República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0806928-0 A2

* B R P I 0 8 0 6 9 2 8 A 2 *

(22) Data de Depósito: 16/01/2008
(43) Data da Publicação: 29/04/2014
(RPI 2260)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/00

(54) Título: COMPOSIÇÃO PARA A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO NA CAVIDADE ORAL, MÉTODO PARA INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS NA CAVIDADE ORAL, MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE CÁRIES DENTÁRIAS, DE DOENÇA PERIODONTAL, E DE PLACA DENTÁRIA, E PARA O TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO DA CAVIDADE ORAL ASSOCIADA COM A PRESENÇA DE PLACA DENTÁRIA, E, PROTEÍNA DE FUSÃO.

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 16/01/2007 US 60/800753

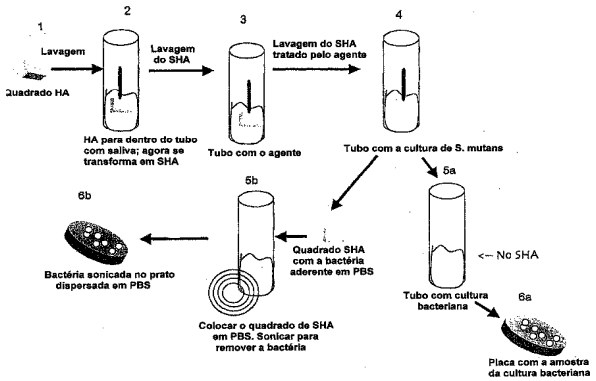
(73) Titular(es): University Of Medicine And Dentistry Of New Jersey

(72) Inventor(es): Daniel Fine, Narayanan Ramasubbu

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2008051165 de 16/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/089234de 24/07/2008



"COMPOSIÇÃO PARA A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA CAVIDADE ORAL, MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS NA CAVIDADE ORAL, MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE CÁRIES DENTÁRIAS, DE DOENÇA PERIODONTAL, E DE PLACA DENTÁRIA, E PARA O TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO DA CAVIDADE ORAL ASSOCIADA COM A PRESENÇA DE PLACA DENTÁRIA, E, PROTEÍNA DE FUSÃO"

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

Este pedido reivindica prioridade para o pedido provisório americano de número US 60/880.753, depositado em 16 de janeiro de 2007, a apresentação do qual é incorporada aqui como referência na sua integridade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Durante muitos anos pesquisadores têm tentado desenvolver agentes quimioterapêuticos que possam ser úteis no combate de infecções em uma cavidade oral. De volta a meados dos anos 44, com a introdução de antibióticos ficou claro que apesar de todos estes agentes potentes terem o potencial de serem eficazes, problemas cônicos na cavidade oral interferiam com a sua utilidade. Com o passar do tempo, o desenvolvimento de placas bacterianas na cavidade oral tornou-se melhor entendido. Com aquele melhor entendimento, ficou claro que os agentes administrados na cavidade oral necessitavam ser aderidos aos tecidos orais para resistirem à remoção através dos fluxos de saliva e das forças de mastigação oral. Tornou-se largamente aceito que para que os agentes anti- microbianos se tornassem eficazes na cavidade oral, o agente necessitava ser mantido naquele ambiente ao longo do tempo. Uma experiência que ilustra este princípio comparou a eficácia de dois agentes anti-microbianos importantes, tetraciclina e penicilina. A penicilina mostrou ser um agente potente quando comparada com a tetraciclina quando testada in vitro. Assim sendo, foi demonstrado que a penicilina era eficaz contra bactérias orais em concentração significativamente menor, quando

