp | pThr | Ser  |  | Ala | Ser  | pThr |
| Asp | pThr | Thr  |  | Ala | Thr  | Ala  |
| Asp | pThr | pSer |  | Ala | Thr  | Ser  |
| Asp | pThr | pThr |  | Ala | Thr  | Thr  |
| Glu | Ala  | Ala  |  | Ala | Thr  | pSer |
| Glu | Ala  | Ser  |  | Ala | Thr  | pThr |
| Glu | Ala  | Thr  |  | Ala | pSer | Ala  |
| Glu | Ala  | pSer |  | Ala | pSer | Ser  |
| Glu | Ala  | pThr |  | Ala | pSer | Thr  |
| Glu | Ser  | Ala  |  | Ala | pSer | pSer |
| Glu | Ser  | Ser  |  | Ala | pSer | pThr |
| Glu | Ser  | Thr  |  | Ala | pThr | Ala  |
| Glu | Ser  | pSer |  | Ala | pThr | Ser  |

|     |      |      |  |     |      |      |
|-----|------|------|--|-----|------|------|
| Glu | Ser  | pThr |  | Ala | pThr | Thr  |
| Glu | Thr  | Ala  |  | Ala | pThr | pSer |
| Glu | Thr  | Ser  |  | Ala | pThr | pThr |
| Glu | Thr  | Thr  |  | Gln | Ala  | Ala  |
| Glu | Thr  | pSer |  | Gln | Ala  | Ser  |
| Glu | Thr  | pThr |  | Gln | Ala  | Thr  |
| Glu | pSer | Ala  |  | Gln | Ala  | pSer |
| Glu | pSer | Ser  |  | Gln | Ala  | pThr |
| Glu | pSer | Thr  |  | Gln | Ser  | Ala  |
| Glu | pSer | pSer |  | Gln | Ser  | Ser  |
| Glu | pSer | pThr |  | Gln | Ser  | Thr  |
| Glu | pThr | Ala  |  | Gln | Ser  | pSer |
| Glu | pThr | Ser  |  | Gln | Ser  | pThr |
| Glu | pThr | Thr  |  | Gln | Thr  | Ala  |
| Glu | pThr | pSer |  | Gln | Thr  | Ser  |
| Glu | pThr | pThr |  | Gln | Thr  | Thr  |
| Asn | Ala  | Ala  |  | Gln | Thr  | pSer |
| Asn | Ala  | Ser  |  | Gln | Thr  | pThr |
| Asn | Ala  | Thr  |  | Gln | pSer | Ala  |
| Asn | Ala  | pSer |  | Gln | pSer | Ser  |
| Asn | Ala  | pThr |  | Gln | pSer | Thr  |
| Asn | Ser  | Ala  |  | Gln | pSer | pSer |
| Asn | Ser  | Ser  |  | Gln | pSer | pThr |
| Asn | Ser  | Thr  |  | Gln | pThr | Ala  |
| Asn | Ser  | pSer |  | Gln | pThr | Ser  |
| Asn | Ser  | pThr |  | Gln | pThr | Thr  |
| Asn | Thr  | Ala  |  | Gln | pThr | pSer |
| Asn | Thr  | Ser  |  | Gln | pThr | pThr |
| Asn | Thr  | Thr  |  |     |      |      |

En diversas realizaciones, se contemplan sustituciones conservadoras de aminoácidos para cada posición (X, y/o Y, y/o Z).

Las subunidades pueden repetirse de forma contigua (por ejemplo, 8DSS: DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, SEQ ID NO: 4), o, en ciertas realizaciones, una o más subunidades pueden intercalarse con una o más subunidades (por ejemplo, DSS NSS DSS NSS (SEQ ID NO: 5), y similares), y/o con secuencias de no subunidades. En ciertas formas de realización, dominios que comprenden una o más subunidades (por ejemplo, n = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, etc.) entre sí para formar agentes de unión al calcio que comprenden múltiples dominios de unión al calcio. Los dominios se pueden unir a cada uno directamente, o a través de un enlazante químico para formar conjugados o pueden unirse a través de un enlazante peptídico para

formar un péptido/proteína de dominio múltiple.

En ciertas realizaciones, la unidad estructural de dominio de unión múltiple comprende al menos dos dominios, al menos tres dominios, al menos cuatro dominios, al menos cinco dominios, al menos seis dominios o más. Los dominios de unión a Ca que comprenden tal constructo pueden ser iguales o diferentes.

- 5 Como se indicó anteriormente, varios dominios de unión a Ca que comprenden tal constructo pueden unirse directamente entre sí, o dos, o más de dichos dominios pueden unirse entre sí a través de un enlace. En la Tabla 3 se proporciona una lista ilustrativa, pero no limitativa, de conectores adecuados.

10 Tabla 3. Agentes de unión peptídicos y no peptídicos ilustrativos para unir dominios de unión a Ca y/o para unir una unidad estructural de unión a Ca (por ejemplo, péptido) a uno o más efectores (por ejemplo, AMPs, marcadores detectables y similares).

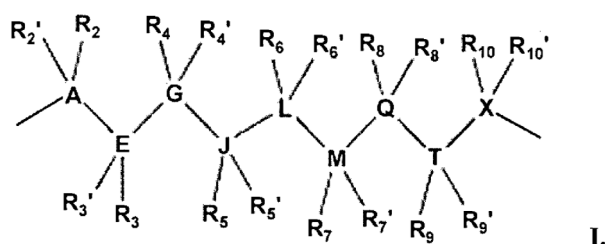
| Vinculador                                                 | SEQ ID NO: |
|------------------------------------------------------------|------------|
| AAA                                                        |            |
| SAT                                                        |            |
| PYP                                                        |            |
| ASA                                                        |            |
| GGG                                                        |            |
| SGG                                                        |            |
| GGGG                                                       | 6          |
| GGGGG                                                      | 7          |
| GGSGGS                                                     | 8          |
| ASASA                                                      | 9          |
| PSGSP                                                      | 10         |
| PSPSP                                                      | 11         |
| ASASA                                                      | 12         |
| PSPSP                                                      | 13         |
| KKKK                                                       | 14         |
| RRRR                                                       | 15         |
| Gly <sub>4</sub> Ser                                       | 16         |
| (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>2</sub>                        | 17         |
| (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>3</sub>                        | 18         |
| (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>4</sub>                        | 19         |
| (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>5</sub>                        | 20         |
| (Gly <sub>4</sub> Ser) <sub>6</sub>                        | 21         |
| 2-nitrobenceno u O-nitrobencilo                            |            |
| Disulfuro de nitropiridilo                                 |            |
| Dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)                       |            |
| Ácido S-acetilmercaptosuccínico                            |            |
| 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTA) |            |

|                                                                                                                                           |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| β-glucurónido y variantes de β-glucurónido                                                                                                |  |
| Poli(ácido alquilacrílico)                                                                                                                |  |
| Enlazantes basados en benceno (por ejemplo: 2,5-bis (hexiloxi)-1,4-bis[2,5-bis(hexiloxi)-4-formil-fenilenilvinileno]benceno) y similares. |  |
| Uniones disulfuro                                                                                                                         |  |
| Poli(amidoamina) o dendrímeros similares que enlazan múltiples péptidos diana y letales en una molécula                                   |  |
| Nanotubos de carbono                                                                                                                      |  |
| Enlazantes de hidrazona y variantes de hidrazona                                                                                          |  |
| PEG de cualquier longitud de cadena                                                                                                       |  |
| Succinato, formiato, acetato, butirato, otros ácidos orgánicos similares                                                                  |  |
| Aldoles, alcoholes o enoles                                                                                                               |  |
| Peróxidos                                                                                                                                 |  |
| Grupos alcano o alqueno de cualquier longitud de cadena                                                                                   |  |
| Una o más moléculas de porfirina o colorantes que contienen grupos amida y ácido carboxílico libres                                       |  |
| Uno o más nucleótidos de ADN o ARN, incluyendo variantes que contienen poliamina y policarboxilo                                          |  |
| Inulina, sacarosa, glucosa, u otros mono, di o polisacáridos                                                                              |  |
| Ácido linoléico u otros ácidos grasos poliinsaturados                                                                                     |  |
| Variantes de cualquiera de los enlazantes anteriores que contienen grupos halógeno o tiol                                                 |  |
| (Todos los enlazantes basados en aminoácidos podrían ser L, D, β, esqueleto de PEG, u otras formas)                                       |  |

Compuestos similares a DSS.

5 En ciertas realizaciones se proporcionan unidades estructurales de fijación de calcio de tipo DSS más generales. Típicamente tales compuestos DSS se componen de monómeros que tienen por lo menos 9 átomos de longitud, con una unidad estructural de ácido acético o su equivalente fisicoquímico unidos al segundo átomo y una unidad estructural metanólica o de hidroximetilo o su equivalente fisicoquímico unida a los átomos 5 y 8. Este monómero puede repetirse cualquier número de veces y puede estar unido a cualquier otra unidad estructural.

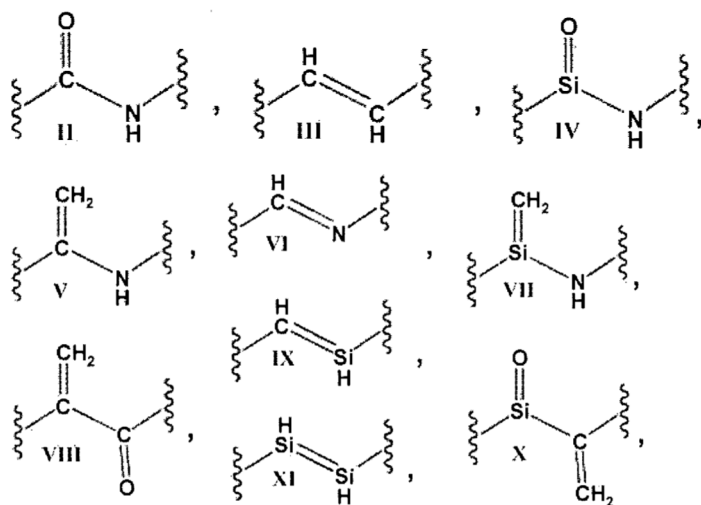
Incluso de forma más general, esto representa un polímero o concatámero de subunidades de la forma mostrada a continuación en la Fórmula I:



10 Típicamente, las posiciones E, G, L, M, T y X pueden cada una consistir en carbono, nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, azufre, boro o selenio, en cualquier combinación o configuración químicamente compatible, R<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>', R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub>', R<sub>6</sub>, R<sub>6</sub>', R<sub>7</sub>, R<sub>7</sub>', R<sub>9</sub>, R<sub>9</sub>', R<sub>10</sub>, R<sub>10</sub>', presente o ausente según se requiera para satisfacer la valencia del átomo de cadena principal pertinente.

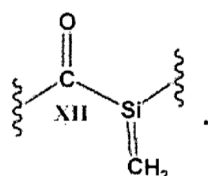
15 En diversas realizaciones, preferiblemente, los enlaces E-G, y/o L-M, y/o T-X tienen un carácter de doble enlace

significativo, ya sea como doble enlace directo o como parte de un sistema orbital conjugado extendido. Ejemplos de sistemas de esta naturaleza incluyen, pero no se limitan a estructuras de acuerdo con las Fórmulas II-XII:

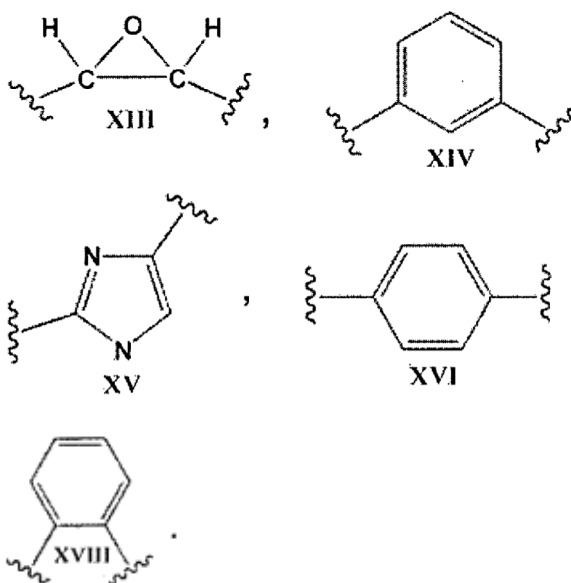


5

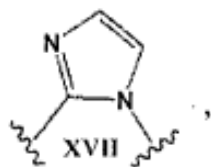
, y



En ciertas realizaciones es posible que enlaces estructuralmente restringidos o aromáticos puedan llenar estas posiciones. Tales enlaces incluyen, pero no se limitan a, estructuras de acuerdo con las fórmulas XIII-XVIII:



10

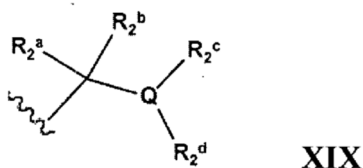


y

y similares.

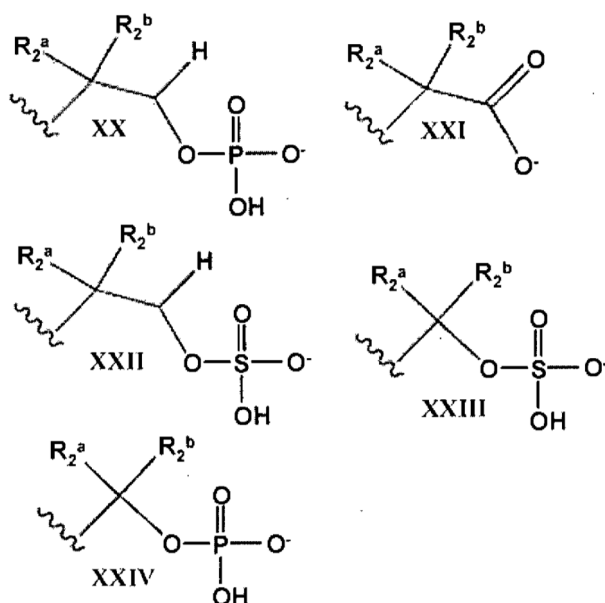
15

Cuando  $R_2$  se compone de cualquier unidad estructural distinta de H, Cl, I, F, Br o  $\text{CH}_3$ ,  $R_2'$  es preferiblemente H, Cl, I, F, Br o  $\text{CH}_3$  y viceversa. En diversas realizaciones, las unidades estructurales distintas de H, Cl, I, F, Br o  $\text{CH}_3$  en esta posición tienen la forma de la Fórmula XIX:

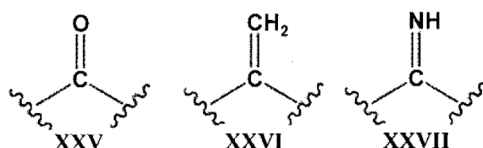


en la que el átomo Q es carbono, nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, azufre, boro o selenio, en cualquier configuración químicamente compatible, con  $R_2^d$  presente o ausente según se requiera para satisfacer la valencia del átomo Q, y donde  $R_2^a$  y  $R_2^b$  cada uno de ellos consiste en un pequeño grupo no impedido estéricamente tal como H, Cl, I, F, Br o  $CH_3$  y similares, y  $R_2^d$  o  $R_2^c$  consisten en un grupo cargado negativamente, tal como sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), fosfato ( $PO_4^{2-}$ ), o un oxígeno de carboxilato, y similares. En ciertas realizaciones en las que  $R_2^c$  es una unidad estructural con carga negativa y  $R_2^d$  está presente,  $R_2^d$  es un pequeño grupo no impedido estéricamente tal como un oxígeno de carbonilo o H, Cl, I, F, Br o  $CH_3$ , y viceversa.

Ejemplos de unidades estructurales para  $R_2$  o  $R_2'$  incluyen, pero no se limitan a estructuras de acuerdo con las Fórmulas XX-XXIV:

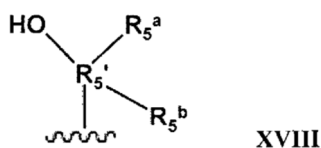


En diversas realizaciones,  $R_3$ ,  $R_3'$ ,  $R_4$ ,  $R_4'$ ,  $R_6$ ,  $R_6'$ ,  $R_7$ ,  $R_7'$ ,  $R_9$ ,  $R_9'$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{10}'$ , puede ser cualquier unidad estructural relativamente libre, como químicamente apropiada dada la identidad de E, G, L, M, T y X. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-SiH_3$ ,  $-SH$ ,  $-SH$ ,  $-BH_2$ , H, I, Cl, Br, F, o grupos etilo, carbonilo o amina secundaria incluyendo, pero sin limitarse a, estructuras de acuerdo con las Fórmulas XXV-XXVII:



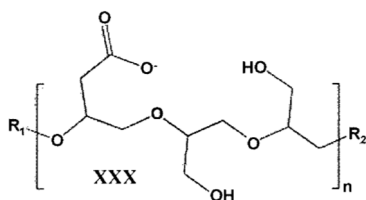
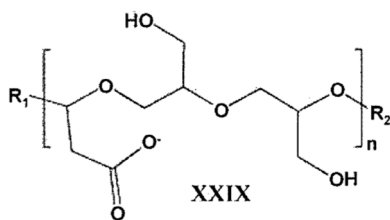
En ciertas realizaciones en las posiciones  $R_5$  y  $R_5'$ , una posición puede estar ocupada por un grupo hidroxilo situado a un centro del esqueleto, y el otro ocupado por un pequeño grupo estéricamente libre de obstáculos, preferiblemente H, pero también Cl, I, Br, F,  $-OH$ ,  $-CH_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-SiH_3$ ,  $-SH$ ,  $-SH$ ,  $-BH_2$  y similares no están prohibidos.

Un ejemplo de un grupo hidroxilo situado a un centro de distancia del esqueleto es una estructura de acuerdo con la Fórmula XVIII:



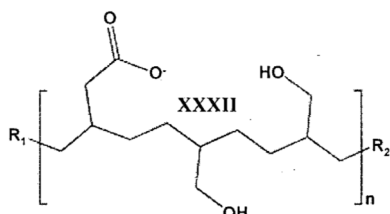
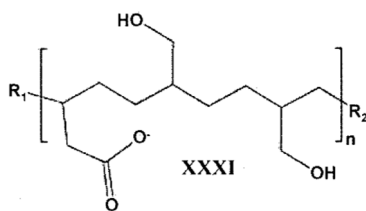
Aquí, en diversas realizaciones,  $R_5'$  es carbono, nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, azufre, boro o selenio, en cualquier configuración químicamente razonable y  $R_5^a$ ,  $R_5^b$  son pequeños grupos independientemente seleccionados no impedidos estéricamente (por ejemplo, H, Cl, Br, I, F,  $CH_3$ , OH, etc.).

Los compuestos específicos con actividad adecuada incluyen, pero no se limitan a: Compuestos con un esqueleto de polietilenglicol (PEG) incluyendo, pero sin limitarse a, estructuras de acuerdo con las fórmulas XXIX y XXX:



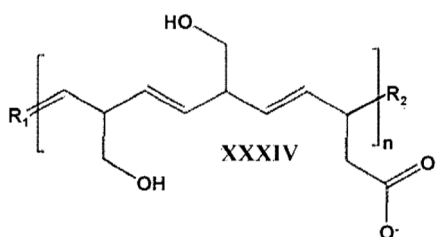
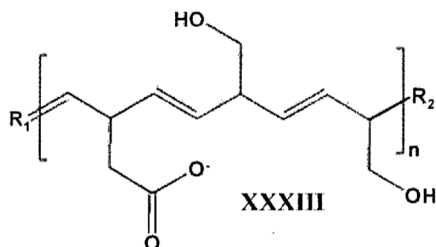
5 Estas estructuras son equivalentes excepto cuando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> imparten direccionalidad.

Compuestos con un esqueleto alcano que incluyen, pero no se limitan a estructuras de acuerdo con las Fórmulas XXXI y XXXII:



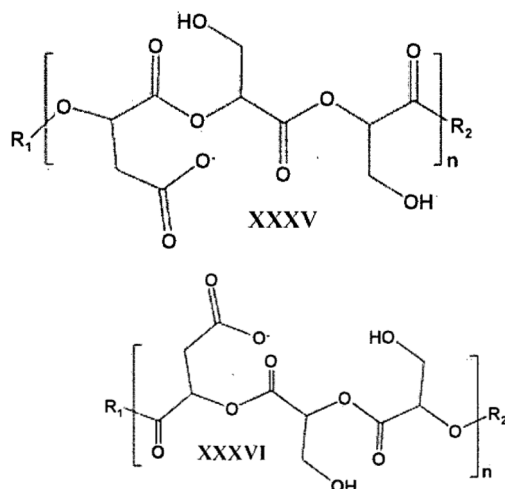
10 Estas estructuras son equivalentes excepto cuando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> imparten direccionalidad.

Compuestos con una cadena principal puenteada con etileno incluyendo, pero sin limitarse a, estructuras de acuerdo con las fórmulas XXXIII y XXXIV:



15 Estas estructuras son equivalentes excepto cuando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> imparten direccionalidad.

Compuestos con un esqueleto de éster incluyen, pero no se limitan a, esqueletos representados por las estructuras de acuerdo con las fórmulas XXXV y XXXVI:

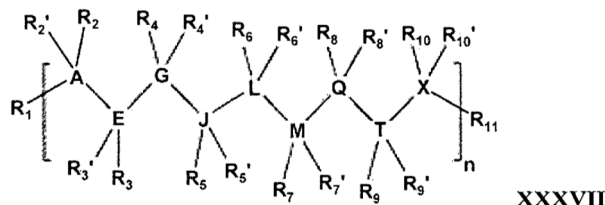


- 5 Estas estructuras son equivalentes excepto cuando  $R_1$  y  $R_2$  imparten direccionalidad. De nuevo se apreciará que se contemplan concatámeros que comprenden estas subunidades (y/u otras subunidades descritas en el presente documento) con o sin enlaces intermedios. Cuando uno o más enlaces separan subunidades, en ciertas realizaciones, el concatámero comprende al menos 2, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4, todavía más preferiblemente al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 subunidades. En diversas realizaciones en las que las subunidades están separadas por uno o más enlaces, al menos dos de las subunidades están separadas por un enlace que proporciona una longitud de persistencia equivalente o superior a aproximadamente 4 aminoácidos (por ejemplo, aproximadamente 14 Å o mayor).

Compuestos adicionales incluyen compuestos con un esqueleto peptídico.

- 15 En diversas realizaciones, las subunidades de los compuestos descritos en el presente documento son adyacentes entre sí y el compuesto es un polímero de estas subunidades. En ciertas realizaciones, uno o más enlaces pueden separar las subunidades. Típicamente, sin embargo, al menos dos subunidades serán adyacentes entre sí en una unidad estructural de enlace de calcio. Por lo tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones ilustrativas, la unidad estructural de unión al calcio puede comprender una estructura de la forma  $S^1_w-S^2_x-L^1_y-S^3_z-S^4_m$ , o  $S^1_w-S^2_x-L^1_y-S^3_z-L^2_n-S^4_m$  donde el "S" indica una subunidad como se describe en el presente documento, "L" indica un enlace (por ejemplo, como se muestra en la Tabla 3), y w, x, y, z y m están en el intervalo de 0 a 100, más preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para "n"), más preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25. Típicamente, cuando las subunidades no son adyacentes, están separadas por un enlace que tiene una longitud de persistencia mayor o igual a al menos uno, dos o tres aminoácidos, preferiblemente mayor que o igual a 4 aminoácidos.