comparada com a tetraciclina, quando testada contra o crescimento da bactéria em um meio de caldo (1 μg/ml para penicilina contra 10 - 20 μg/ml para a tetraciclina). Além disso, a penicilina é um agente bactericida e portanto promove a morte das bactérias, enquanto que a tetraciclina é bacteriostática e portanto reduz o crescimento e o desenvolvimento bacteriano. No entanto, apesar destas dramáticas diferenças em potência, a tetraciclina prova ser um agente antimicrobiano mais eficaz quando aplicada topicamente na cavidade oral. Assim sendo, quando a tetraciclina é adicionada em um disco de hidroxilapatita revestido com saliva (SHA), um substituto para a superfície dos dentes/verniz, e então este homólogo dos dentes SHA é tratado com tetraciclina e lavado e então é colocado em uma cultura de bactérias, foi visto que muito pouco destes organismos foram capazes de se aderir ao SHA. Por outro lado, quando o SHA foi tratado de uma forma semelhante com penicilina, não havia nenhum efeito. Assim sendo, apesar da potência reduzida da tetraciclina quando comparada com penicilina, a tetraciclina era superior em um ensaio relativo à aderência e liberação de um fármaco de um análogo de dente revestido com saliva. Como as duas doenças dentárias mais comuns, cáries e doença periodontal, resultam de bactérias orais que se aderem na superfície dos dentes, os testes relativos à eficácia antimicrobiana na cavidade oral necessitam ser focados nas formas para se evitar ou reduzir o ataque das bactérias nas superfícies dos dentes.

Com aquele entendimento, a pesquisa no final dos anos 60 e no início dos anos 70 examinou agentes com a característica de substantividade, a habilidade de um agente de se ligar e ser liberado de uma superfície semelhante a um dente. Um dos primeiros agentes estudados que possuía esta característica era a clorexidina, um antimicrobiano bisbiguanida que mostrou, tanto in vitro como in vivo, que reduzia a adesão da placa bacteriana aos dentes. Os agentes conhecidos como Peridex® e Perioguard® foram investigados e atualmente são agentes de rinsagem oral da boca

disponíveis comercialmente que foram testados e mostraram adesão aos tecidos orais. Esta propriedade de substantividade combinada com a atividade antimicrobiana resulta na redução dos níveis, tanto de gengivite como de cáries, quando usados em estudos clínicos. Desde aquele tempo, houveram várias tentativas para se desenvolver agentes que trabalhem eficazmente na cavidade oral. Até então os testes clínicos têm demonstrado muito pouco sucesso. Um desses sucessos utilizou o agente, triclosan, o ingrediente ativo, na pasta de dentes Colgate Total®. Este dentifrício tem sido testado o suficiente para receber a aceitação das agências federais, tais como a ADA e a FDA. O dentifrício disponível comercialmente contendo triclosan é produzido pela Colgate Palmolive Company. A pasta de dentes Total foi desenvolvida utilizando-se um antimicrobiano conhecido, triclosan, um composto fenólico, que foi utilizado em xampus e desodorantes, e ligando o mesmo a um agente que permite que o mesmo se ligue nos tecidos orais. As principais companhias industriais, Procter Gamble, Unilever e Colgate palmolive Company, todas utilizaram o triclosan como um agente de eficiência possível na cavidade oral quase que na mesma época. Cada companhia tinha a sua própria estratégia que foi projetada para fazer com que o agente ativo, triclosan, se ligasse nos tecidos orais, de forma que fosse ativo contra a adesão de microorganismos orais nos dentes. Para confirmar isto verificou-se que o triclosan, por si próprio, não se ligava aos tecidos orais e portanto era ineficaz na cavidade oral, apesar das suas propriedades antimicrobianas potentes. A Colgate Palmolive Company misturou igicare ou gantrex com o triclosan para formar um composto polimérico que quando administrado na cavidade oral era ligado de tal forma que fazia com que o triclosan fosse eficaz. Este produto de combinação, além dos produtos contendo clorexidina e outros agentes contendo compostos fenólicos, estão entre os únicos agentes eficazes desenvolvidos nos últimos 40 anos.