- 25 En ciertas realizaciones las unidades estructurales descritas en el presente documento pueden comprender regiones representadas por la Fórmula XXXVII:



- 30 en la que  $R_1$  y  $R_{11}$  están presentes o ausentes de manera independiente y cuando están presentes se seleccionan del grupo que consiste en un sustrato sólido (por ejemplo, una superficie, una partícula, nanopartículas, etc.) y/o un efector (por ejemplo, como se describe en el presente documento), y n oscila entre aproximadamente 2, 3, o 4 hasta aproximadamente 100 (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente). Diversos efectores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, marcadores detectables, fármacos, vehículos para fármacos, péptidos antimicrobianos, y similares.

- 35 En diversas realizaciones, los agentes descritos en el presente documento (por ejemplo, las unidades estructurales de tipo DSS) excluyen expresamente uno o más de los agentes descritos en la Publicación PCT WO 2007/038683. De acuerdo con esto, en ciertas realizaciones, las fórmulas aquí descritas excluyen expresamente los péptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos  $(X-Y-Z)_n$ , donde X es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) asparagina (Asn), alanina (Ala) y glutamina (Gln) e Y y Z son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en alanina (Ala), serina (Ser), treonina

(Thr), fosfoserina (pSer), fosfotreonina (PThr) y sus derivados; y n oscila entre 1 y 100. En ciertas realizaciones las fórmulas descritas aquí excluyen expresamente una o más de las subunidades mostradas en la Tabla 2.

Grupos protectores.

Aunque los diversos péptidos descritos en el presente documento se pueden mostrar sin grupos protectores, en ciertas realizaciones pueden soportar uno, dos, tres, cuatro o más grupos protectores. En diversas realizaciones, los grupos protectores pueden acoplarse al extremo C y/o N del péptido o péptidos y/o a uno o más residuos internos que comprenden el péptido (es decir, uno o más grupos R en los aminoácidos constituyentes puede ser bloqueado). Por lo tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones, cualquiera de los péptidos descritos en el presente documento puede soportar, por ejemplo, un grupo acetilo que protege el extremo amino y/o un grupo amida que protege el extremo carboxilo.

En diversas realizaciones, la adición de un grupo protector, particularmente al carboxilo y en ciertas realizaciones, al extremo amino puede mejorar la estabilidad y/o la eficacia del péptido.

Un gran número de grupos protectores son adecuados para este propósito. Tales grupos incluyen, pero no se limitan a, grupos acetilo, amida y alquilo, siendo particularmente preferidos los grupos acetilo y alquilo para la protección N-terminal y siendo preferidos los grupos amida para la protección del terminal carboxilo. En ciertas realizaciones particularmente preferidas, los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, cadenas alquílicas como ácidos grasos, propeonilo, formilo y otros. Los grupos protectores de carboxilo particularmente preferidos incluyen amidas, ésteres y grupos protectores formadores de éter. En una realización preferida, se utiliza un grupo acetilo para proteger el terminal amino y se usa un grupo amida para proteger el extremo carboxilo. Estos grupos bloqueantes mejoran las tendencias formadoras de hélices de los péptidos. Algunos grupos bloqueantes particularmente preferidos incluyen grupos alquilo de diversas longitudes, por ejemplo, grupos que tienen la fórmula:  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$  donde n oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 16 o 18, más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 13, y lo más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10.

En ciertas realizaciones, los grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, cadenas alquílicas como en ácidos grasos, propeonilo, formilo y otros. Los grupos protectores de carboxilo particularmente preferidos incluyen amidas, ésteres y grupos protectores formadores de éter. En una realización, se usa un grupo acetilo para proteger el terminal amino y/o se usa un grupo amino para proteger el terminal carboxilo (es decir, el C-terminal carboxilo amidado). En ciertas realizaciones los grupos de bloqueo incluyen grupos alquilo de diversas longitudes, por ejemplo, grupos que tienen la fórmula:  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}-$  donde n oscila entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20, preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 16, más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 13, y lo más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 10.

En ciertas realizaciones, el grupo ácido en el C-terminal se puede bloquear con un grupo alcohol, aldehído o cetona y/o el residuo N-terminal puede tener el grupo amida natural, o bloquearse con un grupo acilo, ácido carboxílico, alcohol, aldehído o cetona.

Otros grupos protectores incluyen, pero no se limitan a, Fmoc, t-butoxicarbonilo (t-BOC), grupo 9-fluorenoacetilo, grupo 1-fluorencarboxílico, grupo 9-fluorencarboxílico, grupo 9-fluorenona-grupo 1-carboxílico, benciloxicarbonilo, xantilo (Xan), Tritel (Trt), 4-metiltritel (Mtt), 4-metoxitritel (Mmt), 4-metoxi-2,3,6-trimetil-bencenosulfonilo (Mtr), mesitileno-2-sulfonilo (Mts), 4,4-dimetoxibencililo (Mbh), tosilo (Tos), 2,2,5,7,8-pentametil croman-6-sulfonilo (Pmc), 4-metilbencil (Mebzl), 4-metoxibencilo (MeOBzl), benciloxi (BzlO), bencil (Bzl), benzoilo (Bz), 3-nitro-2-piridinasulfenilo (Npys), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)etilo (Dde), 2,6-diclorobencil (2,6-DiCl-Bzl), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), benciloximetilo (Bom), ciclohexiloxi (cHxO), t-butoximetilo (Bum), t-butoxi (tBuO), t-butilo (tBu), acetilo (Ac) y trifluoroacetilo (TFA).

Los grupos protectores/bloqueantes son bien conocidos por los expertos en la técnica, así como los métodos de acoplamiento de tales grupos al residuo o unidades estructurales apropiados que comprenden los péptidos de esta invención (véase, por ejemplo, Greene et al., (1991) Projective Groups in Organic Synthesis, 2ª ed., John Wiley & Sons, Inc. Somerset, NJ). En la realización ilustrativa, por ejemplo, la acetilación se lleva a cabo durante la síntesis cuando el péptido está sobre la resina usando anhídrido acético. La protección de la amida puede conseguirse mediante la selección de una resina apropiada para la síntesis. Por ejemplo, se puede usar una resina de amida de pista. Después de la terminación de la síntesis, los grupos protectores semipermanentes sobre aminoácidos bifuncionales ácidos tales como Asp y Glu y el aminoácido básico Lys, hidroxilo de Tyr se eliminan simultáneamente. Los péptidos liberados a partir de una resina de este tipo usando tratamiento ácido salen con el N-terminal protegido como acetilo y el carboxilo protegido como  $\text{NH}_2$  y con la eliminación simultánea de todos los otros grupos protectores.

Cuando se describen secuencias de aminoácidos en el presente documento, se contemplan también las secuencias de aminoácidos que comprenden uno o más grupos protectores, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente (o cualquier otro grupo protector comercialmente disponible para aminoácidos usado, por ejemplo, en una síntesis de péptidos boc o fmoc).

Circulación peptídica.

En ciertas realizaciones, las unidades estructurales descritas en el presente documento (por ejemplo, péptidos de unión al calcio, constructos quiméricos que comprenden unidades estructurales de unión al calcio, etc.) se circularizan/ciclizan para producir péptidos cíclicos. Los péptidos cíclicos, como se contempla en el presente documento, incluyen cabeza/cola, cabeza/cadena lateral, cola/cadena lateral y péptidos ciclizados de cadena lateral/cadena lateral. Además, los péptidos contemplados aquí incluyen homodet, que contiene sólo enlaces peptídicos, y heterodet que contiene además enlaces disulfuro, éster, tioéster u otros enlaces.

Los péptidos cíclicos se pueden preparar utilizando prácticamente cualquier técnica conocida en el arte para la preparación de péptidos cíclicos. Por ejemplo, los péptidos se pueden preparar en forma lineal o no ciclizada usando síntesis de péptidos en solución o fase sólida convencionales y se ciclan usando química estándar. Preferiblemente, la química utilizada para ciclar el péptido será suficientemente suave para evitar degradar sustancialmente el péptido. Los procedimientos adecuados para sintetizar los péptidos descritos en el presente documento, así como las químicas adecuadas para ciclar los péptidos, son bien conocidos en la técnica.

En diversas realizaciones, la ciclización puede conseguirse mediante acoplamiento directo del extremo N y C para formar un enlace peptídico (u otro), pero también puede ocurrir a través de las cadenas laterales de aminoácidos. Además, puede basarse en el uso de otros grupos funcionales, incluyendo pero sin limitarse a amino, hidroxilo, sulfhidrilo, halógeno, sulfonilo, carboxi y tiocarboxilo. Estos grupos pueden estar situados en las cadenas laterales de aminoácidos o estar unidos a su extremo N o C-terminal.

Por consiguiente, debe entenderse que el enlace químico utilizado para ciclar covalentemente los péptidos de la invención no necesita ser un enlace amida. En muchos casos, puede ser deseable modificar los extremos N y C del péptido lineal o no ciclizado para proporcionar, por ejemplo, grupos reactivos que se pueden ciclar bajo condiciones de reacción suaves. Tales enlaces incluyen, a modo de ejemplo y no limitativo, amida, éster, tioéster,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ , etc. Las técnicas y reactivos para sintetizar péptidos que tienen terminales modificados y productos químicos adecuados para ciclar tales péptidos modificados son bien conocidos en la técnica.

Alternativamente, en los casos en los que los extremos del péptido están conformacionalmente o de otro modo restringidos para hacer difícil la ciclización, puede ser deseable fijar conectores a los terminales N y/o C-terminales para facilitar la ciclización del péptido. Por supuesto, se apreciará que dichos enlazantes soportarán grupos reactivos capaces de formar enlaces covalentes con los extremos del péptido. Los enlazantes y las sustancias químicas adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen los descritos anteriormente.

Los péptidos y depsipéptidos cíclicos (péptidos heterodéticos que incluyen enlaces éster (dépsidos) como parte de su esqueleto) han sido bien caracterizados y muestran un amplio espectro de actividad biológica. La reducción en la libertad conformacional provocada por la ciclización a menudo da lugar a mayores afinidades de unión al receptor. Frecuentemente en estos compuestos cíclicos, también se incorporan restricciones conformacionales adicionales, tales como el uso de aminoácidos D- y N-alquilados, aminoácidos  $\alpha,\beta$ -deshidro o residuos de aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos.

Los procedimientos para formar enlaces disulfuro en péptidos son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Eichler y Houghten (1997) *Protein Pept. Lett.*, 4: 157-164).

También se puede hacer referencia a Marlowe (1993) *Biorg. Med. Chem. Lett.* 3: 437-44 que describe la ciclización de péptidos sobre resina de TFA usando éster de trimetilsililo (TMSE) como un grupo protector ortogonal; Pallin and Tam (1995) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 2021-2022 que describen la ciclización de péptidos no protegidos en solución acuosa por formación de oxima; Algin et al. (1994) *Tetrahedron Lett.* 35: 9633-9636 que describen la síntesis en fase sólida de péptidos cíclicos de cabeza a cola mediante anclaje de cadena lateral de lisina; Kates et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34: 1549-1552 que describen la producción de péptidos cíclicos de cabeza a cola mediante una estrategia de fase sólida tridimensional; Tumelty et al. (1994) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1067-1068, que describen la síntesis de péptidos cíclicos a partir de un intermedio activado inmovilizado, donde la activación del péptido inmovilizado se lleva a cabo con el grupo N-protector intacto y la eliminación subsiguiente conduce a la ciclización; McMurray et al. (1994) *Peptide Res.* 7: 195-206 que describen la ciclización de cabeza a cola de péptidos unidos a soportes insolubles por medio de las cadenas laterales de ácido aspártico y glutámico; Hruby et al. (1994) *Reactive Polymers* 22: 231-241 que enseñan un método alternativo para ciclar péptidos a través de soportes sólidos; y Schmidt and Langer (1997) *J. Peptide Res.* 49: 67-73, que describen un método para sintetizar ciclotetrapéptidos y ciclopentapéptidos.

Estos métodos de ciclización de péptidos son ilustrativos y no limitantes. Utilizando la enseñanza que se proporciona en el presente documento, los expertos en la técnica tendrán a disposición otros métodos de ciclización.

Usos de los agentes de unión al calcio.

Crecimiento del cabello.

Fue un descubrimiento sorprendente e inesperado que los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en la presente invención pueden inducir el crecimiento del cabello cuando se aplican a la piel de un mamífero (véase, por ejemplo, las Figuras 1 y 2). Se cree que los agentes pueden usarse para inducir el

crecimiento del pelo, el rebrote del cabello y/o para inhibir la pérdida del cabello en un mamífero afectado con una condición que induce pérdida del cabello (por ejemplo, alopecia, quimioterapia, etc.). Típicamente, el agente se aplicará al sujeto que lo necesite en una cantidad suficiente para inducir el crecimiento del cabello y/o para reducir la pérdida del cabello.

5 El agente o agentes pueden administrarse a través de cualquiera de un número de vías incluyendo, por ejemplo, administración tópica, administración dérmica/intradérmica, administración transdérmica, administración subdérmica, iontoforesis transdérmica, administración transdérmica de dendrímeros, usando micelas reversas de polímero, usando micelas inversas de lípidos, y similares.

10 En diversas realizaciones, el crecimiento del cabello o la inhibición de la pérdida del cabello comprende la inhibición de la pérdida del cabello en una o más regiones donde se desea el crecimiento/mantenimiento del cabello (por ejemplo, una o más regiones tales como la cabeza, la ceja, la región del bigote (labio superior), el pecho, y similares).

15 En ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y/u otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en la presente invención se formulan para administración tópica, dérmica, intradérmica, transdérmica o subdérmica (por ejemplo, como enjuagues, tónicos, soluciones, emulsión, espuma, crema, gel, ungüentos, polvos, linimento o bálsamo, loción, ungüento, etc.).

20 En ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y/o otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en el presente documento y/o formulaciones de los mismos se proporcionan como componentes usados en el tratamiento, mantenimiento, limpieza o coloración del cabello. Por lo tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y/u otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en el presente documento y/o formulaciones de los mismos se proporcionan como componentes de un champú, un acondicionador para el cabello, un agente colorante para el cabello, un desenredante para el cabello, un enjuague para el cabello, y similares.

Crecimiento de las uñas.

25 Fue un descubrimiento sorprendente e inesperado que los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en la presente invención pueden inducir crecimiento de uñas cuando se aplican a la uña, matriz de uñas, cutícula y similares de un mamífero (véanse, por ejemplo, las Figuras 12 y 13). Los péptidos y otras unidades estructurales de unión al calcio también pueden usarse para mejorar el crecimiento y la salud de las uñas, las uñas de los pies, los cascos de los animales, las garras y los cuernos.

30 En ciertas realizaciones, los péptidos que se unen al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en la presente se aplican a la matriz de uñas (cutícula), al área de la corona de un casco o a la base del cuerno para aumentar el crecimiento de la uña, garra, casco, o cuerno. Las formulaciones desarrolladas para administración dérmica, intradérmica, subdérmica y transdérmica son también eficaces para este propósito.

35 En ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y/o otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento y/o formulaciones de los mismos se proporcionan como componentes usados en el tratamiento, mantenimiento, limpieza o coloración de uñas, cascos o cuernos. Por lo tanto, por ejemplo, en ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y/o otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento y/o formulaciones de los mismos se proporcionan como componentes de una formulación seleccionada del grupo que consiste en un esmalte de uñas, un consolidador de uñas, un bálsamo, un barniz, un pegamento de uñas o cascos, un sellador, una crema, una loción, un baño de pies, un baño de cascos y similares.

40 En ciertas realizaciones, los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en el presente documento se aplican diariamente o con menos frecuencia hasta que se alcanza el resultado deseado.

Remineralización

45 Los péptidos que se unen al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en este documento inducen el crecimiento del cristal de fosfato de calcio en el esmalte desmineralizado y en dentina desmineralizada y no desmineralizada, dependiendo de las condiciones de tratamiento. Así mismo, estos agentes pueden inducir la remineralización del hueso. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los agentes de unión al calcio descritos en el presente documento pueden usarse para aumentar la mineralización reclutando partículas de fosfato de calcio que flotan libremente a superficies calcificadas. Estos agentes pueden unirse a superficies calcificadas y/o agregados de fosfato de calcio libremente flotantes. La unión concurrente de superficies calcificadas y agregados libremente flotantes da como resultado una concentración aumentada de fosfato de calcio cerca de la superficie calcificada, lo que conduce a una remineralización mejorada de la superficie. Modulando el tamaño y la afinidad de unión de los agentes, es posible alterar la cantidad de calcio unida a la superficie. En ciertas realizaciones, la remineralización de los dientes da como resultado una oclusión completa o parcial de los túbulos dentinarios.

55 Las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales descritas en la presente pueden ser utilizadas para remineralizar un diente, prevenir o ralentizar la desmineralización de los dientes, tratar el daño de los dientes, formar capas minerales en la superficie de un diente o por debajo de ella, Tal como por

ejemplo aumento o disminución de la densidad mineral, o sellar un sitio dental. De igual modo, estas composiciones pueden usarse 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 realizaciones, una composición que comprende uno o más agentes de unión al calcio como se ha descrito anteriormente se aplica en o cerca del sitio del hueso o huesos afectados. En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los agentes de unión al calcio descritos en el presente documento pueden usarse para tratar la calcificación, lesiones calcáreas o defectos mineralizados en tejidos y órganos distintos del hueso, incluida la placa arterial.

Como se muestra en el Ejemplo 6, los péptidos que se unen al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en el presente documento pueden mejorar la desmineralización cuando se usan conjuntamente con un desensibilizador/remineralizador de dientes (por ejemplo, desensibilizador QUELL®). Por consiguiente, se contemplan métodos en los que los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio se utilizan conjuntamente entre sí para potenciar la remineralización y/o la desensibilización de los dientes. De manera similar, se contemplan composiciones que comprenden uno o más de los péptidos que se unen al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento y uno o más agentes desensibilizadores/remineralizantes. En ciertas realizaciones, el agente desensibilizante/remineralizante incluye calcio (por ejemplo, cloruro de calcio y/o fosfato de potasio), pero no necesita ser limitado de esta manera. En la Tabla 4 se muestran agentes desensibilizantes/remineralizantes ilustrativos.

Tabla 4. Agentes desensibilizadores/remineralizantes ilustrativos, pero no limitantes, para uso en conjunción con uno o más péptidos de unión al calcio y/o unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento.

| Producto                          | Fabricante                    | Agentes activos                                                |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| ADMIRA® PROTECT SINGLEDOSE        | Voco GmbH                     | HEMA, Fluoruro, Ormocer                                        |
| D/SENSE CRYSTAL®                  | Centrix                       | Nitrato de potasio, oxalato de calcio                          |
| DURAFLO® fluoruro de sodio barniz | Medicom                       | Fluoruro de sodio                                              |
| DURAPHAT®                         | Colgate Oral Pharmaceuticals  | Fluoruro de sodio                                              |
| GEL-KAM DENTINBLOC®               | Colgate Oral Pharmaceuticals  | Fluoruro de sodio y fluoruro estannoso                         |
| GLUMA® DESENSITIZER               | Heraeus Kulzer                | Glutaraldehído                                                 |
| HEALTH-DENT® DESENSITIZER         | Healthdent'l                  | Cloruro de benzalconio                                         |
| HEMASEAL® & CIDE®                 | Advantage Dental Products     | Clorhexidina, HEMA                                             |
| HURRISEAL®                        | Beutlich Pharmaceuticals      | HEMA                                                           |
| QUELL® DESENSITIZER               | Pentron Clinical Technologies | Cloruro de calcio, fosfato de potasio                          |
| SUPER SEAL®                       | Phoenix Dental                | Oxalato Ácido, Sal de Potasio                                  |
| SYSTEMP® DESENSITIZER             | Ivoclar Vivadent              | Glutaraldehído, ácido maleico, polietilenglicol, dimetacrilato |
| ULTRAEZ®                          | Ultradent                     | Nitrato de potasio, Fluoruro                                   |
| ZAROSIN®                          | Cetylite Industries           | Cloruro de estroncio                                           |
| Productos que contienen NovaMin®  | Sultan Healthcare             | Calcio, fósforo, sílice y sodio                                |

En ciertas realizaciones, el péptido/unidad estructural de unión al calcio y el agente desensibilizante/remineralizante se proporcionan en un producto tal como una pasta dental, un enjuague bucal, una crema desensibilizante, gel, pasta y similares.

A diferencia de los enfoques actuales de remineralización de superficies de dientes que se basan en inundar la cavidad oral con formulaciones de calcio libre o enlazado a proteínas (por ejemplo, formulaciones de calcio libre, calcio ligado a proteína, fluoruro de sodio, fluoruro estannoso y similares), estos compuestos hacen que los agregados de fosfato de calcio se adhieran específicamente a la superficie del diente, aumentando así la concentración local de calcio y fosfato y aumentando la probabilidad de que este fosfato de calcio se incorpore en las regiones desmineralizadas del

diente. Las terapias farmacéuticas actuales para lesiones o enfermedades de tejidos calcificados dependen de rodear el área de la superficie deseada, ya sea directamente (tópicamente) o por administración sistémica, con soluciones libres del compuesto terapéutico de interés, con la esperanza de que alguna fracción interactuará con la superficie calcificada.

## 5 Adhesión a superficies/substratos calcificados.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en el presente documento pueden usarse como un medio para la unión específica de porciones o partículas químicas deseables a las superficies calcificadas, tales como las de los huesos y los dientes. Los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de enlace de calcio pueden proporcionarse con un enlazante unido, y/o un sitio reactivo, o una unidad estructural unida (por ejemplo, antibiótico, marcador detectable, etc.) y la unión del péptido u otra unidad estructural de enlace de calcio a un sustrato que contiene calcio proporciona el grupo reactivo, un enlazante localizado en ese sitio para la posterior fijación de un efector deseado o donde el efector de interés está unido al péptido de unión al calcio u otra unidad estructural, el efector se administra de este modo al sustrato.

## 15 Ensayos para la calcificación disfuncional.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales de unión al calcio descritos en el presente documento pueden usarse para ensayos *in situ* e *in vivo* para la calcificación inapropiada. Por ejemplo, estas composiciones pueden usarse para diagnosticar, identificar, localizar o tratar calcificaciones, lesiones calcáreas o defectos mineralizados en tejidos y órganos distintos del hueso, incluyendo por ejemplo placa arterial, cálculos renales o sesamoides. Los ensayos actualmente en uso para determinar la presencia de calcificación incluyen métodos de unión de 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 de colorantes, se expone una muestra a un colorante fluorescente quelante de calcio tal como tetraciclina, calceína o alizarina, y se visualiza la incorporación del colorante en el tejido de interés. Aunque los colorantes pueden introducirse *in vivo*, la visualización de la señal requiere la escisión del tejido de interés. El tratamiento de tejido fijo con iones de plata (tinción de von Kossa) también puede usarse para identificar sitios de calcificación, pero este método no puede aplicarse *in vivo* y está sujeto a niveles significativos de tinción de fondo. La incorporación de isótopos radiactivos tales como <sup>45</sup>Ca proporciona información precisa y cuantitativa sobre la localización y la tasa de calcificación *in vivo*, pero tiene el inconveniente de exponer a sujetos experimentales a altos niveles de radiación ionizante. El análisis de transmisión de rayos X proporciona una alta resolución espacial y puede lograrse en animales vivos, pero no puede identificar de forma única depósitos de calcio entre las otras características visibles en una imagen de rayos X. El análisis químico cuantitativo *in vitro* de los depósitos de calcio proporciona determinaciones sólidas del tipo y la cantidad de mineral presente, pero estos métodos son laboriosos y dan lugar a la pérdida de información sobre la ubicación y estructura del tejido involucrado.

## 35 Visualización/detección de tejidos o regiones calcificadas.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los péptidos que se unen al calcio y otras unidades estructurales descritas en el presente documento pueden marcarse de manera fluorescente o de otro modo y utilizarse como un medio mejorado para visualizar regiones calcificadas en un tejido de interés. Estos agentes se pueden sintetizar fácilmente con altos rendimientos, y tienen una seguridad, toxicidad y facilidad de uso mejoradas en comparación con los métodos actualmente disponibles. La secuencia o composición del agente puede ser alterada para cambiar la afinidad relativa del agente para tipos específicos de tejido o superficie (por ejemplo, como se describe en el presente documento en los ejemplos). Esto permitirá al agente discriminar entre dentina, esmalte, hueso y otros tejidos o superficies calcificados y entre tejidos sanos y enfermos. Esta propiedad permite que estos compuestos se utilicen como sondas para lesiones o lesiones patológicas en tejido calcificado. Los agentes pueden usarse solos, o en conjunción con otros métodos conocidos para detectar calcificación. En contraste con los fluoróforos de fijación de calcio disponibles actualmente, que están limitados a los que pueden quelar los iones de calcio, manteniendo su fluorescencia, los péptidos y otros agentes de unión al calcio descritos en el presente documento pueden unirse a cualquier fluoróforo. Esto amplía enormemente la paleta de colores que se pueden utilizar para etiquetar las superficies calcificadas y permite adaptar con precisión las longitudes de onda de emisión y las tecnologías de detección a cada experimento individual. Mediante la conjugación de estos agentes con colorantes fluorescentes, colorimétricos, radiactivos, activos en RMN u otros colorantes o indicadores y el tratamiento de muestras biológicas con estos conjugados, se hace posible realizar observaciones cuantitativas de la extensión de la calcificación *in situ* e *in vivo* sin fijar o alterar considerablemente la muestra. Debido a su alta especificidad y velocidades de unión rápidas, tales conjugados pueden proporcionar una tinción de fondo más baja que los métodos de tinción con iones de plata de von Kossa. La gran variedad de etiquetas que se pueden unir a estos agentes aglutinantes de calcio ofrece una enorme flexibilidad con respecto a las condiciones de unión y los métodos de detección, lo que aumenta enormemente la facilidad y calidad con la que pueden ser llevadas a cabo investigaciones biológicas, biomédicas, biotecnológicas, ambiental, y otras.

Agentes de diagnóstico.

.Los péptidos y otras unidades estructurales de enlace de calcio descritos en la presente invención tienen un gran potencial como agentes de diagnóstico porque, a diferencia de los procedimientos actuales de identificación de lesiones, infecciones, tumores u otras lesiones de tejidos calcificados, que se basan principalmente en observación visual o radiológica, los péptidos aquí descritos puede usarse para detectar tales eventos sin depender del ojo humano.

Se ha demostrado que diversos agentes descritos en el presente documento se dirigen específicamente al esmalte desmineralizado y a la dentina no desmineralizada. En particular, estos agentes han mostrado la capacidad de unirse preferentemente las lesiones de los dientes cariados. Además, diversas variantes han mostrado la capacidad de dirigir subporciones precisas de la estructura dental, tales como, por ejemplo, la dentina de la punta de la raíz, el esmalte basal, la dentina del manto, el esmalte cortical y la superficie del esmalte. Las composiciones que comprenden agentes aglutinantes de calcio conjugados con diversas unidades estructurales detectables, tales como por ejemplo colorantes fluorescentes, colorimétricos, radiactivos, Activos en RMN u otros colorantes o indicadores, se pueden administrar a un sujeto a porciones específicas de diana del diente e identificar aquellas porciones del diente que exhibe la desmineralización u otro daño. La composición de los agentes puede seleccionarse de tal manera que puedan dirigirse tipos específicos de tejido o daño de tejido. El uso de estos agentes permite la identificación específica de las regiones dañadas, incluidas aquellas que pueden haber sido demasiado pequeñas para verlas u oscurecidas de otro modo, aumentando enormemente la facilidad y exactitud del diagnóstico para estas lesiones. Del mismo modo, en ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los agentes de unión al calcio descritos en el presente documento pueden usarse como agentes de contraste para radiografía, tomografía computarizada o imágenes de resonancia magnética.

Direccionamiento de unidades estructurales.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden los péptidos de unión al calcio y otras unidades estructurales descritas en el presente documento pueden usarse para dirigir compuestos terapéuticos a las superficies de huesos, dientes u otros tejidos calcificados. Por ejemplo, las unidades estructurales de enlace de calcio pueden conjugarse con compuestos antimicrobianos, moduladores de desarrollo de huesos y dientes, o cualquier otro compuesto que se pueda unir a la unidad estructural. La conjugación de un compuesto terapéutico a uno de estos unidades estructurales puede usarse para localizar el compuesto terapéutico a una superficie calcificada, dando lugar a una concentración local aumentada del compuesto ya una eficacia mejorada. Al localizar el compuesto en un tejido de interés, estas unidades estructurales reducen la concentración del compuesto necesaria para conseguir el efecto deseado. Además de mejorar la eficacia, el direccionamiento específico del compuesto terapéutico a un tejido de interés evita que los tejidos no objetivo sufran los efectos potencialmente dañinos del compuesto. La composición o longitud de la unidad estructural de unión al calcio se puede ajustar para permitir el direccionamiento específico a regiones dañadas o enfermas del tejido.

Tratamiento infecciones microbianas.

En ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden las unidades estructurales de enlace de calcio descritas en el presente documento pueden usarse para tratar una infección microbiana, tal como por ejemplo una infección bacteriana. En estas realizaciones, los péptidos pueden estar unidos a un péptido antimicrobiano, tal como por ejemplo un péptido 2c-4, b-34 o PL-135 (SEQ ID NO: 26, 30 y 32, en el documento WO 2007/038683, respectivamente) o a otra unidad estructural antimicrobiana.

Basándose en la capacidad de los agentes de unión al calcio descritos en el presente documento para unir selectivamente de calcio o fosfatos de calcio, las composiciones que comprenden estos agentes pueden incorporarse en un sensor para la detección de calcio en agua potable, aguas residuales, soluciones industriales, alimentos, bebidas, aplicaciones de investigación, o cualquier solución para la que se desea la determinación de la presencia de calcio. De igual modo, estas composiciones pueden usarse para controlar la deposición de minerales de calcio en, por ejemplo, aplicaciones industriales, de fabricación, médicas, de investigación, domésticas o personales. Además, estas composiciones se pueden emplear para determinar la presencia o cantidad de diversos minerales de calcio en, por ejemplo, cultivos celulares, tejidos, animales experimentales, sujetos humanos experimentales u otras aplicaciones de investigación.

Construcciones químicas.

Los péptidos de unión al calcio y/o las unidades estructurales de unión al calcio similares a los péptidos descritos en el presente documento pueden unirse directa o indirectamente, covalentemente o no covalentemente, a uno o más conjugados o unidades estructurales. Tales conjugados o unidades estructurales 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 anticanceroso o antimicrobiano. Otros ejemplos de conjugados o unidades estructurales que se pueden unir a los péptidos enlazantes de calcio descritos en la presente invención incluyen marcadores detectables tales como por ejemplo fluoróforos, cromóforos, marcadores de afinidad, marcadores radiactivos o marcadores de rotación. Además, uno o más átomos dentro de un péptido de unión al calcio o un conjugado o unidad estructural unida se pueden sustituir, por ejemplo, con un isótopo radioactivo o activo en RMN.

La unión entre un agente de unión al calcio y un conjugado o unidad estructural puede ocurrir en el extremo amino de

un péptido, el extremo carboxi de un péptido, o a través de un sitio interno en el péptido, o a través de un grupo conveniente en un fragmento no-péptido de unión al calcio. En ciertas realizaciones, el agente puede estar enlazado a un conjugado o unidad estructural a través de un enlazante de aminoácidos, tal como por ejemplo una secuencia enlazante de triglicina, o un enlazante no aminoácido. En la Tabla 3 se muestran enlaces adecuados ilustrativos.

## 5 Conjugación química.

Las unidades estructurales quiméricas pueden formarse uniendo uno o más de los péptidos que se unen al calcio u otras unidades estructurales descritas en la presente invención a uno o más efectores. En ciertas realizaciones, las unidades estructurales de unión a Ca se unen directamente a los efectores a través de grupos reactivos naturales o la unidad estructural de direccionamiento y/o los efectores pueden ser funcionalizados para proporcionar tales grupos reactivos.

En diversas realizaciones, las unidades estructurales de unión a Ca están unidas a un efector(es) a través de uno o más agentes de unión. Así, En diversas realizaciones, las unidades estructurales de unión al Ca y los efectores pueden conjugarse por medio de un solo agente de unión o de múltiples agentes de unión. Por ejemplo, la unidad estructural de enlace Ca y el efector pueden conjugarse por medio de un único agente multifuncional (por ejemplo, bi-, tri- o tetra-) o un par de agentes de unión complementarios. En otra realización, la unidad estructural de unión al Ca y el efector se conjugan mediante dos, tres o más agentes de unión. Agentes de unión adecuados incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, grupos funcionales, agentes de afinidad, grupos estabilizadores y combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el agente de unión es o comprende un grupo funcional. Los grupos funcionales incluyen ligandos monofuncionales que comprenden un grupo reactivo, así como reticulantes multifuncionales que comprenden dos o más grupos reactivos capaces de formar un enlace con dos o más objetivos funcionales diferentes (por ejemplo, marcadores, proteínas, macromoléculas, nanocristales semiconductores o sustrato). En algunas realizaciones preferidas, los reticuladores multifuncionales son reticulantes heterobifuncionales que comprenden dos o más grupos reactivos diferentes.

Los grupos reactivos adecuados incluyen, pero sin limitación, tiol (-SH), carboxilato (COOH), carboxilo (-COOH), carbonilo, amina (NH<sub>2</sub>), hidroxilo (-OH), aldehído (-CHO), alcohol (ROH), cetona (R<sub>2</sub>CO), hidrógeno activo, éster, sulfhidrilo (SH), fosfato (-PO<sub>3</sub>) o unidades estructurales fotorreactivos. Los grupos reactivos con amina incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, isotiocianatos, isocianatos, acilazidas, ésteres de NHS, cloruros de sulfonilo, aldehídos y glicoxales, epóxidos y oxiranos, carbonatos, agentes arilantes, imidoésteres, carbodiimidas y anhídridos. Los grupos reactivos con tiol incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, derivados de haloacetilo y haluros de alquilo, maleimidas, aziridinas, derivados de acrililo, agentes arilantes y reactivos de intercambio de disulfuros de tiol. Los grupos reactivos con carboxilato incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, diazoalcanos y compuestos diazoacetilo, tales como carbonildiimidazoles y carbodiimidas. Los grupos reactivos con hidroxilo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, epóxidos y oxiranos, carbonildiimidazol, oxidación con peryodato, carbonato de N,N'-disuccinimidilo o cloroformiato de N-hidroxisuccinimidilo, oxidación enzimática, halógenos de alquilo e isocianatos. Los grupos reactivos con aldehído y cetona incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, derivados de hidrazina para la formación de bases de Schiff o aminación por reducción. Los grupos reactivos con hidrógeno activo incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, derivados de diazonio para las reacciones de condensación y de yodación de Mannich. Los grupos fotorreactivos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, arilazidas y arilazidas halogenadas, benzofenonas, compuestos diazoicos y derivados de diazirina.

Otros grupos reactivos adecuados y clases de reacciones útiles en la formación de unidades estructurales quiméricas incluyen aquellos que son bien conocidos en la técnica de la química del bioconjugado. Las clases actualmente favorecidas de reacciones disponibles con quelatos reactivos son aquellas que se desarrollan en condiciones relativamente suaves. Estos incluyen, pero no se limitan a, sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, March (1985) *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, Hermanson (1996) *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego; y Feeney et al. (1982) *Modificación de Proteínas*; *Advances in Chemistry Series*, vol. 98, American Chemical Society, Washington, D.C.

En ciertas realizaciones, el agente de unión comprende un quelante. Por ejemplo, el quelante que comprende la molécula, DOTA (1,4,7,10-tetrakis (carboximetil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano), puede marcarse fácilmente con un radiomarcador, tal como Gd<sup>3+</sup> y <sup>64</sup>Cu, resultando en Gd<sup>3+</sup>-DOTA y <sup>64</sup>Cu-DOTA respectivamente, unidos a la porción de unión a Ca. Otros quelatos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los derivados de ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA) están entre los más conocidos (véase, por ejemplo, Lee Et al (1997) *Nucl Med Biol.* 24: 2225-23019).

Un "enlazante" o "agente de enlace" tal como se usa en el presente documento descriptiva, es una molécula que se usa para unir dos o más moléculas. En ciertas realizaciones, el enlazante es típicamente capaz de formar enlaces covalentes a ambas moléculas (por ejemplo, la unidad estructural de unión a Ca y el efector). Los enlazantes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los enlazantes de

carbono de cadena lineal o ramificada, los enlazantes de carbono heterocíclicos o los enlazantes peptídicos. En ciertas realizaciones los enlazantes pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Sin embargo, en ciertas realizaciones, los enlazantes se unirán a los grupos alfa carbono amino y carboxilo de los aminoácidos terminales.

5 Se puede usar un enlazante bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo en una molécula (por ejemplo, un péptido que se une al Ca), y otro grupo reactivo sobre la otra molécula (por ejemplo, un péptido antimicrobiano), para formar el enlace deseado conjugado. Alternativamente, la derivación se puede realizar para proporcionar grupos funcionales. Así, por ejemplo, también se conocen procedimientos para la generación de grupos sulfhidrilo libres sobre péptidos (véase Patente de los Estados Unidos No. 4,659,839).

10 En ciertas realizaciones, el agente de unión es un reticulante heterobifuncional que comprende dos o más grupos reactivos diferentes que forman un anillo heterocíclico que puede interactuar con un péptido. Por ejemplo, un reticulante heterobifuncional tal como cisteína puede comprender un grupo reactivo amina y un grupo reactivo tiol puede interactuar con un aldehído sobre un péptido derivatizado. Combinaciones adicionales de grupos reactivos adecuados para agentes de reticulación heterobifuncionales incluyen, por ejemplo, grupos reactivos de amina y sulfhidrilo; grupos carbonilo y sulfhidrilo reactivos; grupos amina y fotorreactivos; sulfhidrilo y grupos fotorreactivos; grupos carbonilo y fotorreactivos; carboxilato y grupos fotorreactivos; y arginina y grupos fotorreactivos. En una realización, el reticulante heterobifuncional es SMCC.

20 Se conocen muchos procedimientos y moléculas enlazantes para la unión de diversas moléculas a péptidos o proteínas (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea No. 188,256, las Patentes de los Estados Unidos No. 4,671,958, 4,659,839, 4,414,148, 4,699,784, 4,680,338, 4,569,789 y 4,589,071; y Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075). En los Ejemplos 2 y 3 se proporcionan protocolos de unión ilustrativos. Los enlazantes adecuados ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los mostrados en la Tabla 3.

Proteínas de fusión.

25 En ciertas realizaciones en las que la unidad estructural de unión al Ca y el efector son ambos péptidos o ambos comprenden péptidos, la unidad estructural quimérica puede sintetizarse químicamente o expresarse de forma recombinante como una proteína de fusión (es decir, una proteína de fusión quimérica).

30 En ciertas realizaciones las proteínas de fusión quiméricas se sintetizan usando metodología de ADN recombinante. Generalmente esto implica crear una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un huésped, aislar la proteína expresada y, si es necesario, volver a marcar la proteína.

35 El ADN que codifica las proteínas de fusión puede prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa por métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; el método fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; el método dietilfosforamidita de Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862; y el método de soporte sólido de la Patente de los Estados Unidos No. 4,458,066.

40 La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria o por polimerización con una ADN polimerasa usando la hebra simple como molde. Un experto reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Alternativamente, las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas se escindieron usando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos pueden ser entonces ligados para producir la secuencia de ADN deseada.

45 En ciertas realizaciones, el ADN que codifica las proteínas de fusión de la presente invención puede clonarse usando métodos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, por ejemplo, el ácido nucleico que codifica una unidad estructural de enlazamiento al Ca se amplifica por PCR, utilizando un cebador en sentido que contiene el sitio de restricción para NdeI y un cebador antisentido que contiene el sitio de restricción para HindIII. Esto produce un ácido nucleico que codifica la secuencia de unión a Ca y que tiene sitios de restricción terminales. De forma similar, puede proporcionarse un efector y/o efector/enlazante/espaciador que tiene sitios de restricción complementarios. La ligación de secuencias y la inserción en un vector produce un vector que codifica la proteína de fusión.

50 Aunque las unidades estructurales de unión al Ca y los efectores pueden unirse directamente entre sí, uno de los expertos apreciará que pueden separarse por un espaciador/enlazante peptídico que consiste en uno o más aminoácidos. Generalmente, el espaciador no tendrá actividad biológica específica aparte de unir las proteínas o preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula tal como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión pueden expresarse en una variedad de células huésped, incluyendo *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levadura y varias células eucariotas superiores tales como las líneas de células COS, CHO y HeLa y células de mieloma líneas. El gen de la proteína recombinante estará operativamente unido a secuencias de control de expresión apropiadas para cada huésped. Para *E. coli* esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, o lambda, un sitio de unión al ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferiblemente un potenciador derivado de genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir secuencias de donante y aceptor de empalme.

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

Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden purificarse según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology Vol. 182: Guía para la purificación de proteínas, Academic Press, Inc. N.Y.). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad y una preferencia entre 98 y 99% o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden utilizarse entonces terapéuticamente.

Un experto en la técnica reconocería que después de síntesis química, expresión biológica o purificación, la proteína de fusión puede poseer una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y luego hacer que el polipéptido se repliegue en la conformación preferida. Los métodos para reducir y desnaturalizar las proteínas e inducir el repliegue son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Debinski et al (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070, Kreitman and Pastan 1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585, y Buchner et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270).

Un experto reconocerá que se pueden hacer modificaciones a las proteínas de fusión sin disminuir su actividad biológica. Se pueden hacer algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula de enlazamiento al Ca en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación o aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción convenientemente situados o codones de terminación.

Como se ha indicado anteriormente, en diversas realizaciones se utiliza un ligante peptídico/espaciador para unir los uno o más unidades estructurales de unión a Ca a uno o más efectores. En diversas realizaciones, el enlazante peptídico es relativamente corto, típicamente menos de aproximadamente 10 aminoácidos, preferiblemente menos de aproximadamente 8 aminoácidos y más preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 5 aminoácidos. Los enlazantes ilustrativos adecuados incluyen, pero no se limitan a, varios enlazantes peptídicos mostrados anteriormente en la Tabla 3.

Administración y formulaciones.

En ciertas realizaciones, los agentes de unión al calcio descritos en este documento y/o las construcciones quiméricas que comprenden tales unidades estructurales (por ejemplo, agentes de unión al calcio unidos a péptido(s) antimicrobiano, marcadores detectables, etc.) se administran a un mamífero que lo necesita, a una célula, a un tejido, a una composición (por ejemplo, un alimento), etc.). En diversas realizaciones, las composiciones se pueden administrar para detectar y/o localizar, y/o cuantificar la presencia de calcificación anormal y/o desmineralización, y similares. En diversas realizaciones, las composiciones se pueden administrar para inhibir la pérdida del cabello y/o para inducir el crecimiento del cabello, y/o para aumentar el crecimiento o la reparación de las uñas, el crecimiento o reparación de los cascos, el crecimiento o reparación de los cuernos y similares.

Estos agentes activos (fragmentos de unión al calcio y/o péptidos de unión al calcio y/o construcciones quiméricas que comprenden unidades estructurales de unión al calcio y/o péptidos unidos al calcio unidos a uno o más efectores (por ejemplo, marcadores detectables, antimicrobianos, etc.) se pueden administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, siempre que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sea farmacológicamente adecuado, es decir, eficaces en el presente método o métodos. Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos pueden prepararse usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia de química orgánica sintética y descritos, por ejemplo, por March (1992) Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure, 4a Ed. N.Y. Wiley-Interscience.

Los métodos de formulación de tales derivados son conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las sales de disulfuro de un número de agentes de administración se describen en la Publicación PCT WO 00/059863. De forma similar, las sales ácidas de péptidos terapéuticos, peptoides u otros miméticos, y se pueden preparar a partir de la

base libre utilizando una metodología convencional que típicamente implica la reacción con un ácido adecuado. Generalmente, la forma de base del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar tal como metanol o etanol y se añade el ácido al mismo. La sal resultante precipita o puede sacarse de la solución por adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de adición ácida incluyen, pero no se limitan a ambos ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares, así como ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Una sal de adición ácida puede reconvertirse a la base libre por tratamiento con una base adecuada. Ciertas sales de adición ácida particularmente preferidas de los agentes activos de la presente invención incluyen sales de haluro, tales como las que pueden prepararse usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de esta invención se preparan de manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina o similares. En ciertas realizaciones, las sales básicas incluyen sales de metales alcalinos, por ejemplo, la sal de sodio y sales de cobre.

Para la preparación de formas salinas de fármacos básicos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 pH inferior al pKa del fármaco. De manera similar, para la preparación de formas salinas de fármacos ácidos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 pH más alto que el pKa del fármaco. Esto permite que el contraión traiga el pH de la solución a un nivel inferior al pH<sub>max</sub> para alcanzar la meseta salina, en la que prevalece la solubilidad de la sal sobre la solubilidad del ácido o base libre. La regla generalizada de diferencia en las unidades pKa del grupo ionizable en el ingrediente farmacéutico activo (API) y en el ácido o la base está destinada a hacer la transferencia de protones energéticamente favorable. Cuando el pKa del API y el contraión no son significativamente diferentes, puede formarse un complejo sólido, pero puede desproporcionarse rápidamente (es decir, descomponerse en las entidades individuales del fármaco y el contraión) en un medio acuoso.