As cáries são a única doença infantil crônica mais comum,

cinco vezes mais comum do que a asma. Mais de 70% das crianças acima de 17 anos têm cáries. Mais de 108 milhões de americanos carecem de seguro odontológico, de forma que o tratamento desta infecção não existe. S. mutans é considerado um dos micróbios mais associados com a cárie dentaria. Em estudos de crianças com periodontite juvenil localizada, agora conhecida como periodontite agressiva localizada, verificou-se que várias destas crianças tinham um mínimo de cáries. Além disso, verificou-se nestes estudos que as crianças com esta forma de doença periodontal tinham uma variante em uma proteína da saliva, a lactoferrina (Lf). quando esta variante Lf, a variante lisina, foi expressa em um vetor de inseto e testada verificou-se que ela matava o Streptococcus mutans. Ao contrário, outra variante mais comum de Lf, a variante arginina, presente em crianças saudáveis sem doença periodontal, tinham pouco ou nenhum efeito na sobrevivência dos S. mutans.

Recentemente, nós demonstramos que um peptídeo sintético com a forma de lisina desta proteína de lactoferrina mata o Streptococcus mutans. Outros demonstraram que os peptídeos de lactoferrina tinham atividade antimicrobiana, mas ninguém até agora demonstrou que a atividade antibacteriana derivada deste peptídeo é útil contra organismos na cavidade oral. Nós também determinamos que o peptídeo terá uma utilidade limitada na cavidade oral a não ser que seja ligado a alguma coisa que permita que o peptídeo se ligue na superfície do dente. Assim sendo, nós desenvolvemos um peptídeo de fusão no qual o peptídeo ativo é ligado a um pequeno peptídeo de saliva, Estaterina, de forma que ele possa reter tanto a sua atividade antimicrobiana como também ser retido na superfície dos dentes para reduzir a ligação de S. mutans naquela superfície.

A Lactoferrina (Lf) é uma proteína multifuncional que é encontrada na secreção mamária, nas lágrimas e na saliva, e no trato gastrintestinal. A sua função principal é capturar o ferro ao redor para evitar que os micróbios orais atinjam o ferro, um mineral necessário para a

sobrevivência. Além disso, no seu término N, a Lf tem uma região que tem propriedades antimicrobianas. Esta região é chamada de região defensina e foi demonstrado desde 1980 que a Lf pode matar vários tipos de bactérias, incluindo bactérias orais. Também foi demonstrado que dentro da região do término N, da posição de aminoácidos 11 a 31, pelo menos existem duas formas polimórficas. Na maior parte, a variação nesta região defensina na posição 29 de aminoácidos pode conter arginina ou lisina. Então recentemente em 1998, foi demonstrado que estas duas variantes na posição 29 de aminoácidos tinham atividades antimicrobianas diferentes e que os peptídeos designados com aquelas formas podiam ter atividade antimicrobiana. De fato, em 2003 o nosso grupo produziu lactoferrina com comprimento integral secretada por células de insetos. Esta lactoferrina secretada foi produzida com duas formas polimórficas (lisina e arginina) e foi introduzida através de um vetor baculovirus. A proteína secretada tinha todas as propriedades características da lactoferrina humana e nós testamos estas duas formas em relação à atividade contra organismos Gram+ e Gram-. Verificou-se que a forma de lisina era mais ativa contra uma faixa de organismos Gram+ e Gram-, e especificamente, mais ativa contra o S. mutans, a causa conhecida das cáries dentárias. Como a forma de lisina da Lf foi encontrada com mais freqüência em pacientes que tinham periodontite agressiva localizada (LAP), uma doença na qual as crianças têm menos cáries do que os controles combinados, nós especulamos que esta forma de lisina da lactoferrina poderia produzir uma vantagem ecológica para estas crianças, o que poderia explicar a redução de cáries vista nestas crianças. Além disso, nós então determinamos que a lactoferrina pura teria uma utilidade limitada a na cavidade oral, a não ser que ela fosse ligada a alguma coisa que permitisse que ela se ligasse na superfície dos dentes. A estaterina é uma fosfoproteína pequena da saliva encontrada na saliva em concentrações de 200 μg/ml na saliva estimulada mas em concentrações em torno de dez vezes menor em saliva não estimulada. A