Preferiblemente, el contraión es un contraión farmacéuticamente aceptable. Las formas de sal aniónicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, acetato, benzoato, bencilato, bitartrato, bromuro, carbonato, cloruro, citrato, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, hidrobromuro, hidrocloreto, yoduro, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, bromuro de metilo, sulfato de metilo, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), fosfato y difosfato, salicilato y disalicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, trietyoduro, valerato y similares, mientras que las formas de sales catiónicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, aluminio, benzatina, calcio, etilendiamina, lisina, magnesio, meglumina, potasio, procaina, sodio, trometamina, zinc y similares.

En diversas realizaciones, la preparación de ésteres implica típicamente la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del agente activo. En ciertas realizaciones, los ésteres son típicamente derivados sustituidos con acilo de grupos alcohol libres, es decir, unidades estructurales que se derivan de ácidos carboxílicos de la fórmula RCOOH en la que R es alquilo, y preferiblemente es alquilo inferior. Los ésteres se pueden reconvertir en los ácidos libres, si se desea, usando procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

Las amidas también se pueden preparar usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica o descritas en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, las amidas pueden prepararse a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados, o pueden prepararse a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido por reacción con amoniaco o una alquilamina inferior.

En diversas realizaciones, los agentes activos identificados en el presente documento son útiles para administración parenteral, tópica, dérmica, intradérmica, subdérmica, oral, nasal (o de otra manera inhalada), pulmonar, rectal u otra local, tal como por aerosol o transdérmicamente para inducir la calcificación y/o crecimiento de las uñas, y/o crecimiento del cabello y/o entregar un efector a un sitio de calcificación o calcificación defectuosa. Las composiciones se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitarias dependiendo del método de administración. Las formas de dosificación unitaria adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, supositorios, parches, aerosoles nasales, inyectables, formulaciones implantables de liberación sostenida, complejos lipídicos, etc.

Los agentes activos (por ejemplo, agentes de unión al calcio y/o constructos quiméricos) descritos en el presente documento también pueden combinarse con un vehículo (excipiente) farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacológica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener uno o más compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar la composición o para aumentar o disminuir la absorción del (de los) agentes activos. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, mejoradores de la protección y de la captación tales como lípidos, surfactantes, composiciones que reducen la eliminación o la hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizadores y/o reguladores.

Otros compuestos fisiológicamente aceptables, particularmente de uso en la preparación de comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel y similares, incluyen, pero no se limitan a aglutinantes, diluyentes/cargas, desintegrantes, lubricantes,

agentes de suspensión y similares.

En ciertas realizaciones, para fabricar una forma de dosificación oral (por ejemplo, un comprimido), un excipiente (por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, manitol, etc.), un desintegrante opcional (por ejemplo carbonato de calcio, carboximetilcelulosa cálcica, glicolato, crospovidona, etc.), un aglutinante (por ejemplo, almidón alfa, goma arábica, celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, ciclodextrina, etc.) y un lubricante opcional (por ejemplo, talco, estearato de magnesio, polietilenglicol 6000, etc.), por ejemplo, se añaden al componente o componentes activos (por ejemplo, principios activos) y la composición resultante se comprime. Cuando sea necesario, el producto comprimido se recubre, por ejemplo, por métodos conocidos para enmascarar el sabor o para disolución entérica o liberación sostenida. Los materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polioxietilenglicol, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y Eudragit (Rohm & Haas, Alemania; copolímero acrílico metacrílico).

Otros compuestos fisiológicamente aceptables incluyen agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes o conservantes que son particularmente útiles para prevenir el crecimiento o la acción de microorganismos. Diversos conservantes son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, fenol y ácido ascórbico. Un experto en la técnica apreciaría que la elección de vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable depende, por ejemplo, de la vía de administración de los agentes activos y de las características fisicoquímicas particulares de los agentes activos.

En ciertas realizaciones los excipientes son estériles y generalmente libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Para diversos excipientes de forma de dosificación oral tales como comprimidos y cápsulas no se requiere esterilidad. El estándar USP/NF suele ser suficiente.

En ciertas aplicaciones terapéuticas, las composiciones de esta invención se administran, por ejemplo, administradas por vía tópica, administradas transdérmicamente (por ejemplo, para inducir el crecimiento del cabello y/o para inhibir la pérdida del cabello) en una cantidad suficiente para prevenir y/o curar y/o al menos parcialmente prevenir o detener la patología y/o sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Pueden suministrarse administraciones únicas o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosificación y frecuencia según se requiera y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debe proporcionar una cantidad suficiente de los agentes activos de las formulaciones de esta invención para tratar eficazmente (mejorar uno o más síntomas en) el paciente.

La concentración de agentes activos puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en la actividad los ingredientes activos, peso corporal y similares de acuerdo con el modo particular de administración seleccionada y las necesidades del paciente. Las concentraciones, sin embargo, se seleccionarán típicamente para proporcionar dosificaciones que varían desde aproximadamente 0.1 o 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 50 mg/kg/día y a veces más altas. Las dosificaciones típicas oscilan entre aproximadamente 3 mg/kg/día y aproximadamente 3.5 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 3.5 mg/kg/día a aproximadamente 7.2 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 7.2 mg/kg/día a aproximadamente 11.0 mg/kg/día, y más preferiblemente de aproximadamente 11.0 mg/kg/día a aproximadamente 15.0 mg/kg/día. En ciertas realizaciones preferidas, las dosificaciones varían de aproximadamente 10 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día. En ciertas realizaciones, las dosificaciones varían desde aproximadamente 20 mg hasta aproximadamente 50 mg administradas oralmente dos veces al día. Se apreciará que dichas dosificaciones se pueden variar para optimizar un régimen terapéutico y/o profiláctico en un sujeto o grupo particular de sujetos.

En ciertas realizaciones, los agentes activos de esta invención se administran a la cavidad oral. Esto se logra fácilmente mediante el uso de pasta de dientes, enjuague bucal, pastillas, aerosoles, tiras que se adhieren a los dientes (por ejemplo, blanqueadores), hisopos recubiertos, geles, barnices, tiras de disolución rápida (por ejemplo, tiras orales de alivio del dolor (por ejemplo ORAFILM®), tiras refrescantes del aliento, tiras antihistamínicas y similares.

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

En ciertas realizaciones, los agentes activos de esta invención se administran por vía sistémica (por ejemplo, oralmente o como inyectables) de acuerdo con métodos estándar bien conocidos por los expertos en la técnica. En otras realizaciones preferidas, los agentes también pueden administrarse a través de la piel usando sistemas de administración transdérmicos convencionales de fármacos, es decir, parches transdérmicos, en los que el agente o agentes activos están contenidos típicamente dentro de una estructura laminada que sirve como un dispositivo de suministro de fármaco para ser fijado a la piel. En una estructura de este tipo, la composición de fármaco está típicamente contenida en una capa, o "depósito", subyacente a una capa de respaldo superior. Se apreciará que el término "depósito" en este contexto se refiere a una cantidad de "ingrediente(s) activo(s)" que está finalmente disponible para el suministro a la superficie de la piel. Así, por ejemplo, el "depósito" puede incluir el ingrediente o ingredientes activos en un adhesivo sobre una capa de soporte del parche, o en cualquiera de una variedad de diferentes formulaciones de matriz conocidas por los expertos en la técnica. El parche puede contener un solo

depósito, o puede contener múltiples depósitos.

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

Otras formulaciones para administración tópica incluyen, pero no se limitan a, ungüentos, geles, pulverizaciones, fluidos y cremas. Los ungüentos son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados de petróleo. Las cremas que contienen el agente activo seleccionado son típicamente emulsiones líquidas viscosas o semisólidas, a menudo aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son típicamente lavables al agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, también denominada a veces fase "interna", está generalmente constituida por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. La pomada específica o la base de crema que se va a usar, como apreciarán los expertos en la técnica, es aquella que proporcionará un suministro óptimo de fármaco. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante.

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

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

#### B) Formulación de nanoemulsiones.

En ciertas realizaciones, las unidades estructurales que enlazan al calcio y/o los péptidos que enlazan al calcio y/o las unidades estructurales químicas descritos en el presente documento se formulan en una nanoemulsión. Las nanoemulsiones incluyen, pero no se limitan a, nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) y nanoemulsiones de agua en aceite (W/O). Las nanoemulsiones se pueden definir como emulsiones con diámetros medios de gotita que varían de aproximadamente 20 a aproximadamente 1000 nm. Usualmente, el tamaño medio de las gotitas está entre aproximadamente 20 nm o 50 nm y aproximadamente 500 nm. Los términos emulsión submicrónica (SME) y miniemulsión se usan como sinónimos.

Las nanoemulsiones ilustrativas de aceite en agua (O/W) incluyen, pero no se limitan a:

Micelas de tensioactivo - micelas compuestas de pequeñas moléculas de tensioactivos o detergentes (por ejemplo, SDS/PBS/2-propanol) que son adecuadas para péptidos predominantemente hidrófobos.

Micelas de polímero - micelas compuestas de agentes tensioactivos de polímeros, copolímeros o copolímeros de bloques (por ejemplo, Pluronic L64/PBS/2-propanol) que son adecuadas para péptidos predominantemente hidrófobos;

Micelas mezcladas: micelas en las que hay más de un componente tensioactivo o en las que una de las fases líquidas (generalmente un alcohol o compuesto de ácido graso) participa en la formación de la micela (por ejemplo, ácido octanoico/PBS/EtOH) que son adecuadas para péptidos predominantemente hidrófobos;

Micelas de péptido integradas - micelas mezcladas en las que el péptido sirve como un tensioactivo auxiliar, formando una parte integral de la micela (por ejemplo, péptido anfipático/PBS/aceite mineral) que son adecuadas para péptidos anfipáticos; y

Emulsiones de Pickering (fase sólida) – emulsiones en las que los péptidos están asociados con el exterior de una nanopartícula sólida (por ejemplo, nanopartículas de poliestireno/PBS/ninguna fase oleosa) que son adecuadas para péptidos anfipáticos.

Las nanoemulsiones ilustrativas de agua en aceite (W/O) incluyen, pero no se limitan a:

Micelas de tensioactivo - micelas compuestas de pequeñas moléculas de tensioactivos o detergentes (por ejemplo, dioctil sulfosuccinato/PBS/2-propanol, isopropilmiristate/PBS/2-propanol, etc.) que son adecuadas para péptidos predominantemente hidrófilos;

Micelas de polímero - micelas compuestas de agentes tensioactivos de polímero, copolímero o copolímero de bloque (por ejemplo, PLURONIC® L121/PBS/2-propanol), que son adecuados para péptidos predominantemente hidrófilos;

5 Micelas mezcladas - micelas en las que hay más de un componente tensioactivo o en las que una de las fases líquidas (generalmente un alcohol o compuesto de ácido graso) participa en la formación de la micela (por ejemplo, diglicérido cáprico/caprílico/PBS/EtOH) que son adecuados para péptidos predominantemente hidrófilos;

Micelas de péptido integradas - micelas mezcladas en las que el péptido sirve como un tensioactivo auxiliar, formando una parte integral de la micela (por ejemplo, péptido anfipático/PBS/polipropilenglicol) que son adecuados para péptidos anfipáticos; y

10 Emulsiones de Pickering (fase sólida) - emulsiones en las que los péptidos están asociados con el exterior de una nanopartícula sólida (por ejemplo, nanopartículas de quitosano/ninguna fase acuosa/aceite mineral) que son adecuadas para péptidos anfipáticos.

15 Como se ha indicado anteriormente, en ciertas realizaciones las nanoemulsiones comprenden uno o más tensioactivos o detergentes. En algunas realizaciones, el tensioactivo es un detergente no aniónico (por ejemplo, un tensioactivo polisorbato, un éter de polioxietileno, etc.). Los tensioactivos que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos tales como las familias de compuestos TWEEN®, TRITON® y TYLOXAPOL®.

20 En ciertas realizaciones, las emulsiones comprenden además uno o más compuestos catiónicos que contienen halógeno, incluyendo, pero sin limitarse a, cloruro de cetilpiridinio. En otras formas de realización adicionales, las composiciones comprenden además uno o más compuestos que aumentan la interacción ("intensificadores de interacción") de la composición con microorganismos (por ejemplo, agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético o ácido etilénbis (oxietilenitrilo) tetraacético en un regulador).

25 En algunas realizaciones, la nanoemulsión comprende además un agente emulsionante para ayudar en la formación de la emulsión. Los agentes emulsionantes incluyen compuestos que se agregan en la interfase aceite/agua para formar una clase de membrana continua que impide el contacto directo entre dos gotitas adyacentes. Ciertas realizaciones de la presente invención presentan composiciones de emulsión de aceite en agua que pueden diluirse fácilmente con agua hasta una concentración deseada sin perjudicar sus propiedades (por ejemplo, unión al calcio, inducción/aceleración del crecimiento del cabello o de las uñas, etc.).

30 Además de gotitas de aceite discretas dispersas en una fase acuosa, ciertas emulsiones de aceite en agua también pueden contener otras estructuras lipídicas, tales como pequeñas vesículas lipídicas (por ejemplo, esferas lipídicas que a menudo consisten en varias bicapas lipídicas sustancialmente concéntricas separadas una de otra por capas de fase acuosa), micelas (por ejemplo, moléculas anfífilas en pequeños grupos de 50-200 moléculas dispuestas de manera que los grupos de cabeza polar se dirigen hacia afuera hacia la fase acuosa y las colas apolares se sequestran hacia adentro lejos de la fase acuosa) o laminares (dispersiones lipídicas en las que cada partícula consiste en bicapas anfífilas paralelas separadas por películas delgadas de agua).

35 Estas estructuras lipídicas se forman como resultado de fuerzas hidrófobas que conducen a los residuos apolares (por ejemplo, cadenas largas de hidrocarburos) lejos del agua. Las preparaciones lipídicas anteriores se pueden describir generalmente como preparaciones de lípidos tensioactivos (SLP). Las SLP son mínimamente tóxicas para las membranas mucosas y se cree que son metabolizadas dentro del intestino delgado (véase, por ejemplo, Hamouda et al., (1998) J. Infect. Disease 180: 1939).

40 En ciertas realizaciones la emulsión comprende una fase de aceite discontinua distribuida en una fase acuosa, un primer componente que comprende un alcohol y/o glicerol, y un segundo componente que comprende un tensioactivo o un compuesto que contiene halógeno. La fase acuosa puede comprender cualquier tipo de fase acuosa que incluye, pero no limitándose a, agua (por ejemplo, agua desionizada, agua destilada, agua del grifo) y soluciones (por ejemplo, tamponada con fosfato solución salina, u otros sistemas de regulador). La fase de aceite puede comprender cualquier tipo de aceite, que incluye, pero no limitándose a, aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja, aceite de aguacate, aceite de linaza, aceite de coco, aceite de semilla de algodón, aceite de escualeno, aceite de oliva, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de cártamo y aceite de girasol), aceites animales (por ejemplo, aceite de pescado), aceite de sabor, vitaminas insolubles en agua, aceite mineral y aceite de motor. En ciertas realizaciones, la fase oleosa comprende 30-90% en volumen de la emulsión de aceite en agua (es decir, constituye 30-90% del volumen total de la emulsión final), más preferiblemente 50-80%.

50 En ciertas realizaciones, el alcohol, cuando está presente, es etanol.

Aunque la presente invención no está limitada por la naturaleza del tensioactivo, en algunas realizaciones preferidas, el tensioactivo es un tensioactivo de polisorbato (por ejemplo, TWEEN 20®, TWEEN 40®, TWEEN 60®, y TWEEN 80®), una fenoxipolietoxietanol (por ejemplo, TRITON® X-100, X-301, X-165, X-102 y X-200, y TYLOXAPOL®), o dodecil sulfato de sodio, y similares.

55 En ciertas realizaciones está presente un componente que contiene halógeno. La naturaleza del compuesto que contiene halógeno, en algunas realizaciones preferidas, el compuesto que contiene halógeno comprende una sal de

cloruro (por ejemplo, NaCl, KCl, etc.), un haluro de cetilpiridinio, un haluro de cetiltrimetilamonio, un haluro de cetildimetilamonio, un haluro de cetildimetilbencilamonio, una haluro, haluros de dodeciltrimetilamonio, haluros de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, cloruro de cetiltrimetilamonio, cloruro de cetilbencildimetilamonio, bromuro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio, bromuro de cetildimetilamonio, bromuro de cetiltributylfosfonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, y similares.

En ciertas realizaciones, la emulsión comprende un compuesto de amonio cuaternario. Los compuestos de amonio cuaternario incluyen, pero no se limitan a, sacarinato de N-alquildimetilbencilamonio, 1,3,5-triazina-1,3,5(2H,4H,6H)-trietanol; cloruro de 1-decanaminio, N-decil-N,N-dimetil-, cloruro (o) didacetil dimetilamonio; cloruro de 2-(2-(p-(diisobutil)resosil)etoxi)etil dimetil bencil amonio; cloruro de 2-(2-(p-(diisobutil)fenoxi)etoxi)etil dimetil bencil amonio; cloruro de alquilo 1 o 3 bencil-1-(2-hidroxietil)-2-imidazolinio; cloruro de alquil-bis(2-hidroxietil) bencilamonio; cloruro de alquil desmetil bencil amonio; cloruro de alquil-dimetil-3,4-diclorobencil-amonio (100% de C12); cloruro de alquil-dimetil-3,4-diclorobencil-amonio (50% de C14, 40% de C12, 10% de C16); cloruro de alquil-dimetil-3,4-diclorobencil-amonio (55% de C14, 23% de C12, 20% de C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio; cloruro de alquil dimetil bencil amonio (100% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (100% de C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (41% de C14, 28% de C12); cloruro de alquil dimetilbencilamonio (47% de C12, 18% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (55% de C16, 20% de C14); cloruro de alquil dimetil bencilamonio (58% de C14, 28% de C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (60% de C14, 25% de C12); cloruro de alquil dimetilbencilamonio (61% de C11, 23% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (61% de C12, 23% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (65% de C12, 25% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (67% de C12, 24% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (67% de C12, 25% de C14); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (90% de C14, 5% de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (93% de C14, 4% de C12); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (95% de C16, 5% de C18); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (y) cloruro de didecil dimetil amonio; cloruro de alquil dimetil bencil amonio (como en los ácidos grasos); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (C12-C16); cloruro de alquil dimetil bencil amonio (C12-C18); alquil dimetil bencil y cloruro de dialquil dimetil amonio; cloruro de alquil dimetil dimetilbencil amonio; bromuro de alquil dimetil etilamonio (90% de C14, 5% de C16, 5% de C12); bromuro de alquil dimetil etilamonio (grupos alquilo y alqueno mixtos como en los ácidos grasos del aceite de soja); cloruro de alquil dimetil etilbencil amonio; cloruro de alquil dimetil etilbencil amonio (60% de C14); cloruro de alquil dimetil isopropilbencil amonio (50% de C12, 30% de C14, 17% de C16, 3% de C18); cloruro de alquil trimetil amonio (58% de C18, 40% de C16, 1% de C14, 1% de C12); cloruro de alquil trimetil amonio (90% de C18, 10% de C16); cloruro de alquildimetil (etilbencil) amonio (C12-18); cloruro de di-(C8-10)-dimetil amonio; cloruro de dialquil dimetil amonio; cloruro de dialquil dimetil amonio; cloruro de dialquil dimetil amonio; cloruro de dialquil metil bencil amonio; cloruro de didecildimetilamonio; cloruro de diisododecil dimetil amonio; cloruro de dioctil dimetil amonio; cloruro de dodecil bis(2-hidroxietil)octil amonio; cloruro de dodecil dimetil bencil amonio; cloruro de dodecilcarbamoil metil dimetil bencil amonio; cloruro de heptadecil hidroxietilimidazolinio; hexahidro-1,3,5-tri(2-hidroxietil)-s-triazina; cloruro de miristalconio (y) Quaternium 14; polímero de cloruro de N,N-dimetil-2-hidroxipropilamonio; cloruro de n-alquil dimetil bencil amonio; cloruro de n-alquil dimetil etilbencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil bencilamonio monohidrato; cloruro de octil-decilo-dimetil-amonio; cloruro de octil dodecil dimetil amonio; cloruro de octilfenoxietoxietil dimetil bencil amonio; oxodietilenbis (cloruro de alquil dimetil amonio); compuestos de amonio cuaternario, dicoco alquildimetilo, cloruro; cloruro de trimetoxisil-propil-dimetil-octadecil-amonio; trimetoxisililo cuat., cloruro de trimetil dodecilbencil amonio; cloruro de n-dodecil dimetil etilbencil amonio; cloruro de n-hexadecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil bencil amonio; cloruro de n-tetradecil dimetil etilbencil amonio; y cloruro de n-octadecil dimetil bencil amonio.

Las formulaciones de nanoemulsión y los métodos para prepararlas son bien conocidos por los expertos en la técnica y descritos por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,476,393, 7,468,402, 7,314,624, 6,998,426, 6,902,737, 6,689,371, 6,541,018, 6,464,990, 6,461,625, 6,419,946, 6,413,527, 6,375,960, 6,335,022, 6,274,150, 6,120,778, 6,039,936, 5,925,341, 5,753,241, 5,698,219, y 5,152,923 y en Fanun et al. (2009) Microemulsions: Properties and Applications (Surfactant Science), CRC Press, Boca Raton FL.

C) Formulaciones que optimizan la actividad.

En ciertas realizaciones, las formulaciones se seleccionan para optimizar la especificidad de unión, y/o la afección de unión, y/o estabilidad/conformación, y/o suministro/actividad de la unidad estructural de unión al calcio, péptido de unión al calcio, y/o quimérico descrito aquí. En ciertas realizaciones, las formulaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a lo siguiente:

Para la inyección, una unidad estructural de enlace de calcio y/o péptido de unión al calcio (por ejemplo, 4DSS, 6DSS, 8DSS, 10DSS, (D)-4DSS, (D)-6DSS, (D)-8DSS, (D)-10DSS, etc.) se disuelve/mezcla en solución estéril de agua destilada, solución salina, o de Ringer y se ajustó a un pH que oscila entre aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 8, o aproximadamente pH 4.6 a aproximadamente pH 7.9, o un pH aproximadamente neutro (por ejemplo, pH 7.3). En ciertas realizaciones, el péptido de unión al calcio y/o la unidad estructural de unión al calcio está presente en una concentración que varía de aproximadamente 0.4 o aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 500 mg/mL, o de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, o de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 75 mg/mL, y en ciertas realizaciones aproximadamente 40-50 mg/mL. En la formulación ilustrativa, el péptido se disuelve/mezcla a una concentración de 46.7 mg/ml en agua destilada estéril, pH ajustado a 7.3 con NaOH 5M.