adsorção das proteínas salivares sobre o verniz forma um revestimento de película de verniz no qual as bactérias na boca se aderem formando os componentes bacterianos iniciais da placa. As proteínas salivares iniciais que são adsorvidas são as mucinas, amilase, IgA, lisozima, cistatinas, proteínas ricas em prolina acidulada (PRPs), e aglutininas. A adsorção de película no verniz ou nas superfícies de hidroxilapatita (HA) promove a aderência do S. mutans. Ao contrário, as proteínas salivares, como a estaterina e as histaninas parecem ter o efeito oposto, e portanto inibem a adesão do S. mutans (Gibbons and Hay 1989). A estaterina é uma fosfoproteína rica em tirosina contendo 43 aminoácidos (Hay and Moreno 1989). A Estaterina é mais notada por sua habilidade para reduzir a formação de cálculos através da ligação com cálcio (Hay and Moreno 1987). Recentemente, Shimotoyodeme et al (2006) sugeriram que a estaterina compete com proteínas salivares de alto peso molecular para reduzir a ligação do S. mutans na superfície dos dentes. Eles demonstraram ainda que um peptídeo pequeno consistindo dos 26 primeiros aminoácidos também tem esta capacidade. Até agora, não existe nenhuma evidência que determine se estes resíduos de aminoácidos podiam se ligar a outra proteína salivar ou se uma proteína de fusão consistindo de estaterina e lactoferrina reteria ainda a sua habilidade para competir com outras proteínas salivares por um espaço na superfície dos dentes. Além disso, não se sabe se um peptídeo de fusão que contém estaterina seria retido sobre o verniz e se este peptídeo de fusão reteria a sua atividade antimicrobiana.

É descrito aqui um peptídeo de fusão no qual o peptídeo anti-bacteriano (na forma de lactoferrina) é ligado a um pequeno peptídeo salivar (estaterina) que permite que o peptídeo antibacteriano se ligue na superfície dos dentes e portanto interfira com a habilidade do S. mutans de se ligar na superfície dos dentes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é direcionada para o tratamento de doenças odontológicas causadas por bactéria oral, utilizando proteínas de fusão de lactoferrina e estaterina, e composições constituídas pelas mesmas.

Em certas realizações, a presente invenção é direcionada para uma composição para a inibição do crescimento bacteriano na cavidade oral, constituída de uma proteína de fusão composta de uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula do mesmo de peptídeo funcionalmente equivalente e um polipeptídio de estaterina ou molécula do mesmo de polipeptídeo funcionalmente equivalente.

Em outras realizações, a presente invenção é direcionada para uma proteína de fusão tendo SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; ou SEQ ID NO. 13, ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo. Ainda em outras realizações, a presente invenção é direcionada para uma composição constituída de uma proteína de fusão tendo uma SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; ou SEQ ID NO. 13, ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo.

Em outras realizações, a presente invenção é direcionada para um método de inibição de bactérias na cavidade oral, o tratamento ou prevenção de cáries nos dentes, o tratamento ou prevenção de doença periodontal, o tratamento ou prevenção de placas dentárias ou o tratamento de inflamação da cavidade oral associada com a presença de placas dentárias, através da administração de uma quantidade eficaz de uma composição constituída de uma proteína de fusão composta de uma forma de lisina e um polipeptídeo de lactoferrina ou de uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente da mesma, e um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente da mesma a um paciente necessitando do mesmo.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

FIGURA 1: Seqüências de peptídeo de lactoferrina, estaterina, e proteínas de fusão STAT-LF.

FIGURA 2: Ensaio de substantividade ilustrando a habilidade dos peptídeos de se ligarem na hidroxiapatita (HA) ou análogo dos dentes.

FIGURA 3: Ensaio de difusão mostrando que somente uma forma de lactoferrina possui atividade. Em todos os painéis, o círculo é um disco de papel de filtro impregnado com agentes diferentes (PBS = solução salina tamponada com fosfato que é um controle); LF "R" = a 11 mero de lactoferrina com arginina (R) na posição 29 de aminoácido; LF "K" a 11 mero de lactoferrina com lisina (K) na posição 29 de aminoácido. O disco contendo uma concentração padrão de um dos agentes é colocado sobre uma cultura de confluente de Streptococcus mutans. Uma zona clara ao redor dos discos mostra que o agente foi difundido no meio agar e inibiu o crescimento da cultura de S. mutans e portanto indica que existe uma atividade antibacteriana e que o S. mutans não pode crescer naquela área.

Painel na esquerda: Disco impregnado com PBS = controle não mostrando nenhuma inibição.

Painel do centro: Disco impregnado com a variante arginina de lactoferrina não mostrando nenhuma zona clara e portanto nenhuma inibição de S. mutans.

Painel da direita: disco impregnado com a variante de lisina de uma lactoferrina mostrando uma zona clara indicando que o agente foi difundido para dentro do agar e está inibindo o crescimento de S. mutans.

FIGURA 4: Ensaio de difusão mostrando que o peptídeo de fusão mais ativo é o LF e a estaterina 6 mero. São apresentados 5 painéis, cada um deles avaliando a atividade do agente testado.

Em todos os painéis, o círculo é um disco impregnado com agentes diferentes. O disco é colocado sobre uma cultura confluente de

Streptococcus mutans. Uma zona clara ao redor dos discos mostra que há uma atividade antibacteriana e que o S. mutans não cresce naquela área.

Painel a esquerda no topo: lactoferrina (11mer) onde a lisina está presente. Esta formulação inibe o crescimento de S. mutans visto como uma zona clara ao redor do disco.

Os painéis do lado direito no meio e no topo são dois peptídeos de estaterina, um 6 mero e um 15 mero. Em nenhuma destas formulações há qualquer atividade antibacteriana vista pelo fato de que não é vista nenhuma zona de inibição adjacente ao disco.

Painel do fundo a esquerda: Lactoferrina 11 mero notada como fundida com LF na Estaterina 6 mero. Esta proteína de fusão retém a atividade da lactoferrina 11 mero.

Painel do fundo a direita: Lactoferrina 11 mero notada como fundida com LF na Estaterina 15 mero. Esta proteína de fusão tem menos atividade do que quando a LF é fundida na Stat 6 mero.

Os dois painéis no fundo mostram o nível de interferência quando o LF é adicionado nas duas estaterinas. A atividade do LF quando o peptídeo de estaterina menor é fundido no seu maior, é comparado com quando o peptídeo maior é fundido com o LF.

FIGURA 5: Recuperação de S. mutans dos quadrados de SHA depois de 2h de tratamento com peptídeo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a composições para a inibição da formação de colônias bacterianas. Para fins desta invenção, o termo "inibição" significa reduzir ou provocar a morte de bactérias existentes, ou impedir novos crescimentos bacterianos. A invenção é também para um tratamento terapêutico oral que inibe a formação de colônias bacterianas na cavidade oral, dessa forma reduzindo a quantidade de placas e cáries dentárias. Uma realização da invenção é uma proteína de fusão

substancialmente purificada consistindo de lactoferrina e estaterina (STAT-LF). Na figura 1 são apresentadas seqüências nucleicas e de aminoácidos para a STAT-LF. Em geral, "purificado" refere-se a uma proteína ou a uma composição de peptídeo que foi submetido a fracionamento para a remoção de vários outros componentes, e cuja composição retém substancialmente a sua atividade biológica expressada. Quando o termo "substancialmente purificado" é utilizado, esta designação se refere a uma composição na qual a proteína ou peptídeo forma o componente principal da composição, como constituindo cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95% ou mais das proteínas na composição. Em certas realizações, a proteína ou polipeptídio da invenção poderá ser ligada operativamente a uma segunda seqüência de polipeptídeo.

Moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes

Certas realizações da invenção incluem moléculas de ácido nucleico que são equivalentes funcionais de toda ou de parte da seqüência STAT-LF. (uma molécula de ácido nucleico poderá também ser referida como uma seqüência de DNA ou uma seqüência de nucleotídeo nesta solicitação. Todos estes termos têm o mesmo significado que a molécula de ácido nucleico). Moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes são DNA e RNA (como moléculas de DNA genômico, DNA complementar, DNA sintético, e RNA mensageiro) que codificam os peptídeos tendo a mesma atividade semelhante à STAT-LF que o peptídeo STAT-LF mostrado na figura 1. Moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes podem codificar peptídeos que contêm uma região tendo uma identidade de seqüência com uma região de um peptídeo STAT-LF ou, mais de preferência, o peptídeo inteiro de STAT-LF. As mutações descritas nesta solicitação, de preferência, não destroem a estrutura de leitura da seqüência de codificação. As moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes às seqüências de STAT-LF podem ocorrer em várias formas, conforme descrito abaixo.

As moléculas de ácido nucleico poderão codificar alterações conservativas de aminoácido no peptídeo STAT-LF. Certas realizações da invenção incluem moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes que codificam alterações conservativas de aminoácido dentro de uma seqüência de aminoácido STAT-LF e produzem alterações silenciosas de aminoácidos no STAT-LF.

As moléculas de ácido nucleico poderão codificar substituições não conservativas de aminoácidos, adições ou eliminações no peptídeo de STAT-LF. Algumas realizações da invenção incluem moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes que fazem alterações não conservativas de aminoácidos dentro da seqüência de aminoácido STAT-LF (figura 1). As moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes incluem DNA e RNA que codificam peptídeos, peptídeos e proteínas tendo substituições não conservativas de aminoácidos (de preferência, substituição de um aminoácido quimicamente semelhante), adições, ou eliminações mas as quais também retém a mesma ou uma atividade semelhante à STAT-LF que o peptídeo STAT-LF. O DNA ou o RNA podem codificar fragmentos de variantes de STAT-LF. A atividade STAT-LF ou semelhante à STAT-LF de tais fragmentos e variantes é identificada por ensaios conforme descrito abaixo. Os fragmentos e variantes de STAT-LF cobertos pela presente invenção, de preferência, devem ter pelo menos cerca de 40%, 60%, 80% ou 95% de identidade de seqüência com os ácidos nucleicos STAT-LF que codificam a molécula, ou uma região da seqüência, como a seqüência de codificação ou um dos domínios conservados da molécula de ácido nucleico.

As moléculas de ácido nucleico funcionalmente equivalentes à molécula STAT-LF na figura 1 ficarão aparentes a partir da descrição que se segue. Por exemplo, a seqüência mostrada na [figura 1 (d)] poderá ter o seu comprimento alterado através de mutações naturais ou artificiais, como uma inserção ou eliminação parcial de nucleotídeo, de forma que quando o

comprimento inteiro da seqüência de codificação na [figura 1 (d)] é considerado como 100%, a molécula de ácido nucleico funcionalmente equivalente, de preferência, tem um comprimento de cerca de 60 - 120% da mesma, mais de preferência, cerca de 80 - 110% da mesma. Os fragmentos poderão ser menos de 60%.