Las formulaciones tópicas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a:

- 1) Una formulación que comprende (o consiste esencialmente en) el péptido de unión al calcio (por ejemplo, 4DSS, 6DSS, 8DSS, 10DSS, (D)-4DSS, (D)-6DSS, (D)-8DSS, (D)-10DSS, etc.) y/o unidad estructural de enlace de calcio está presente en una concentración que varía de aproximadamente 0.4 o aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 500 mg/mL, o de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL, o de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 75 mg/mL, o aproximadamente 40-50 mg/mL, o aproximadamente 0.466 mg/mL a aproximadamente 46.7 mg/mL en DMSO.
- 2) Una emulsión que comprende (o consiste esencialmente en):
- a) aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de resto de unión al calcio y/o péptido de unión al calcio en una solución, suspensión o mezcla en una solución reguladora farmacéuticamente aceptable con un pH que varía desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 8, o aproximadamente pH 4.6 a aproximadamente pH 7.9, o aproximadamente pH 5 o 6 a aproximadamente pH 7,9;
- b) aproximadamente 1% a aproximadamente el 60%, aproximadamente el 50% o aproximadamente el 40% de Pluronic 17R4, 22R4, 25R4, L62, L63, L64, P65, P75, P84, P85, F68, F77, F87, o un copolímero de bloque comparable; y
- c) resto o alcohol sustancialmente remanente (por ejemplo, 2-propanol, etanol, propanol, o alcohol similar). Típicamente, la solución de péptido y la solución plurónica se preparan por separado y luego se combinan. Una formulación ilustrativa comprende 10% de una solución de (D)-8DSS de 46.7 mg/mL en agua destilada estéril, pH ajustado a 7.0 con NaOH 5M suspendido en una solución de 10% de Pluronic 17R4 (poli(propilenglicol) (etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol), BASF, Florham Park, NJ) en 2- propanol.
- 3) Una emulsión que comprende (o consiste esencialmente en):
- a) aproximadamente 1% a aproximadamente 80%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 50%, o aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de resto de unión al calcio y/o péptido de unión al calcio en una solución, suspensión o mezcla en una solución reguladora farmacéuticamente aceptable con un pH que varía desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 8, o aproximadamente pH 4.6 a aproximadamente pH 7.9, o aproximadamente pH 5 o 6 a aproximadamente pH 7.9;
- b) aproximadamente 1% a aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, o aproximadamente 40% de sulfosuccinato de dioctilo, lecitina, miristato de isopropilo, o un tensioactivo comparable capaz de formar emulsiones de agua en aceite; y
- c) resto o alcohol sustancialmente remanente (por ejemplo, 2-propanol, etanol, propanol, o alcohol similar). Típicamente, la solución de péptido y la solución de tensioactivo se preparan por separado y luego se combinan. Una formulación ilustrativa comprende 10% de una solución de (D)-8DSS de 46.7 mg/mL en agua destilada estéril, pH ajustado a 7.0 con NaOH 5M suspendido en una solución de 17.8% de dioctil sulfosuccinato en 2-propanol.
- 4) Emulsiones (2) y/o (3), incorporando adicionalmente 1-50%, 1-30%, o 1-20% emoliente (por ejemplo, uno o más emolientes seleccionados del grupo que consiste en glicerina, glicerol, monooleato de glicerilo, diprobasa, aloe vera, aceite de jojoba, glicerina, vitamina A (por ejemplo, retinil, ácido retinoico, palmitato, retinal, tretinoína e isotretinoína, etc.), trietanolamina, vitamina E, aceite de soja, aceite de aguacate, aceite de coco, etc.).
- 5) Las composiciones que comprenden 0.00001-30%, o 0.00001-20%, o 0.00001-10% (p/v) de la unidad estructural de unión al calcio y/o péptido de unión al calcio unido al fosfato de calcio (incluyendo hidroxipatita, fosfato de tricalcio beta, fosfato de octacalcio u otras formas de fosfato de calcio) nano o micropartículas (con un tamaño medio de partícula entre 1 nm y 400 nm, o entre 1 nm y 1 µm, o entre 1 nm y 1.000 µm) suspendido en un vehículo farmacéuticamente aceptable (incluyendo, no limitado a alcohol isopropílico, solución salina tamponada, una emulsión, y similares).
- Aunque los métodos y composiciones se describen en el presente documento con respecto al uso en seres humanos, son también adecuados para uso animal, por ejemplo, veterinarios. Por lo tanto, ciertos organismos adecuados incluyen, pero no se limitan a humanos, primates no humanos, caninos, equinos, felinos, porcinos, ungulados, lagomorfos y similares.
- Las formulaciones y métodos de administración anteriores pretenden ser ilustrativos y no limitativos. Se apreciará que, usando la enseñanza proporcionada aquí, pueden formularse fácilmente otras formulaciones y modos de administración adecuados.
- Kits.
- En otra realización, esta invención proporciona kits para inducir el crecimiento del cabello y/o inhibir la pérdida de cabello, para detectar calcificación anormal y/o desmineralización, para inducir remineralización, y similares. Los kits típicamente comprenden un recipiente que contiene uno o más de los agentes activos (es decir, los agentes de unión al calcio y/o unidades estructurales químicas) descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el agente

o agentes activos pueden proporcionarse en una formulación de dosificación unitaria (por ejemplo, supositorio, tableta, comprimido, parche, etc.) y/o se pueden combinar opcionalmente con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Además, los kits incluyen opcionalmente materiales de marcaje y/o de instrucción que proporcionan directivas (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos o uso de los agentes terapéuticos o profilácticos o reactivos de detección de esta invención. Ciertos materiales de instrucción describen el uso de uno o más agentes activos de esta invención para inducir el crecimiento del pelo y/o inhibir la pérdida de cabello, para detectar calcificación anormal y/o desmineralización, para inducir remineralización, y similares. Los materiales de instrucción también pueden, opcionalmente, enseñar dosificaciones preferidas/régimen terapéutico, contraindicaciones y similares.

Aunque los materiales de instrucción típicamente comprenden materiales escritos o impresos, no están limitados a tales. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlás a un usuario final está contemplado por esta invención. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM) y similares. Tales medios pueden incluir direcciones a sitios de internet que proporcionan tales materiales de instrucción.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

### Ejemplo 1

Los péptidos vinculantes al calcio inducen el crecimiento del cabello

La Figura 1 muestra ratones tratados con DSS (derecha) y tratados simuladamente (izquierda) que muestran rebrote del cabello 13 días después del afeitado del cuero cabelludo. La Figura 2 ilustra el efecto de los compuestos de unión al calcio sobre el crecimiento del cabello en ratones. El panel más a la izquierda de cada serie muestra ratones al día 0 después de la preparación y antes del tratamiento. Los paneles de la derecha muestran los ratones el día 23, la fecha del punto final. La serie superior muestra el control negativo que recibe tratamiento diario con solución salina tópica. La serie inferior muestra ratones que reciben tratamiento diario con una formulación tópica de un compuesto DSS aplicado en parches descritos, lo que demuestra un crecimiento significativo del cabello en comparación con los controles.

### Ejemplo 2

Nucleación de hidroxiapatita en el esmalte de los dientes y dentina por péptidos DSS

Para determinar si la aplicación de DSS a diversas preparaciones de nucleación de HA promovido por tejido, que podría conducir en última instancia a la remineralización tisular, se pulieron con una rueda abrasiva Streurs y se prepararon para experimentos de nucleación dientes humanos adultos seccionados sagitalmente (obtenidos después de extracción durante la práctica clínica normal). La mitad de las secciones se desmineralizaron con ácido fosfórico al 35% durante 15 minutos, después se aclararon a fondo con agua desionizada. La otra mitad no fue tratada. Todas las muestras se sometieron a sonicación después durante cinco minutos para eliminar el exceso de residuos dejados por el corte y la molienda y/o la desmineralización. Las muestras se trataron con 8DSS 12.5  $\mu$ M disuelto en solución reguladora HEPES 50 mM (pH 7.0), solución reguladora solamente, o se dejaron sin tratar. Las muestras se sumergieron entonces en un fluido corporal simulado (SBFn), destinado a acelerar la nucleación de 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 permitir que los cristales de HA nucleados crecieran. La Tabla 5 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 con el fin de amplificar los cristales nucleados para facilitar la visualización por SEM.

Tabla 5. Composición de la solución de SBFn y SBFg.

| Concentración iónica | Na <sup>+</sup> | K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup> | Mg <sup>2+</sup> | HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | Cl <sup>-</sup> | HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> |
|----------------------|-----------------|----------------|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 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                | 0                             | 294.0           | 2.0                            | 0                             |

La superficie del esmalte no desmineralizado, no tratado y tratado con regulador permaneció ampliamente amorfa, indicando poco o ningún crecimiento de cristales (y por lo tanto poca o ninguna nucleación) (Figura 3, dos filas superiores). Sin embargo, se observó un crecimiento cristalino significativo (que indica una nucleación temprana y

robusta) en esmalte desmineralizado expuesto al péptido 8DSS (Figura 3, dos filas superiores). Esto indica que los péptidos DSS pueden reconocer específicamente el esmalte desmineralizado y el crecimiento de hidroxiapatita nucleada sobre la superficie del esmalte desmineralizado.

La superficie de la dentina no desmineralizada mostró cierto grado de crecimiento de cristales en las muestras no tratadas y tratadas con regulador. 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 3, dos filas inferiores). Hemos demostrado previamente la capacidad de los péptidos DSS, junto con los regímenes de remineralización existentes, para causar la deposición de capas gruesas de fosfato de calcio suficientes para ocluir los túbulos dentinarios en la dentina desmineralizada. Estos resultados indican que con un tratamiento ligeramente diferente, la nucleación del cristal se produce principalmente en la dentina no desmineralizada. De este modo, dependiendo del régimen de tratamiento específico empleado, se pueden usar péptidos DSS para depositar capas de fosfato de calcio sobre dentina desmineralizada o para provocar una nucleación robusta del crecimiento cristalino de hidroxiapatita en superficies totalmente mineralizadas. Esto significa que los péptidos DSS pueden usarse, por ejemplo, para tratar la sensibilidad de los dientes debido a la exposición de los túbulos dentinarios, para remineralizar la dentina desbrida mecánicamente implicada en caries, o para reparar las superficies dentinarias fracturadas.

#### Ejemplo 3

Unión específica de tejidos de péptidos DSS en dientes humanos:

Con el fin de investigar la especificidad del enlazamiento del péptido DSS tejido dental, secciones de dientes humanos fueron expuestas a péptidos DSS y variantes, y a continuación se generaron imágenes por CLSM. Los péptidos utilizados para estos experimentos fueron 8DSS, 8ASS, 8DAA, 8NAA, 4DSS, 4ESS, 4NSS, 4DTT, 4ETT, 4NTT y 6DSS. Las secciones sagitales de dientes humanos extraídas durante la práctica clínica normal se pulieron y luego se incubaron durante diez minutos en una solución del péptido marcados con 5(6)-carboxifluoresceína (12.5 pM) que contenía NaCl 10 mM y HEPES 50 mM, pH 7.0. Se prepararon muestras de control sin péptido. Las muestras se lavaron extensamente después del tratamiento y se formaron imágenes mediante CLSM usando iluminación láser azul ( $\lambda=488$  nm) y un filtro de emisión FITC, con ajustes idénticos de cámara y microscopio para cada muestra. Para cada sección se recolectaron y ensamblaron múltiples escáneres en un modo automatizado para generar paneles de imágenes que representan un área de  $13 \times 13$  mm, suficientes en la mayoría de los casos para abarcar toda la sección. Como se sugiere en los resultados anteriores de afinidad de unión, los péptidos que contienen la secuencia (DSS) exhibieron los niveles más altos de unión a las superficies de los dientes, con 6DSS y 8DSS mostrando los mayores niveles de tinción. Los resultados de estos experimentos se exponen en la Figura 4. 8DSS, 6DSS y 4DSS se unen principalmente a la dentina del manto, con una unión dentina-esmalte bien delineada, baja o ninguna unión a la dentina de la punta de la raíz o el esmalte basal y no detectable que se une al esmalte cortical o a la superficie del esmalte. También se observó una unión significativa a los bordes de la cavidad pulpar. 8ASS, 4ESS y 4NSS exhibieron patrones similares, aunque a niveles más bajos de unión. 8DAA exhibió una inversión de este patrón de unión, con unión primaria a la dentina de la punta de la raíz y el esmalte cortical, así como a la unión dentina-esmalte y la pared de la cavidad pulpar. 8DAA exhibió poca o ninguna unión a la dentina del manto, dentina circumpulpar, o esmalte basal. 4DTT y 4ETT exhibieron patrones de unión similares a los de 4DSS y 4ESS, aunque a niveles muy reducidos.

El 8NAA mostró muy poca unión a cualquier tejido sano, pero se unió ligeramente a una lesión cariosa presente en la muestra (véase el Ejemplo a continuación). El 4NTT exhibió unión fuerte 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 pueden ser buscadas con alta especificidad usando péptidos específicos.

#### Ejemplo 4

Unión preferente de péptidos DSS a lesiones cariosas en los dientes

Se pulieron secciones de dientes humanos que contienen lesiones cariosas evidentes, que consisten en esmalte desmineralizado, y se expusieron a péptidos DSS marcados con 5(6)-carboxifluoresceína y variantes. Las secciones se lavaron extensamente y se formaron imágenes mediante CLSM usando iluminación láser azul ( $\lambda=488$  nm) y un filtro de emisión FITC, con ajustes de microscopio y cámara ajustados para cada muestra para optimizar la señal detectada de cada péptido. Las imágenes se examinaron para identificar los niveles relativos de unión de péptidos en tejidos sanos frente a caries. 4ESS, 4NSS, 8DAA, 8NAA, 4ETT, 4DSS, 8ASS, 8DSS y 6DSS mostraron una unión altamente específica a lesiones cariosas, con poca o ninguna unión al esmalte sano circundante (Figura 5, algunas de estas lesiones son visibles en la Figura 4 como bien). Otros péptidos no se probaron, pero basándose en estos resultados se supone la unión a lesiones cariosas. De estos péptidos, 4ESS, 4NAA, 8DSS, 6DSS, 4DSS, 8DAA y 8ASS presentaron una tinción excepcionalmente fuerte a lesiones cariosas con unión relativamente débil (a menudo completamente ausente) al esmalte circundante. La capacidad de estos péptidos de unirse a las lesiones cariosas, aunque presentan poca o ninguna unión a la superficie totalmente mineralizada del esmalte saludable, indican que estos péptidos pueden usarse para identificar caries o lesiones dentarias del diente. Dada su capacidad para remineralizar en sitios de degradación del esmalte, también pueden usarse para iniciar la remineralización en sitios de degradación del esmalte tal como caries o sitios de lesión sin causar nucleación inapropiada en superficies de tejido sanas.

## Ejemplo 5

Actividades antimicrobianas de las fusiones de péptido-compuesto antimicrobiano DSS:

Con el fin de determinar la idoneidad de los péptidos que se unen al calcio para servir como unidades estructurales de direccionamiento para suministrar compuestos terapéuticos a las superficies mineralizadas, se sintetizaron péptidos que contenían un péptido N-terminal (DSS)<sub>4</sub>, (DSS)<sub>5</sub> o (DSS)<sub>6</sub>, un triglicina (GGG), y un péptido antimicrobiano 2c-4 (RWRWRWF, SEQ ID NO: 22 (SEQ ID NO: 26 en WO 2007/038683)). Las secuencias de estas proteínas de fusión son DSS, DSS, DSS, DSS, GGG, RWRWRWF (SEQ ID NO:23), DSS, DSS, DSS, DSS, DSS, GGG, RWRWRWF (SEQ ID NO: 24) y DSS DSS DSS DSS DSS DSS GGG RWRWRWF (SEQ ID NO: 25) (ver SEQ ID NO: 27-29, respectivamente en WO 2007/038683). La actividad antimicrobiana de estos péptidos contra bacterias planctónicas anaeróbicas se determinó mediante una modificación de un ensayo descrito anteriormente. En resumen, las células UA159 de la cepa *Streptococcus mutans* se diluyeron a  $1 \times 10^5$  cfu/mL en medio de caldo Todd-Hewitt (TH) y se mezclaron con nanocristales de hidroxiapatita suspendida (Berkeley Advanced Biomaterials, Inc., 0.03% p/v) o, para muestras de control, un volumen equivalente de agua desionizada. Las alícuotas se transfirieron a placas de 96 pocillos (Fisher). Después se hicieron diluciones en serie de los péptidos y se añadieron a las bacterias. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada péptido se determinó identificando la concentración de péptido que inhibía completamente el crecimiento bacteriano después de una incubación de aproximadamente 24 horas, medida por la absorbancia de suspensiones celulares a una longitud de onda de 600 nm. El péptido 2c-4 muestra una CIM de 2 pM frente a *S. mutans* planctónico por sí misma. Cuando se conjuga con una unidad estructural (DSS)<sub>4</sub> para generar el péptido 4DSS-2c4, su CIM aumenta hasta 52.5 pM, una pérdida significativa de eficacia que no se ve afectada por la adición de hidroxiapatita al 0.03% (p/v). Sin embargo, tal como se ha mostrado anteriormente, la unidad estructural (DSS)<sub>4</sub> muestra menor afinidad por la hidroxiapatita que los péptidos con más repeticiones de DSS y la alta carga positiva del péptido 2c-4 puede interactuar con la alta carga negativa de la unidad estructural (DSS)<sub>4</sub> para inhibir algo la actividad. No obstante, se mantiene cierta actividad antimicrobiana por este péptido.

Alternativamente, la conjugación de una unidad estructural (DSS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 26) al péptido antimicrobiano b-34 (DSS DSS DSS DSS DSS DSS GGG LKRF LKWF KRF (SEQ ID NO:27) (SEQ ID NO:30 en el documento WO 2007/038683) para generar el péptido 6DSS-b-34 (SEQ ID NO: 31 en el documento WO 2007/038683) conduce a una mejora en la actividad antimicrobiana sobre la del péptido parental (CIM=3.1 pM para 6DSS-b-34 frente a 5.6 pM para b-34. Aunque la adición de 0.03% de HA reduce ligeramente la actividad antimicrobiana de 6DSS-b-34, la CIM resultante de 12.5 pM todavía representa una actividad considerable frente a *Streptococcus mutans*. En otra alternativa, el péptido PL-135 (SEQ ID No. 32 en el documento WO 2007/038683) mostró una CIM de 21 pM frente a *S. mutans* planctónica en medio solo. La conjugación de este péptido con una unidad estructural (DSS)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 28) para generar el péptido 5DSS-PL135 (DSS DSS DSS DSS DSS GGG FHFHLHF (SEQ ID NO: 29) ((SEQ ID NO: 33 en el documento WO 2007/038683)) reduce su actividad antimicrobiana contra *S. mutans* a >170 pM en medio solo. La adición de una suspensión de hidroxiapatita al 0.03% al medio conduce a la recuperación de gran parte de esta actividad, reduciendo el CIM a 42.5 pM.

Esto muestra que otros compuestos pueden mantener su actividad cuando se conjugan con péptidos DSS. Además, esto demuestra que se pueden generar fácilmente compuestos que sólo tienen actividad significativa en presencia de un objetivo de péptido DSS, 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 representan un paso importante hacia la mejora de la seguridad y la eficacia de los enfoques terapéuticos para los trastornos de los tejidos mineralizados.

## Ejemplo 6

Unión específica y mineralización de superficies calcificadas mediante péptidos pequeños

Se han diseñado varios péptidos pequeños (<25 aa) basados en la secuencia de la fosfoproteína dentinaria, una de las principales proteínas no colagenosas que se cree que está implicada en la mineralización de la matriz extracelular de la dentina durante el desarrollo del diente. Estos péptidos, que consisten en múltiples repeticiones del tripéptido aspartato-serina-serina (DSS), se unen con alta afinidad a compuestos de fosfato de calcio y, cuando están inmovilizados, pueden reclutar fosfato de calcio a perlas de poliestireno percibidas o a superficies de dentina humana desmineralizada. La afinidad de la unión a las superficies de hidroxiapatita aumenta con el número de repeticiones (DSS)<sub>n</sub>, y aunque secuencias repetidas similares -(NTT)<sub>n</sub>, (DTT)<sub>n</sub>, (ETT)<sub>n</sub>, (NSS)<sub>n</sub>, (ESS)<sub>n</sub>, (DAA)<sub>n</sub>, (ASS)<sub>n</sub>, y (NAA)<sub>n</sub> - también mostró actividad de unión a HA, generalmente no estaba al mismo nivel que la secuencia natural. Se demostró que la unión de los péptidos (DSS)<sub>n</sub> a los dientes humanos seccionados era específica de tejido, con altos niveles de unión a la dentina del manto, menores niveles de unión a la dentina circumpulpal y poca o ninguna unión al esmalte saludable. Se encontró que la fosforilación de las serinas de estos péptidos afectaba a la avidéz, pero no a la afinidad, de la unión. Se discute la utilidad potencial de estos péptidos en la detección de lesiones cariosas, el suministro de compuestos terapéuticos a los tejidos mineralizados y la modulación de la remineralización.

Materiales y métodos

Síntesis de péptidos

Se sintetizaron las secuencias peptídicas siguientes: 2DSS (DSS DSS, SEQ ID NO:30), 4DSS (DSS DSS DSS DSS, SEQ ID NO:31), 6DSS (DSS DSS DSS DSS DSS DSS, SEQ ID NO:32), 8DSS (DSS DSS DSS DSS DSS DSS DSS DSS, SEQ ID NO:33), 4ESS (ESS ESS ESS ESS, SEQ ID NO:34), 4NSS (NSS NSS NSS NSS, SEQ ID NO:35), 4DTT (DTT DTT DTT DTT, SEQ ID NO:36), 4ETT (ETT ETT ETT ETT, SEQ ID NO:37), 4NTT (NTT NTT NTT NTT, SEQ ID NO:38), 8DAA (DAA DAA DAA DAA DAA DAA DAA DAA, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40), 8NAA (NAA NAA NAA NAA NAA NAA NAA NAA, SEQ ID NO:41), 8ASS (ASS ASS ASS ASS ASS ASS ASS ASS, SEQ ID NO:42), #3-1 (LIKHLHRL, SEQ ID NO:43).

Se sintetizaron péptidos usando química de fase sólida Fmoc estándar en un sintetizador de péptidos múltiples Apex 396 (AAPPTec, Louisville, KY) a escala de 0.015 mM. Los péptidos completados se escindieron de la resina con ácido trifluoroacético al 95% y catalizadores apropiados. El péptido en bruto se purificó hasta una pureza del 90-95% usando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (ACTA Purifier, Amersham, Arlington Heights, IL) y la masa de péptidos se confirmó mediante espectroscopía de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Los péptidos para uso en análisis de unión se marcaron con 5(6)-carboxifluoresceína antes de la escisión, y los péptidos para uso en ensayos que requirieron inmovilización de péptidos se marcaron en el extremo C con biotina inmediatamente después de la etapa de escisión.