Moléculas de ácido nucleico contendo mutações naturais ou artificiais parciais (usualmente 80% ou menos, de preferência, 60% ou menos, mais de preferência, 40% ou menos do comprimento inteiro) de forma que alguns códons nestas seqüências codificam aminoácidos diferentes, mas onde o peptídeo resultante retém a mesma ou uma atividade semelhante à STAT-LF. Os DNAs mutados criados desta forma, de preferência, devem codificar um peptídeo tendo pelo menos cerca de 40%, de preferência, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 80%, e mais de preferência, pelo menos cerca de 90% ou 95% de identidade de seqüência com a seqüência de aminoácido do peptídeo STAT-LF na [Figura 1 (d)].

Como o código genético é degenerado, a seqüência de ácido nucleico na [Figura 1 (d)] não é a única seqüência que poderia ser codificada por um peptídeo tendo a atividade do STAT-LF. Esta invenção inclui moléculas de ácido nucleico que têm a mesma informação genética essencial que aquela da molécula de ácido nucleico descrita na [Figura 1 (d)]. As moléculas de ácido nucleico (incluindo RBA) tendo uma ou mais alterações de ácido nucleico das seqüências descritas nesta solicitação e que resultam na produção de um peptídeo mostrado na [Figura 1 (d)] estão dentro do escopo de várias realizações da invenção.

Outras formas funcionais equivalentes dos ácidos nucleicos de codificação de STAT-LF podem ser isoladas utilizando-se técnicas convencionais de hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA. Assim sendo, certas realizações da presente invenção também incluem moléculas de ácido nucleico que são hibridizadas em uma ou mais das seqüências nas [Figura 1

(d)] ou na sua seqüência complementar, e que codificam a expressão de peptídeos, peptídeos e proteínas que apresentam a mesma ou uma atividade semelhante àquela do peptídeo STAT-LF produzido pelo DNA na [Figura 1 (d)] ou nas suas variantes. Tais moléculas de ácido nucleico, de preferência, são hibridizadas na seqüência na [Figura 1 (d)] sob condições moderadas a altamente rigorosas (ver Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Most Recent Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). As lavagens altamente rigorosas possuem baixo teor de sal (de preferência, em torno de 0,2% de SSC), e as lavagens com baixo rigor possuem alto teor de sal (de preferência, em torno de 2% de SSC). Uma temperatura em torno de 37°C ou cerca de 42°C é considerada de baixo rigor, e uma temperatura de cerca de 50 - 65°C. é de alto rigor. Algumas realizações da invenção também incluem um método de identificação de moléculas de ácido nucleico que codificam um peptídeo ativador de STAT-LF (de preferência, um peptídeo de mamífero), incluindo o contato de uma amostra contendo moléculas de ácido nucleico, incluindo toda ou parte da [Figura 1 (d)] (de preferência, pelo menos cerca de 13 a 20 de nucleotídeos da [Figura 1 (d)] sob condições de hibridização moderadas a altamente rigorosas, e identificando as moléculas de ácido nucleico que são hibridizadas em moléculas de ácido nucleico incluindo todos ou parte da [Figura 1 (d)]. São descritos métodos semelhantes na patente americana de número 5.851.788.

Certas realizações da presente invenção também incluem métodos de utilização de todas ou de parte das moléculas de ácido nucleico que são hibridizadas em todas ou em parte da [Figura 1 (d)], por exemplo, como sondas ou em ensaios para a identificação de antagonistas ou inibidores dos peptídeos produzidos pelas moléculas de ácido nucleico (descritos abaixo). Algumas realizações da presente invenção incluem métodos de utilização de moléculas de ácido nucleico tendo identidade de seqüência com a molécula de ácido nucleico de STAT-LF (conforme descrito abaixo) em

métodos semelhantes.

Certas realizações da invenção também incluem um kit de detecção de molécula de ácido nucleico, de preferência, em um meio de recipiente adequado ou ligado a uma superfície, uma molécula de ácido nucleico conforme apresentado aqui modificando o STAT-LF da [Figura 1 (d)] ou um peptídeo tendo a atividade STAT-LF e um reagente de detecção (como um marcador detectável).