#### Ensayo de unión de HA

Los péptidos marcados con fluoresceína marcados con DSS de varias longitudes se sometieron a ensayos de despliegue como sigue: Se prepararon muestras que contenían concentraciones variables de péptido marcado con fluoresceína (0-100  $\mu$ M) y una cantidad fija (0.3 mg) de nanocristales de HA con una superficie específica de 100 m<sup>2</sup>/g (Berkeley Advanced Biomaterials, Berkeley, CA). Se tomaron medidas de la absorbancia del péptido marcado a 488 nm (la máxima absorbancia del marcador de fluoresceína) antes y después de la exposición a HA. La cantidad de péptido unido se calculó comparando la relación de las absorbancias finales ( $A_f$ ) e iniciales ( $A_i$ ) con la concentración inicial ( $C_0$ ) [ $C_{\text{ligado}} = (A_f/A_i)C_0$ ]. Se generaron gráficos de la cantidad de péptido unido por metro cuadrado de superficie de HA frente a la concentración de péptido no unido en equilibrio. Las isothermas resultantes se ajustaron a la isoterma de Langmuir,  $x/m = (K_A N_{\text{max}} C_{\text{eq}})/(1 + K_A C_{\text{eq}})$ , donde  $x/m$  representa la cantidad molar de péptido unido por unidad de superficie HA,  $K_A$  es la constante de afinidad del péptido para la superficie de HA (L/Mol),  $N_{\text{max}}$  es la concentración superficial máxima (mol/m<sup>2</sup>) y  $C_{\text{eq}}$  es la concentración molar de péptido no unido en equilibrio (Calis et al., (1995) Pharm Res., 12: 1072-1076 ).

#### Unión de fosfato de calcio a péptidos DSS inmovilizados

Se incubaron perlas de poliestireno recubiertas con estreptavidina con un diámetro medio de 4  $\mu$ m (SpheroTech, Lake Forest, IL) con péptido 8DSS conjugado con biotina o biotina no conjugada (perlas de control). Las perlas se lavaron con PBS para eliminar el péptido no unido (o biotina no unida en perlas de control) y se incubaron en una solución de PBS + CaCl<sub>2</sub> 1 mM + NaHPO<sub>4</sub> 1 mM durante 12 días antes de la formación de imágenes.

#### Cultivo de médula ósea de ratón

Se hicieron crecer cultivos de médula ósea de ratón hasta confluencia en DMEM + FBS al 10% y luego se trataron continuamente durante 3 semanas con 6DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína 2.5 p.M o péptido marcado con 5(6)-carboxifluoresceína 2.5 p.M #3-1 (péptido de control) en  $\alpha$ -MEM + FBS al 10% + ácido ascórbico 50 p.g/ml,  $\beta$ -glicerofosfato 4 mM. Los cultivos se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un conjunto de filtros de excitación/emisión FITC.

#### Unión y mineralización de superficies dentales

Se seccionaron sagitalmente molares humanos adultos, extraídos durante la práctica clínica normal, (Accutom-50, Copenhagen, Dinamarca, lámina de diamante CA-231) y se desmineralizaron con gel de ácido etilendiaminotetraacético al 19% (EDTA) durante 1 hora, seguido de inmersión en agua desionizada y ultrasonificación para eliminar los desechos. Las muestras se trataron con péptido 8DSS de 12.5 p.M en regulador HEPES 50 mM (pH 7.0) o regulador solo (sin péptido) o se dejaron sin tratar durante 1 hora antes de la remineralización con Quell Desensitizer (Pentron Technologies, Wallingford, CT), una solución de remineralización consistente en soluciones acuosas de cloruro de calcio y fosfato potásico, durante 15 minutos. Las muestras se aclararon minuciosamente antes de la formación de imágenes mediante microscopía electrónica de barrido.

Para experimentos de unión, se incubaron los molares humanos adultos seccionados sagitalmente durante 10 minutos en una solución de péptido 6DSS marcado con 5(6)-carboxifluoresceína 12.5 p.M que contenía NaCl 10 mM y HEPES 50 mM, pH 7.0. Se prepararon muestras de control sin péptido. Las muestras se enjuagaron después del tratamiento y se formaron imágenes mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM) con iluminación mediante un láser Kr/Ar azul ( $\lambda = 488$  nm) y un filtro de emisión FITC.

#### Resultados

#### Análisis Cuantitativo de DSS- Péptido que se liga a las superficies de HA

Con el fin de evaluar cuantitativamente la intensidad de la interacción DSS-HA así como para determinar las funciones de longitud y secuencia de péptidos en la unión, los péptidos que contienen DSS marcados con fluoresceína de varias longitudes se sometieron a ensayos de despliegue como se describe en "Materiales y métodos".

Los datos experimentales se ajustaron a la isoterma de Langmuir, que describe la unión de moléculas a superficies con las condiciones de que (1) todos los sitios de unión tengan la misma afinidad para el péptido y (2) el péptido formará una monocapa en la superficie, pero no pueden acumularse a niveles más altos (Atkins (1994) Physical chemistry, Freeman, New York). El excelente ajuste de la isoterma de Langmuir a los datos experimentales valida estas condiciones, y las constantes obtenidas de este análisis se utilizaron para las comparaciones entre péptidos. Como se muestra en la Figura 7A y se resume en la Tabla 6, tanto la afinidad de unión ( $K_A$ ) como la concentración de monocapa ( $N_{Max}$ ) de los diversos péptidos aumentaron con el número de repeticiones de DSS por péptido. Además, se probaron varios péptidos variantes (Figuras 7B, 7C, Tabla 6): un péptido que contenía una cadena lateral más larga en la primera posición (4ESS), péptidos que tenían un grupo hidroxilo estéricamente más impedido en la segunda y tercera posiciones (4DTT, 4NTT, 4ETT), péptidos que carecen de un grupo cargado en la primera posición (4NSS, 8ASS) y péptidos que carecen de grupos hidroxilo en la segunda y tercera posiciones (DAA-8, 8NAA). Comparando las afinidades de estas variantes con las de péptidos que contienen DSS del mismo tamaño, se determinó que la eliminación del residuo cargado negativamente (4NSS, 4NTT; Figura 7B, 8ASS, Figura 7C) dio como resultado una pérdida significativa de afinidad de unión, mientras que el reemplazo de los residuos de Ser con Thr o Ala (4DTT, 4ETT, Figura 7B; DAA8, Figura 7C) tuvo poco efecto observable en este parámetro (por ejemplo, DAA-8 tiene un  $K_A$  que está dentro del error experimental del  $K_A$  para 8DSS). Los péptidos en los que tanto el residuo ácido en la primera posición como los residuos de serina en las posiciones 2 y 3 se reemplazaron (4NTT, Figura 7B; 8NAA Figura 7C) condujo a una pérdida casi total de actividad de unión.

Debido a que la actividad de unión está determinada tanto por la afinidad de unión ( $K_A$ ) como por la máxima concentración de monocapa ( $N_{Max}$ ), los péptidos que muestran afinidades similares pueden variar ampliamente en su actividad global debido a diferencias en  $N_{Max}$ . Por lo tanto, aunque la presencia de una carga negativa en la posición 1 de la repetición es claramente el parámetro de secuencia clave para determinar la afinidad de unión, estos datos sugieren que tanto los residuos ácidos como las serinas están implicados en la unión de estos péptidos a superficies HA: Asp-Ser-Ser es la secuencia óptima que da lugar a la actividad de unión a HA (debido al efecto de las serinas en la máxima concentración de monocapa), mientras que todos los péptidos variantes muestran una unión marcadamente reducida a HA *in vitro*. De manera interesante, la fosforilación de la primera posición del péptido repetido 4DS(P)S de DSS no condujo a un cambio significativo en la afinidad de unión con respecto a un péptido no fosforilado del mismo tamaño (péptido 4DSS) sino que dio un gran aumento en la densidad de unión en superficie, lo que sugiere una alteración en el modo de enlace más que simplemente la afinidad de la interacción (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de Langmuir de los péptidos descritos en este estudio, sobre la base de ajustes de la ecuación de Langmuir a los datos brutos.

|         | $K_A$ ( $M^{-1}$ )   | $N_{max}$ ( $mol/m^2$ )                   | $r$  |
|---------|----------------------|-------------------------------------------|------|
| 2DSS    | $57.000 \pm 24.000$  | $2 \times 10^{-8} \pm 5 \times 10^{-9}$   | 0.94 |
| 4DSS    | $94.000 \pm 26.000$  | $5.8 \times 10^{-8} \pm 6 \times 10^{-9}$ | 0.98 |
| 5DSS    | $148.000 \pm 14.000$ | $9.2 \times 10^{-8} \pm 2 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 6DSS    | $272.000 \pm 26.000$ | $1.3 \times 10^{-7} \pm 3 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 8DSS    | $290.000 \pm 70.000$ | $8.2 \times 10^{-8} \pm 6 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 4ESS    | $81.000 \pm 18.000$  | $4.6 \times 10^{-8} \pm 4 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 4NSS    | $16.000 \pm 4.000$   | $3.0 \times 10^{-8} \pm 1 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 4DTT    | $161.000 \pm 79.000$ | $1.3 \times 10^{-8} \pm 1 \times 10^{-9}$ | 0.92 |
| 4ETT    | $79.000 \pm 25.000$  | $8.8 \times 10^{-8} \pm 9 \times 10^{-9}$ | 0.94 |
| 4NTT    | $17.000 \pm 7.000$   | $5.8 \times 10^{-8} \pm 2 \times 10^{-8}$ | 0.98 |
| 8DAA    | $310.000 \pm 74.000$ | $6.0 \times 10^{-8} \pm 6 \times 10^{-9}$ | 0.99 |
| 8ASS    | ND                   | ND                                        | ND   |
| 8NAA    | ND                   | ND                                        | ND   |
| 4DS(P)S | $83.000 \pm 9.000$   | $1.2 \times 10^{-7} \pm 5 \times 10^{-9}$ | 0.99 |

## Unión de cultivos que contienen DSS a cultivos de tejidos mineralizantes

Habiendo establecido que los péptidos que contienen (DSS)<sub>n</sub> son capaces de unirse activamente a HA, buscamos determinar si se unirían a sitios emergentes de mineralización en tejido derivado biológicamente. Los cultivos de médula ósea de ratón (MBM), cultivados en condiciones osteogénicas, se trataron continuamente durante 3 semanas con péptido 6DSS marcado o péptido marcado #3-1 (péptido de control no catiónico). Los cultivos se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un conjunto de filtros de excitación/emisión FITC. En la Figura 8, el panel B muestra una tinción brillante de los nódulos de MBM mineralizantes en la muestra tratada con DSS, sin unión observada en la muestra de control (Figura 8, panel D), indicando no sólo que el péptido 6DSS marcado se une a nódulos mineralizantes en MBM pero también que esta unión es una propiedad de la secuencia DSS, en lugar de una propiedad general de péptidos pequeños.

## Unión de fosfato de calcio amorfo por péptidos que contienen DSS

Para ensayar la capacidad de los péptidos que contienen DSS de reclutar fosfato de calcio y nuclear el crecimiento de cristales, se combinó el péptido 6DSS 25 µM con concentraciones variables de CaCl<sub>2</sub> y NaHPO<sub>4</sub> y se incubaron como se describe en "Materiales y Métodos". Aunque se esperaba que la presencia del péptido que contenía DSS libre mejorara la formación de cristales de HA a concentraciones de CaHPO<sub>4</sub> subcríticas, esto no se observó (datos no mostrados). Los péptidos conteniendo DSS que contenían marcadores C-terminales de biotina se sintetizaron e inmovilizaron en perlas recubiertas con estreptavidina. Las perlas se lavaron e incubaron en soluciones que contenían concentraciones variables de CaHPO<sub>4</sub> como antes. De acuerdo con observaciones previas para las fosfoproteínas fosfóricas de la dentina, así como otras fosfoproteínas (Saito et al. (1997) Bone 21: 305-311, Saito et al. (2000) J Bone Miner Res., 15: 1615-1619), estos péptidos inmovilizados causaron la coagregación de las perlas con partículas de CaHPO<sub>4</sub> amorfo y eventualmente condujeron a la deposición de material cristalino alrededor de la perla. Como se ilustra en la Figura 9, panel A, casi todas las perlas recubiertas con péptido se incorporaron en grandes agregados de fosfato de calcio amorfo precipitado. En comparación, en la muestra de control bloqueada con biotina, casi todas las perlas estaban desagregadas y no asociadas con precipitado (Figura 9, panel B). Curiosamente, varias perlas recubiertas de péptido se cubrieron con capas más ordenadas de mineral durante el experimento (un representante se muestra en la Figura 9, panel C), mientras que todas las perlas de control no recubiertas/bloqueadas con biotina no acumulaban minerales (Figura 9, panel D).

## Unión específica de tejidos de péptidos DSS a superficies dentales

Para ensayar la unión de péptidos que contienen DSS al tejido biológico, se incubaron dientes humanos seccionados sagitalmente tratados con 6DSS (las muestras de control se prepararon sin péptido), se lavaron y se formaron imágenes por CLSM. La Figura 10 muestra la intensa tinción fluorescente del diente por el péptido marcado. Las secciones de control tratadas simuladamente teñidas con péptido revuelto o con 5(6)-carboxifluoresceína libre no mostraron fluorescencia (no se muestra). Curiosamente, este péptido se une específicamente a la dentina ya que no se observó unión al esmalte (el borde izquierdo del área manchada en la Figura 10 corresponde a la unión dentina-esmalte [DEJ]). El examen del patrón espacial de la unión de la dentina con 6DSS marcado (Figura 10) revela que la tinción es más brillante en la dentina del manto más próxima a la DEJ, con niveles notablemente más bajos de tinción en la dentina circumpulpar, cerca de la cavidad pulpar.

Remineralización mediada por DSS de superficies dentales *in vitro*

Habiendo establecido que los péptidos que contienen (DSS)<sub>n</sub> pueden unirse a la superficie de la dentina y que los péptidos inmovilizados podrían causar la acreción de fosfato de calcio, se buscó determinar si estos péptidos podrían usarse para reclutar fosfato de calcio en la superficie de la dentina. Las secciones desmineralizadas de dientes humanos extraídos se trataron con péptido 8DSS y luego se sometieron a remineralización con Quell Desensitizer (Pentron Technologies), un producto de remineralización comercialmente disponible que consistía en soluciones acuosas de cloruro de calcio y fosfato potásico. Como se muestra en las micrografías electrónicas de la Figura 11, las muestras tratadas simuladamente (Figura 11, panel C) y no tratadas (tratadas sólo con el desensibilizador, Figura 11, panel D) mostraron bajos niveles de acumulación de minerales, quedando varios túbulos dentinarios expuestos. Por el contrario, las muestras de dentina tratadas con DSS (Figura 11, panel B) acumulaban una capa continua de precipitado de fosfato de calcio en presencia de solución desensibilizante, ocluyendo completamente los túbulos dentinarios.

## Discusión

La biomineralización es uno de los procesos centrales en el desarrollo y la evolución de los vertebrados (Kawasaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101: 11356-11361) y referencias dentro de la misma, que afectan procesos tan diversos como la alimentación, locomoción, evitación de depredadores, audición y equilibrio. Los defectos en la mineralización o en las proteínas de los tejidos mineralizados están involucrados en enfermedades humanas que van desde la sordera hereditaria (Xiao et al. (2001) Nat Genet., 27: 201-204) y aterosclerosis (Magne et al. (2005) Bioessays 27: 708-716) a la caries dental y la osteoporosis. Las proteínas que median el proceso de mineralización nos ofrecen una plantilla para entender cómo manipular la deposición de compuestos de calcio y así potenciar potencialmente el tratamiento de los defectos del tejido calcificado.

La presencia omnipresente de DPP en sitios de deposición de fosfato de calcio en mamíferos sugiere que esta proteína desempeña un papel directo en el proceso de mineralización (Hao et al. (2004) Bone 34: 921-923; Rahima et al. (1988) J Histochem Cytochem., 36: 153-157; Begue-Kirn et al. (1998) Eur J Oral Sci., 106: 963-970; Bleicher et al. (1999) Matrix Biol., 18: 133-143; Baba et al. (2004) Eur J Oral Sci., 112: 163-170). Los estudios bioquímicos han demostrado que la DPP puede afectar efectivamente a la formación de cristales de HA biológicamente relevantes causando nucleación (a bajas concentraciones) o inhibición (a altas concentraciones) del crecimiento de los cristales (Lussi et al., 1988), Arch Oral Biol., 33: 685; Saito et al. (2000) J Bone Miner Res., 15: 1615-1619). Las proteínas implicadas en procesos de mineralización en vertebrados (incluyendo DPP) a menudo contienen dominios de carga negativa, Asp o Glu (Harris et al. (2000) Bone 27: 795-802, y referencias dentro). Esta observación se combinó con estudios computacionales y bioquímicos de la región de repetición (DSS)<sub>n</sub> (Veis et al., (1998) Eur J Oral Sci., 106 (Suppl 1): 234-238; Lee y Veis (1980) Int J Pept Protein Res., 16: 231-240; George et al., 1996, J Biol Chem., 271: 32869-32873; Chang et al. (2006) Calcif Tissue Int., 78: 55-61) indicaron que esta corta secuencia repetida regula la unión de minerales y la actividad de nucleación de DPP.

Dada la conocida dependencia de la actividad de DPP en su estado de fosforilación (Saito et al., (1997) Bone 21: 305-311; He et al (2005) J Biol Chem., 280: 33109-33114), no es sorprendente que los péptidos no fosforilados que contienen DSS fallaran en nuclear la formación de HA en solución libre. Sin embargo, se encontró que incluso en ausencia de fosforilación, estos péptidos se unían estrecha y específicamente a compuestos de fosfato de calcio, lo que sugiere que el propio motivo (DSS)<sub>n</sub> puede ser útil para identificar, iluminar y manipular superficies calcificadas.

Al caracterizar el comportamiento de estas moléculas, se encontró que las afinidades de unión medidas para los péptidos DSS se comparan favorablemente con afinidades medidas para otras proteínas y péptidos conocidos de unión a HA. Por ejemplo, la afinidad de unión a HA del péptido 8DSS (290.000 M<sup>-1</sup>), que consiste en 24 aminoácidos, es sólo siete veces menor que la de las nanoesferas de amelogenina completamente montadas (1.970.000 M<sup>-1</sup>) (Bouropoulos y Moradian-Oldak (2003) Calcif. Tissue Int., 72: 599-603), que consisten en hasta 40 subunidades individuales de ~25-kDa. Además, se ha informado que la región C-terminal de la amelogenina tiene una afinidad de unión a HA de 6.200 M<sup>-1</sup> (Aoba et al. (1989) J Dent Res., 68: 1331-1336), mientras que en contraste, el péptido 4DSS tiene una afinidad de 94.000 M<sup>-1</sup>. La afinidad de unión de 8DSS se compara favorablemente con los valores medidos para las histatinas de tamaño comparable (K = 353.000-1.903.000 M<sup>-1</sup> Yin et al. (2003) Arch Oral Biol., 48: 361-368), una clase de pequeños péptidos antimicrobianos que son conocidos por unir HA con alta afinidad.

La unión de péptidos que contienen DSS a sustratos definidos de HA depende fuertemente de la longitud de los péptidos, con la afinidad aumentando en proporción al tamaño del péptido hasta una longitud de seis repeticiones (18 aminoácidos), con poco aumento adicional en la afinidad vista en péptidos con ocho repeticiones (Tabla 6). Por lo tanto, seis repeticiones parecen ser óptimas para la interacción con las superficies de HA, reflejando posiblemente el número máximo de grupos funcionales del péptido que pueden interactuar eficazmente con la superficie en un momento dado. En el otro extremo de la escala de longitud, el péptido 2DSS, que contiene sólo dos repeticiones de la secuencia DSS, muestra una afinidad de unión a HA mucho más baja que la de las variantes más largas (57.000 M<sup>-1</sup>), pero muy por encima de los valores observados para la unión de aminoácidos individuales (5.000-13.200 M<sup>-1</sup> para fosfoserina (Moreno et al., 1984), Calcif Tissue Int., 36: 48-59, Benaziz et al (2001) J. Colloid Interface Sci., 238: 48-53 ), 220 M<sup>-1</sup> para Asp (Moreno y otros (1984) Calcif Tissue Int., 36: 48-59), 206 M<sup>-1</sup> para ácido glutámico (Kresak et al., (1977) Colloid Interface Sci., 59 : 283-292).

La unión del péptido a las superficies de HA también dependía de su secuencia, mostrando, casi todos los péptidos variantes, reducciones significativas en la afinidad de unión con relación a la secuencia DSS parental (Tabla 6, Figuras 7B, 7C). Nuestros resultados muestran que la secuencia primaria determinante de la unión es una carga negativa en la posición 1 de la repetición. Los estudios de polímeros extremadamente grandes de ácido aspártico muestran una afinidad de unión HA muy alta (3.000.000 M<sup>-1</sup> para un polímero de 28.8-kDa (Tsontos and Nancollas (1999) J. Colloid Interface Sci., 209: 109-115)). Las sustituciones de las serinas en la repetición DSS también conducen a reducciones en la actividad de unión, aunque mucho menos severamente. En el pasado, las mediciones de la afinidad de unión de serina a HA han variado desde aquellas demasiado bajas para someterse al análisis de Langmuir (Benaziz et al. (2001) J. Colloid Interface Sci., 238: 48-53) a valores mucho más altos (317.000 M<sup>-1</sup>, pero con un número muy pequeño de sitios de unión por metro cuadrado de HA (Moreno et al., (1984) Calcif Tissue Int., 36: 48-59) dependiendo de la preparación específica de HA utilizada, sugiriendo la posibilidad de una interacción compleja y posiblemente muy específica entre la serina y las regiones discretas de las superficies de HA. Nuestros experimentos iniciales indican que la unión de péptidos que contienen DSS a HA resulta principalmente de las contribuciones de los residuos de ácido aspártico, con las serinas jugando un papel más pequeño pero significativo.

La unión de péptidos que contienen (DSS)<sub>n</sub> a superficies de HA definidas *in vitro* nos llevó a investigar la unión de estos péptidos a tejidos biológicos calcificados. El péptido 8DSS marcado con fluoresceína se une fuertemente a la dentina de los molares humanos adultos extraídos con una notable especificidad tisular, uniéndose principalmente a la dentina del manto, con la unión al esmalte casi completamente ausente. Debe observarse que los cristales de HA de la dentina presentan morfologías muy diferentes de las del esmalte, que consisten en cristales más pequeños, en forma de placa, con orientaciones esencialmente aleatorias, en lugar de los cristales de HA alargados y bien orientados de la superficie del esmalte (Paine et al. (2005) J Biol Chem., 280: 31991-31998; Bath-Balogh and Fehrenbach (2006) Embriología, histología y anatomía dental., Elsevier Saunders, St. Louis). Por lo tanto, es posible que la especificidad de unión de los péptidos que contienen (DSS)<sub>n</sub> a las regiones de la dentina pueda ser debida a la unión selectiva de

esta forma cristalina específica de HA o (especialmente a la luz de la unión observada a fosfatos de calcio amorfos) puede reflejar una preferencia simple de estos péptidos para superficies menos ordenadas. También se observó la unión a mineralización de nódulos de médula ósea de ratón, indicando además que estos péptidos pueden ser útiles en la identificación y manipulación de una amplia variedad de tejidos mineralizados.

Aunque los péptidos no fosforilados que contienen DSS examinados en este estudio fallaron en nuclear la formación de HA en solución libre, pudieron unirse efectivamente a los agregados amorfos de fosfato de calcio. Al inmovilizar estos péptidos sobre un soporte sólido, pudimos aprovechar esta capacidad como un medio para controlar el sitio de depósito de fosfato de calcio en soluciones saturadas. Se encontró que las perlas de poliestireno con el péptido 8DSS inmovilizado sobre sus superficies agregaban eficazmente fosfato de calcio amorfo a partir de soluciones saturadas de  $\text{CaHPO}_4$ . Sin embargo, tras la incubación adicional, se encontró que las cuentas individuales acrecen capas de fosfato de calcio cristalino más ordenado, incluso sin fosforilación de los péptidos. Este comportamiento inesperado marca un alejamiento de lo que se ha observado para la proteína DPP y sugiere que la proteína de longitud completa probablemente contiene mecanismos reguladores adicionales para ayudar a gobernar la nucleación de HA. Este resultado también sugiere que los péptidos que contienen  $(\text{DSS})_n$  pueden ser enormemente versátiles en la manipulación de la deposición de fosfato de calcio.

Nuestras investigaciones de la capacidad de los péptidos que contienen  $(\text{DSS})_n$  para iniciar la deposición de minerales sobre las superficies de los dientes revelaron que el pretratamiento con el péptido 8DSS mejoró notablemente la eficacia de un producto de remineralización comercialmente disponible causando la agregación de mineral en la superficie de la dentina parcialmente desmineralizada. Las simulaciones de dinámica molecular utilizando los péptidos ricos en Asp/Ser y Asp/fosforosina teóricos han mostrado que estos péptidos probablemente adoptan conformaciones extendidas, presentando grupos funcionales a ambos lados de un plano paralelo a la superficie de interacción (George et al. (1996) *J Biol Chem.*, 271: 32869-32873; Dahlin et al., (1998) *Eur J Oral Sci.*, 106 (Supl. 1): 239-248). En el caso específico de los péptidos basados en la repetición Asp-Ser-Ser, esto tiene el efecto de proporcionar dos caras de unión mineral equivalentes, permitiendo que los péptidos inmovilizados en la superficie se unan activamente a las partículas de fosfato de calcio amorfo, conduciendo así al aumento observado de acumulación amorfa de fosfato de calcio en superficies de HA pretratadas con 8DSS. Esta actividad presenta estos péptidos como alternativas prometedoras para mejorar la remineralización de los dientes.

La capacidad para unirse específicamente a superficies calcificadas y para reclutar fosfato de calcio ofrece muchas otras oportunidades únicas para intervenciones diagnósticas y terapéuticas. Aunque estas actividades residían en proteínas grandes, no era práctico contemplar su uso en aplicaciones clínicas; pero la presente demostración de un comportamiento similar por péptidos pequeños fácilmente sintetizados proporciona la posibilidad de poderosas herramientas nuevas para diagnosticar y tratar trastornos de los tejidos calcificados. Ya hemos presentado el ejemplo de mejorar la eficacia de los regímenes de remineralización existentes mediante el pretratamiento de superficies con péptidos que contienen  $(\text{DSS})_n$ , y aún quedan por explorar muchas otras posibilidades. Los métodos actuales de diagnóstico de la caries dental, por ejemplo, se basan en el sondeo manual, la tinción colorimétrica o la fluorimetría o interferometría láser para identificar los sitios de lesiones cariosas (Audette et al. (2004) *Biochemistry* 43: 11427-11435; Tranaeus et al. (2005) *Community Dent Oral Epidemiol.*, 33: 265-273). Dada la afinidad de los péptidos  $(\text{DSS})_n$  para el fosfato de calcio amorfo y su falta de unión al esmalte sano, los péptidos marcados con fluorescencia  $(\text{DSS})_n$  pueden usarse para identificar rápidamente lesiones cariosas y precariosas en los dientes. Este método tendría una precisión mucho más alta que los colorantes colorimétricos (dependencia de la cual puede conducir a la eliminación del esmalte sano (Yip et al. (1994) *Br Dent J.*, 176: 417-421)) y sensibilidad mejorada en comparación con la radiografía o con los métodos basados en fluorescencia que se apoyan en la fluorescencia del tejido nativo.

Debido a que los péptidos que contienen  $(\text{DSS})_n$  pueden unirse fácilmente a cualquier número de marcadores o compuestos accesorios, su utilidad en aplicaciones de diagnóstico está limitada solamente por el intervalo de su especificidad de tejido. Hemos hecho un uso extensivo de péptidos marcados con fluorescencia en este estudio, pero también es posible unir compuestos yodados para su uso como agentes de contraste radiográficos (Lee et al. (2003) *J Anat.*, 203: 161-172) para mejorar el contraste en la resonancia magnética. Yokogawa et al. (2001) *Endocrinology* 142: 1228-1233, mostraron que era posible dirigir estradiol a tejidos calcificados uniéndolo a cadenas cortas de poliaspartato. De forma similar, es posible unir compuestos terapéuticos, tales como antimicrobianos o factores de crecimiento, a péptidos que contienen  $(\text{DSS})_n$  para dirigir su liberación a superficies calcificadas específicas con aún mayor precisión.

Actualmente, se están realizando esfuerzos para identificar la gama de especificidad tisular de estos péptidos y para diseñar variantes con especificidad expandida o estrechada que nos permita aprovechar su actividad de unión mineral de manera más precisa. El DPP se compone en gran parte de repeticiones de  $(\text{DSS})_n$  y ejerce efectos poderosos sobre la tasa y el tipo de mineralización en los dientes en desarrollo (Paine et al. (2005) *J Biol Chem.*, 280: 31991-31998). Mediante la aplicación de las herramientas de ingeniería de péptidos a péptidos similares a  $(\text{DSS})_n$  derivados de DPP, vamos a desbloquear todo el potencial de este único motivo de unión a minerales.

#### Ejemplo 7

Los agentes que unen el calcio inducen el crecimiento de las uñas.

A conejos blancos de Nueva Zelanda se afeitaron sus patas y se recortaron sus uñas recortadas a una longitud uniforme con respecto al aspecto visible del nuevo crecimiento dentro de la uña, y cada dedo se trató con péptido (D)-8DSS en sulfosuccinato de dioctilo (aerosol OT o AOT)/nanoemulsión agua en aceite (W/O) de isopropanol (formulación A1D), con péptido (D)-8DSS en dimetilsulfóxido (DMSO, formulación D1D) o con solución salina tamponada con fosfato (PBS) cada tres días durante 19 días, como se describe a continuación.

Se ensayaron dos formulaciones, incorporando ambas la forma D de 8DSS:A1D (aerosol OT/isopropanol) y D1D (solución de DMSO). Además, se incluyeron controles negativos, consistentes en solución salina tópica normal. Se usaron dos animales y se trataron ocho sitios en cada animal: en cada pie, se trataron los lechos de las uñas de dos dedos con el compuesto de la muestra, mientras que los lechos de las uñas de los dos dedos restantes se trataron con solución salina normal. En un animal, se trataron los primeros y segundos dedos con el compuesto activo, mientras que el tercero y cuarto dedos se trataron con una solución de control (solución salina normal); en el otro animal este patrón se invierte para controlar efectos específicos de posición dentro de la pata. Al final del experimento, se fotografiaron los pies de los animales y se sometieron las fotografías a un análisis de imágenes para determinar el efecto de las formulaciones de ensayo sobre la extensión o la velocidad de crecimiento de las uñas. Los detalles de la configuración se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Configuración del tratamiento.

|                               |                                                                                                                                                                                   |                                                             |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Formulaciones de tratamiento: |                                                                                                                                                                                   |                                                             |
| Nombre de la muestra          | Formulación                                                                                                                                                                       |                                                             |
| A1D                           | AOT micelas inversas que contienen péptido (D)-8DSS 20 mM resuspendido en 2-propanol. La concentración efectiva de péptidos en la formulación es de 100 μM. Aplicado tópicamente. |                                                             |
| D1D                           | (D)-8DSS disuelto en DMSO a una concentración de 200 μM. Aplicado tópicamente.                                                                                                    |                                                             |
| C2                            | Control negativo. Solución salina normal aplicada tópicamente                                                                                                                     |                                                             |
| Tratamiento:                  |                                                                                                                                                                                   |                                                             |
| Miembro                       | Dedos                                                                                                                                                                             | Tratamiento                                                 |
| Pierna delantera derecha      | 1, 2                                                                                                                                                                              | A1D administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
|                               | 3, 4                                                                                                                                                                              | PBS administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
| Pierna delantera izquierda    | 1, 2                                                                                                                                                                              | D1D administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
|                               | 3, 4                                                                                                                                                                              | PBS administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
| Pata trasera derecha          | 1, 2                                                                                                                                                                              | D1D administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
|                               | 3, 4                                                                                                                                                                              | PBS administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
| Pata trasera izquierda        | 1, 2                                                                                                                                                                              | A1D administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |
|                               | 3, 4                                                                                                                                                                              | PBS administrado tópicamente al lecho ungueal cada dos días |

Al comienzo de los experimentos, las uñas se rasparon en la cutícula para indicar la posición del crecimiento de uñas antes de la administración del fármaco.

Se administraron formulaciones tópicas al lecho ungueal, 20 µl por administración, cada dos días.

Los animales se mantuvieron de acuerdo con directrices de cría estándar y se observaron en busca de cualquier defecto evidente en el comportamiento o en la salud general. Se observó irritación de la piel.

Al final del experimento, los pies se fotografiaron desde múltiples ángulos según fuera necesario para mostrar la extensión del crecimiento de las uñas, así como cualquier espesamiento o cambios morfológicos macroscópicos en cada dedo; las mediciones se realizaron mediante análisis cuantitativo de las imágenes. Las uñas se rasparon de nuevo para indicar la posición del crecimiento de uñas al final del experimento.

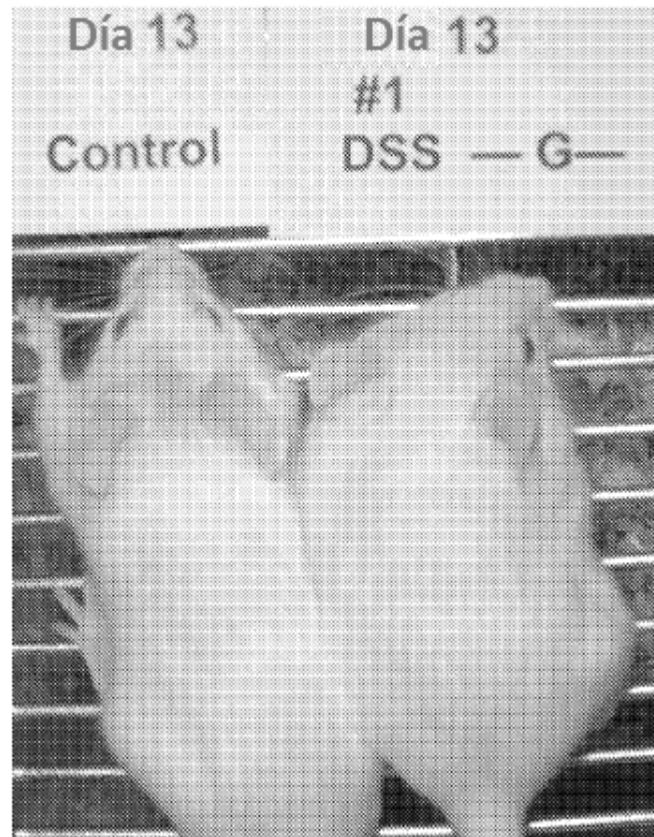
El día 19, se registraron las imágenes y se midió cada uña. Como se muestra en la Figura 12, las uñas tratadas mostraron un crecimiento significativamente mayor que las uñas no tratadas. Las mediciones agregadas del estudio muestran aumentos significativos en el crecimiento de las uñas para las uñas tratadas con D1D con respecto a las uñas tratadas con A1D, y ambos grupos de tratamiento mostraron un crecimiento de 4 a 5 veces mayor durante el período de ensayo de 19 días que en el tratamiento de las uñas no tratadas o simuladas (figura 13).

La nanoemulsión desarrollada para aplicaciones de crecimiento del cabello funciona bien para suministrar el compuesto también a la matriz de uñas, mientras que las soluciones de DMSO del compuesto activo, que son solo marginalmente eficaces en fomentar el crecimiento del cabello, parecen proporcionar el crecimiento más robusto de uñas. Esto es probablemente debido a la propensión de las vesículas de nanoemulsiones a acumularse en los folículos pilosos, mientras que las soluciones de DMSO liberan sus solutos de una manera más dispersa a través del tejido en el que se aplican.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento solo tienen fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la materia diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y estarán dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad para todos los fines.

Reivindicaciones

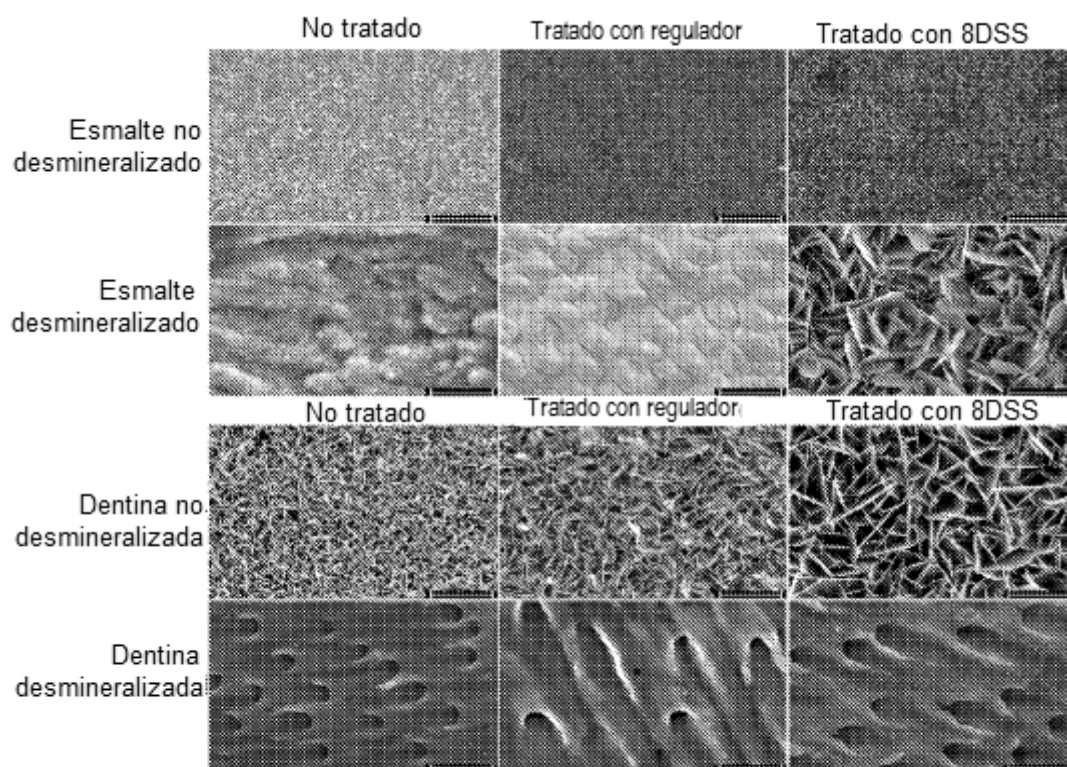
1. Un péptido de unión al calcio para uso en la inducción del crecimiento del cabello o inhibición de la pérdida del cabello y/o inducir el crecimiento de las uñas en un mamífero, en el que:
- 5      dicho péptido de unión de calcio comprende la secuencia de aminoácidos (X-Y-Z)<sub>n</sub>, donde X es ácido aspártico, Y y Z son serina, y n es un número de 2 a 100.
2. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido de unión al calcio comprende un péptido L, péptido D o péptido beta y X es ácido aspártico, Y es serina o fosfoserina y Z es serina o fosfoserina.
- 10      3. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho péptido de unión al calcio comprende un péptido L, péptido D o péptido beta seleccionado del grupo que consiste en (DSS)<sub>4</sub>, (DSS)<sub>5</sub>, (DSS)<sub>6</sub>, (DSS)<sub>7</sub>, (DSS)<sub>8</sub>, (DSS)<sub>9</sub>, y (DSS)<sub>10</sub>.
4. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho péptido es un péptido "L".
- 15      5. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho péptido no está fosforilado.
6. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho péptido está fosforilado.
- 20      7. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho péptido lleva un grupo protector en el extremo amino y/o carboxilo.
8. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el extremo carboxilo de dicho péptido está amidado.
9. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho péptido de unión al calcio se formula para administración tópica.
- 25      10. El péptido de unión al calcio para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho péptido es para el tratamiento de un ser humano diagnosticado con una afección seleccionada del grupo que consiste en alopecia areata, alopecia androgenética, alopecia inducida farmacéuticamente y alopecia inducida por radiación.
11. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho péptido es un componente de una formulación seleccionada del grupo que consiste en champú, acondicionador del
- 30      cabello, desenredante del cabello, un agente colorante del cabello, un tónico para crecimiento del cabello, un protector solar, una crema, un gel, o una pomada, un enjuague, un tónico, una solución, una emulsión, una espuma, una crema, un gel, un ungüento, un polvo espolvoreable, un linimento o un bálsamo, una loción y un ungüento.
12. El péptido de unión al calcio para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho péptido es para inducir el crecimiento de las uñas.
- 35      13. El péptido de unión al calcio para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12, en el que dicho péptido se formula para la administración a una región seleccionada del grupo que consiste en una uña, un lecho ungueal, una cutícula, el área de coronilla de un casco, la base de un cuerno.



**Fig. 1**

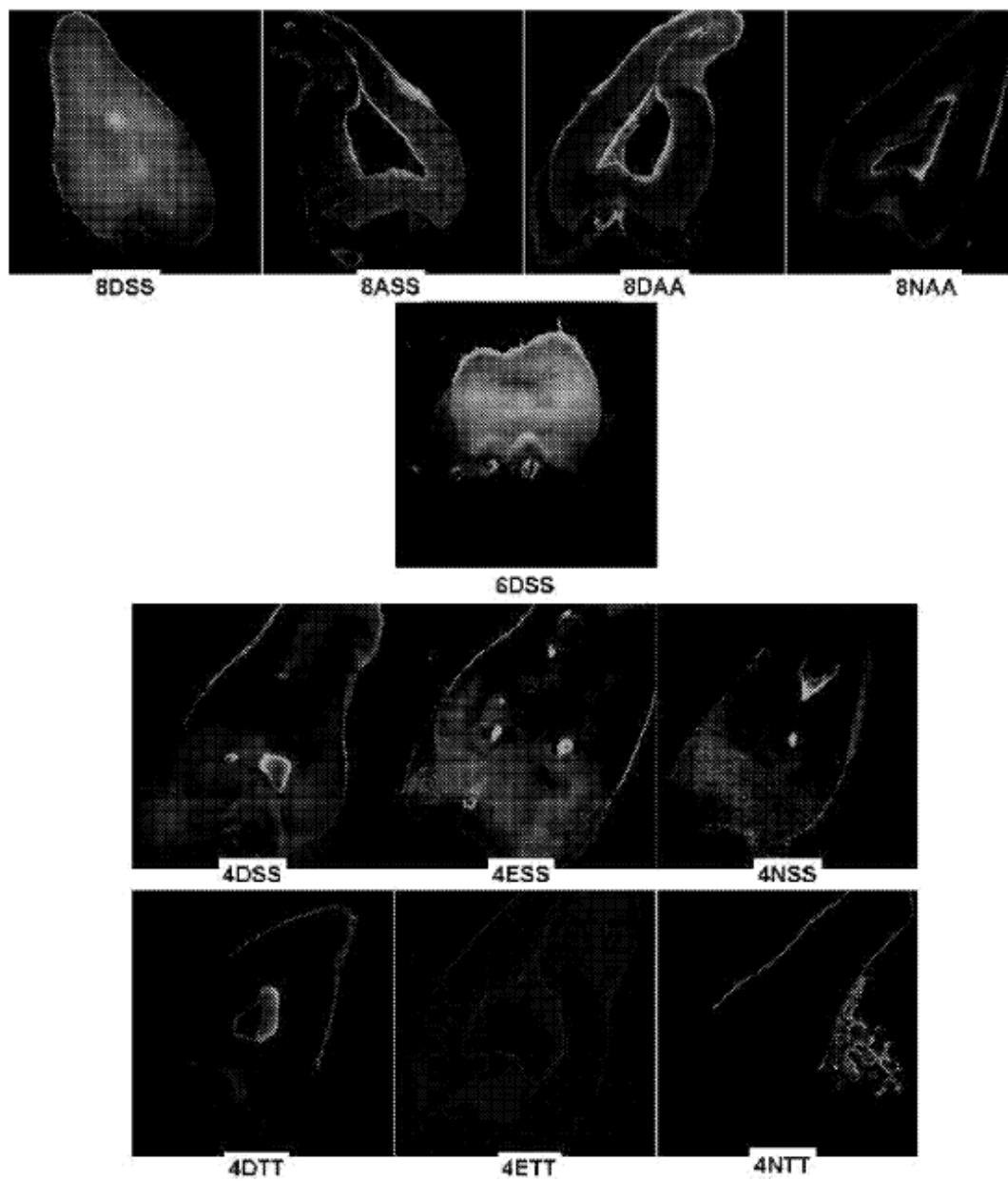


**Fig.2**

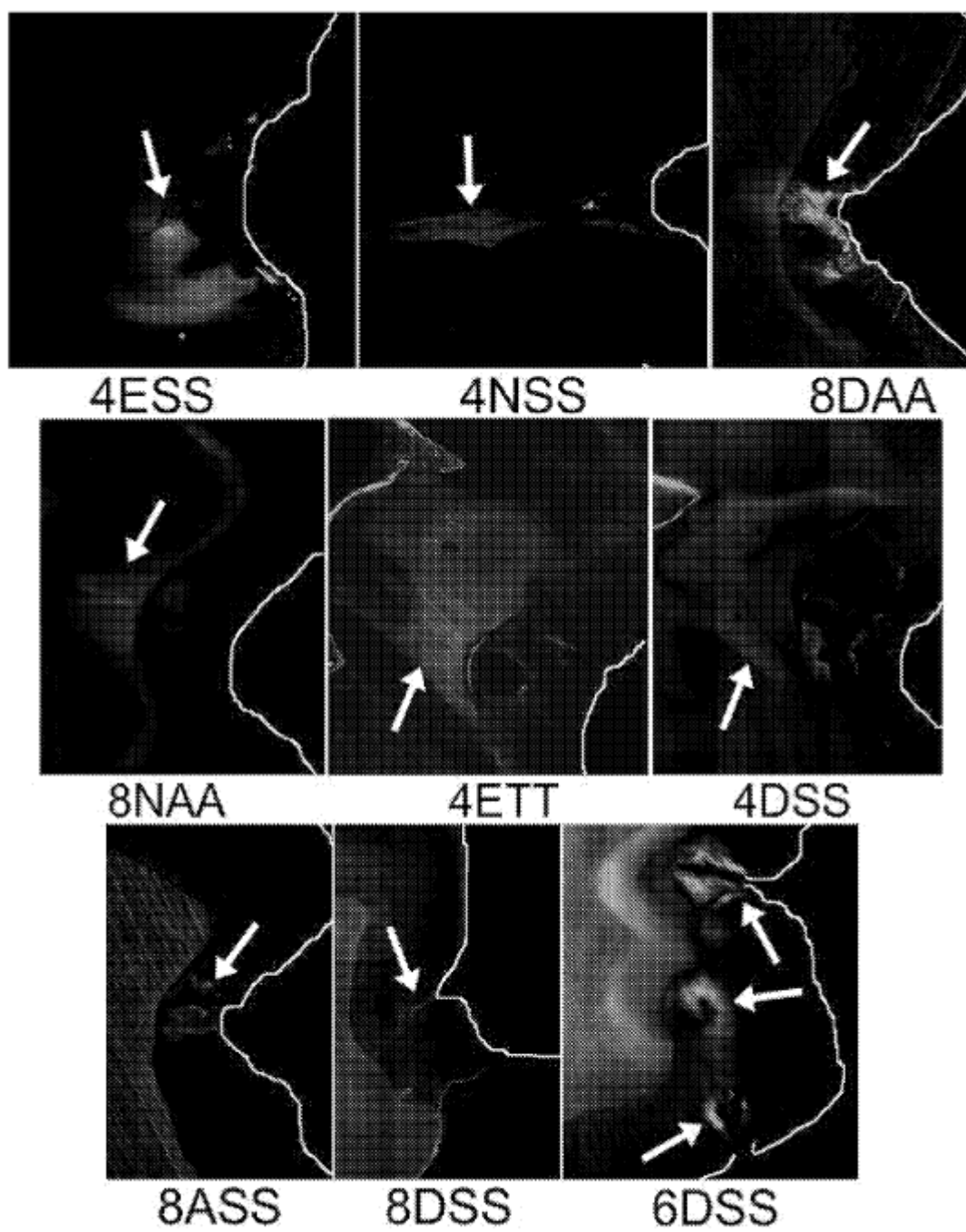


regulador

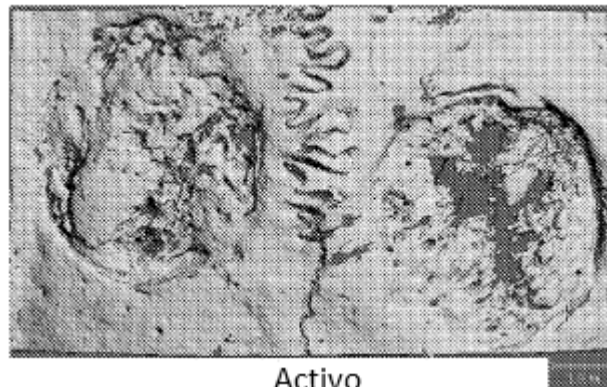
**Fig.3**



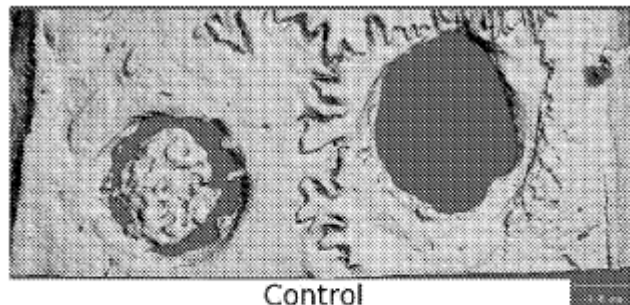
**Fig.4**



**Fig.5**

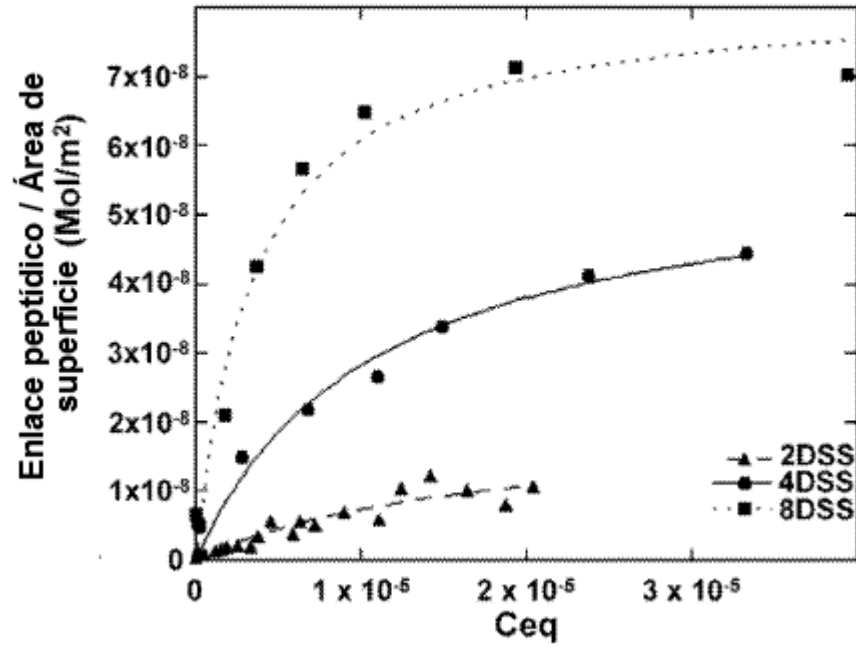


Activo

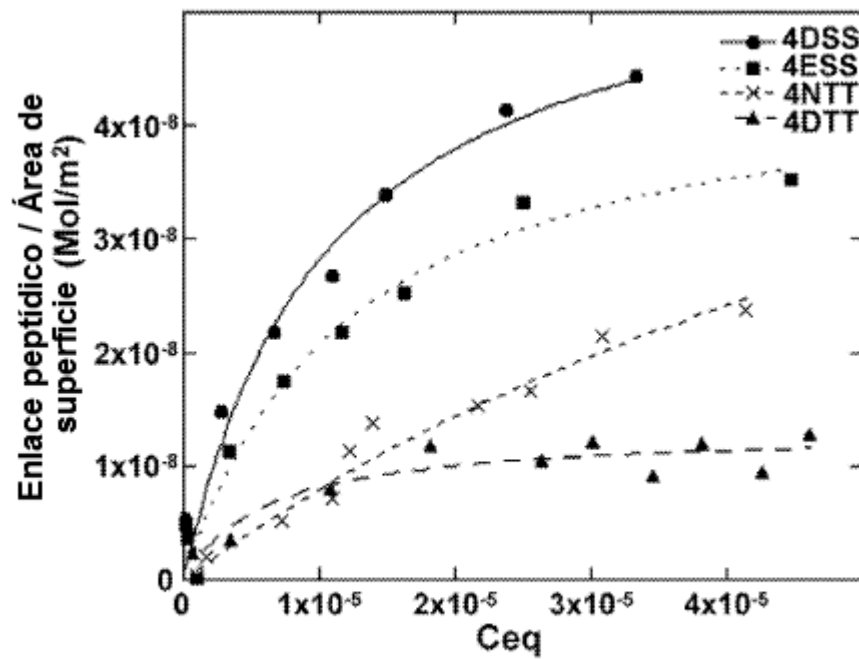


Control

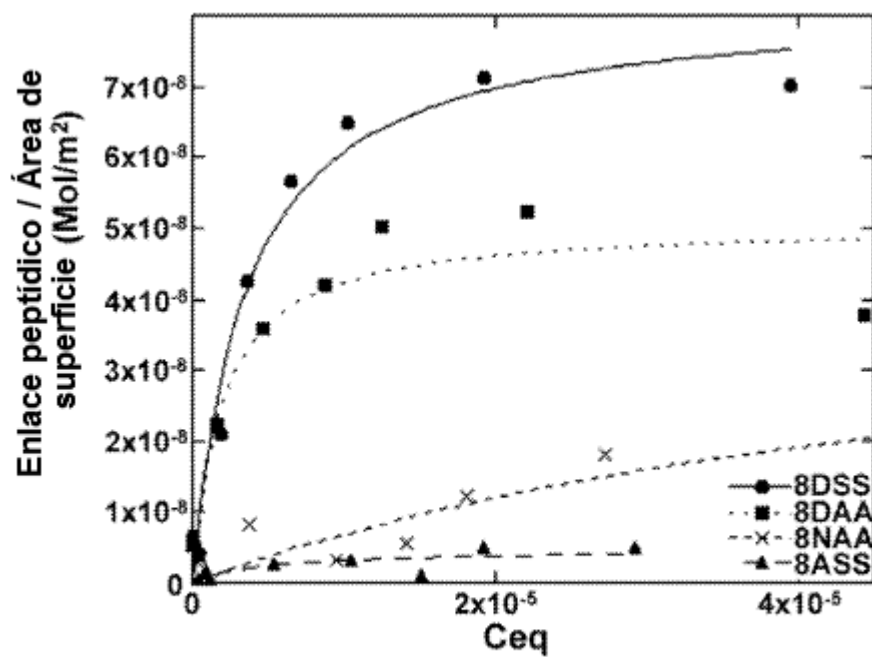
***Fig. 6***



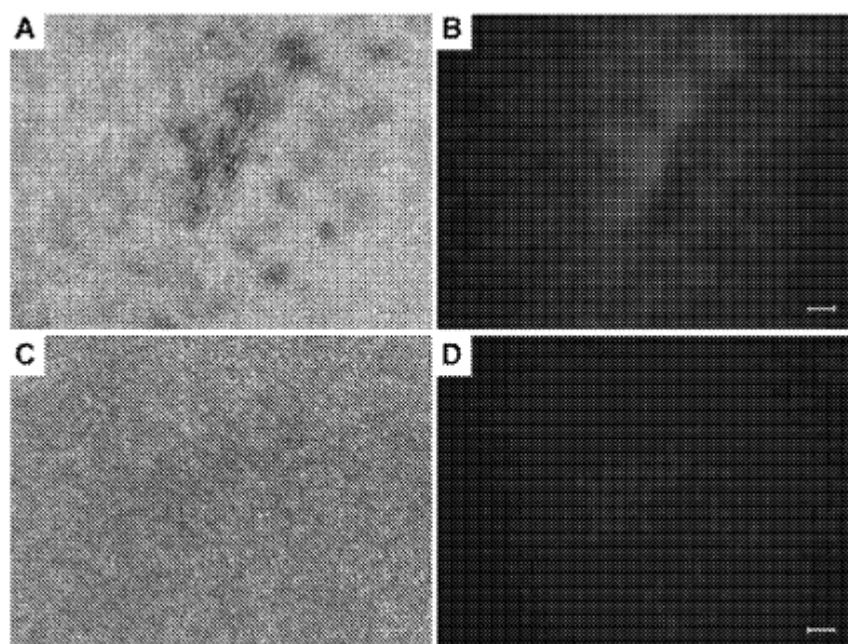
**Fig. 7A**



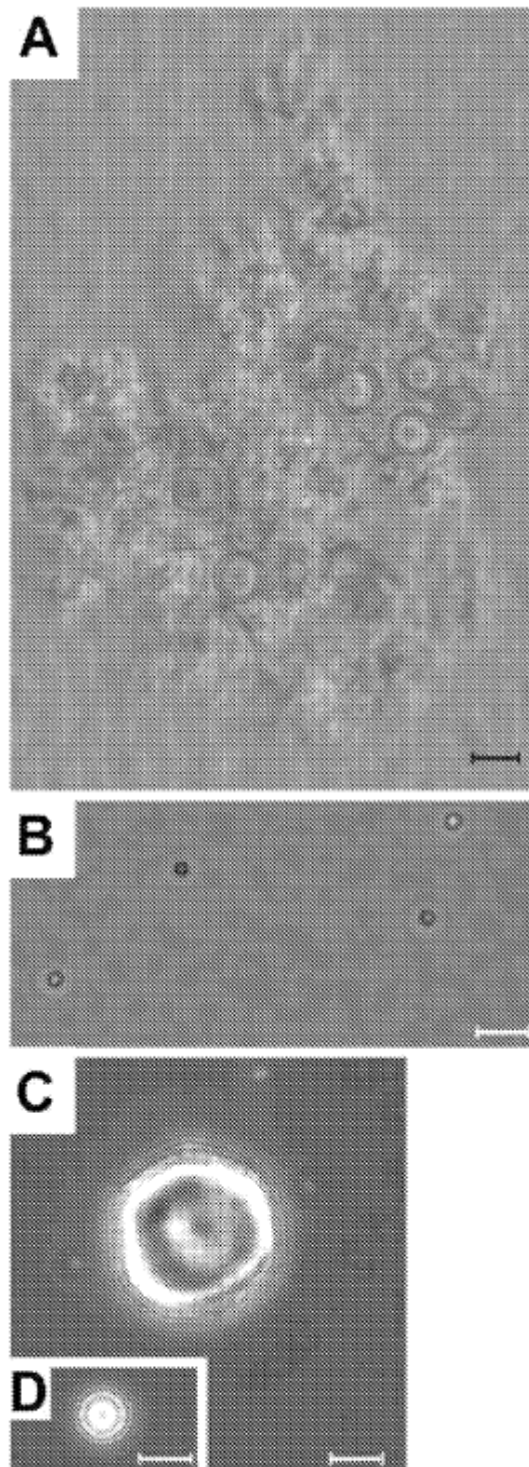
**Fig. 7B**



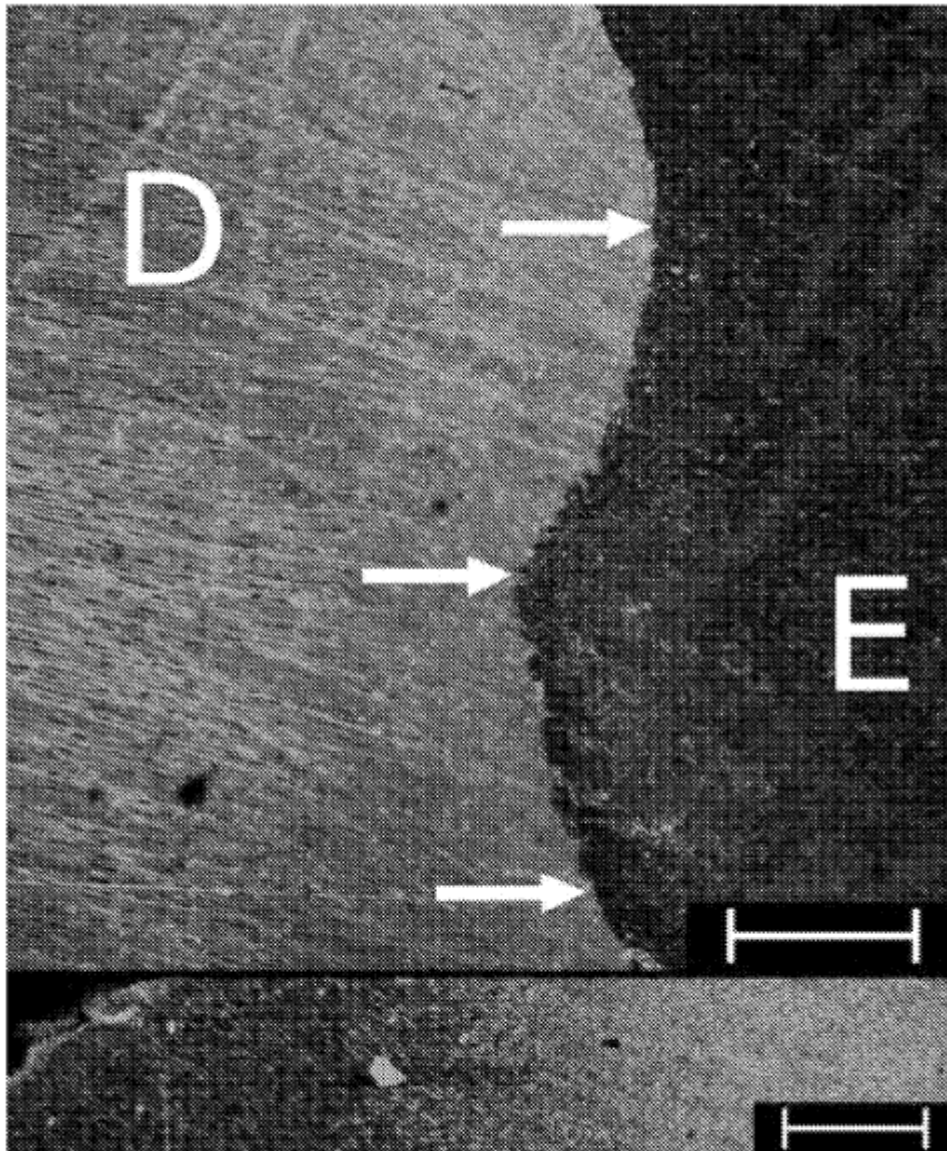
**Fig. 7C**



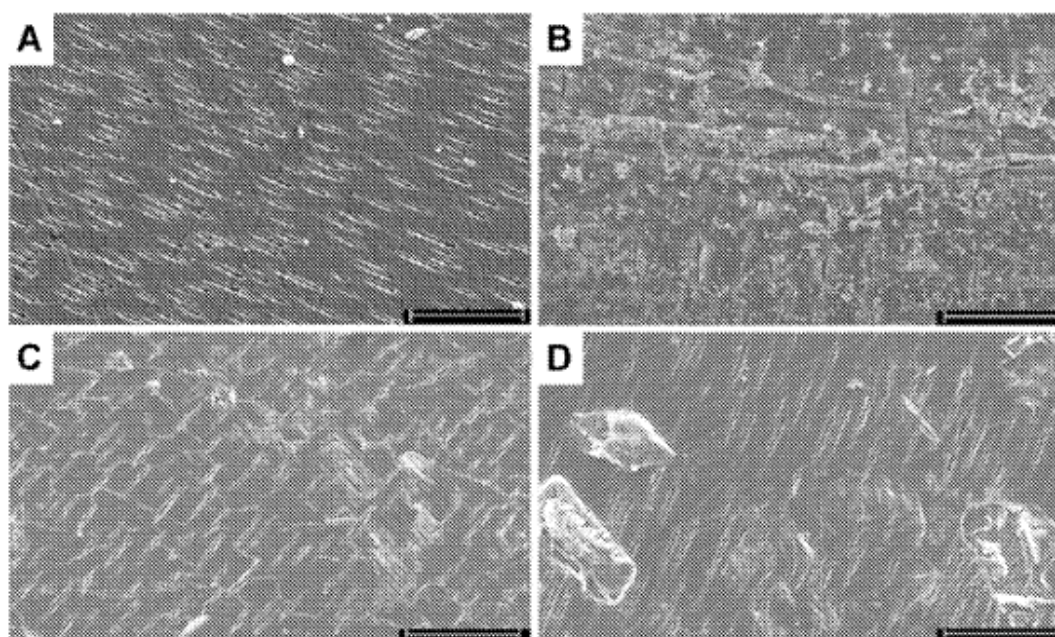
**Fig. 8**



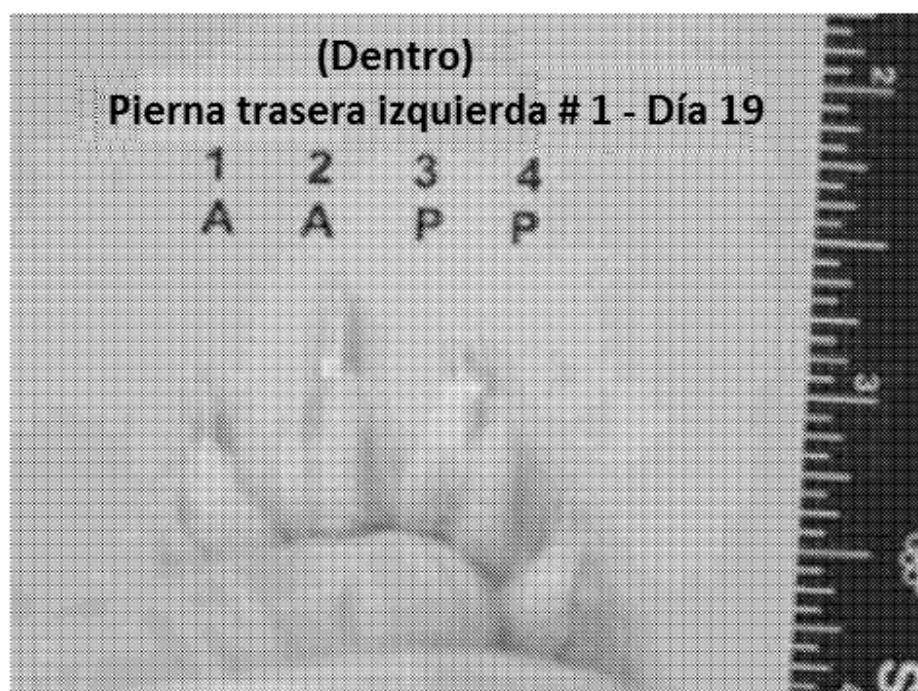
***Fig. 9***



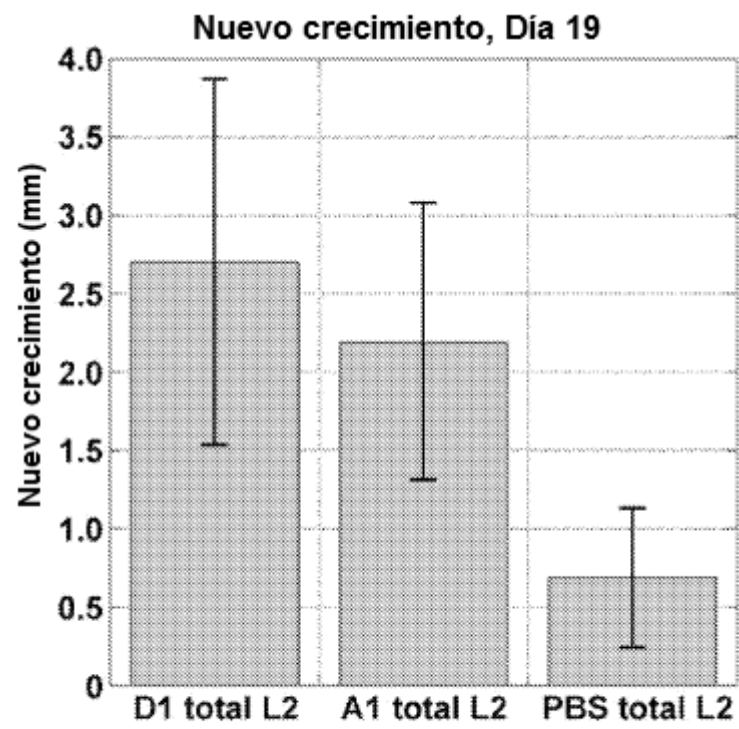
***Fig. 10***



**Fig. 11**



**Fig. 12**



***Fig. 13***