Composições farmacêuticas e métodos de tratamento

O STAT-LF é também útil quando combinado com um veículo em uma composição farmacêutica. As composições são úteis quando administradas em métodos de tratamento médico ou profilaxia de uma doença, distúrbio ou estado físico anormal provocado pelo S. mutans. Certas realizações da invenção também incluem métodos de tratamento médico de uma doença, distúrbio ou estado físico anormal caracterizado pelo excesso de S. mutans, por exemplo, através da administração de uma composição farmacêutica que inclui um veículo e STAT-LF. Cáries são um exemplo de uma doença, que pode ser tratada ou evitada através da administração de STAT-LF [Figura 1 (d)]. As composições também são úteis quando administradas em métodos de tratamento médico ou profilaxia de uma doença, distúrbio ou estado físico anormal provocado por outra placa dentária gerando bactérias Gram+ ou Gram- incluindo, mas não limitado a Actinomyces spp. e outros Streptococci spp.

As composições farmacêuticas podem ser administradas a seres humanos ou animais através de métodos, tais como em alimentos, aditivos alimentares, dentifrícios, géis, pasta de dentes, loções bucais, fio dental, lavagem de dentadura, adesivos de dentadura, goma de mascar, doces, biscoitos, refrigerantes ou bebidas esportivas em métodos de tratamento médico. O STAT-LF poderá ser acoplado à lipídios ou carboidratos. Isto aumenta a sua habilidade de adesão aos dentes, prolongando a duração da

adesão ou aumentando a sua afinidade, ou ambos. Eles também poderão ser acoplados a polímeros, por exemplo, em trabalho dentário (por exemplo, coroas, aparelhos dentários, obturações) ou em fio dental. As composições farmacêuticas podem ser administradas para seres humanos ou animais. As dosagens a serem administradas dependem da condição individual do paciente, da indicação do fármaco, da estabilidade física e química do fármaco, da toxidez do efeito desejado e da rota escolhida de administração (Robert Rakel, ed., Conn's Current Therapy (1995, W.B. Saunders Company, USA). As composições farmacêuticas são utilizadas para o tratamento de doenças provocadas por placas dentárias formando infecções bacterianas, tais como cáries dentárias, doença periodontal e endocardite. Em uma realização preferida, as composições farmacêuticas são utilizadas para o tratamento de doenças provocadas por Actinomyces spp. e Streptococci spp. Em uma outra realização preferida, as composições farmacêuticas são utilizadas para o tratamento de doenças conforme é usado para tratamento de infecções de Streptococci causadas, mas não limitadas por: S. mutans, S. sobrinus, S. oralis, S. sanguis, S. mitis, S. gordonii, S. pneumonide, S. pyogenes, e S. agalactiae.

As moléculas de ácido nucleico e os STAT-LF [Figura 1 (d)] poderão ser introduzidos nas células utilizando-se veículos de administração in vivo como lipossomas. Eles também poderão ser introduzidos nestas células utilizando técnicas físicas, tais como microinjeção e eletroporação ou métodos químicos, tais como a coprecipitação ou a utilização de lipossomas. Em alguns casos, será desejável utilizar-se lipossomas direcionadas para a bactéria de interesse.

Em uma realização preferida, as composições farmacêuticas de acordo com a invenção são preparadas utilizando-se um ou mais peptídeos STAT-LF capazes de inibirem a formação de biofilme na placa dentária que é associada com a bactéria.

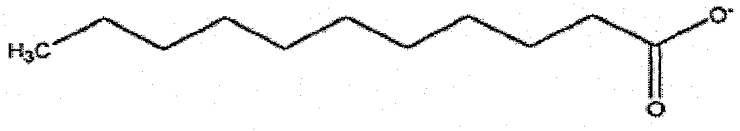
As composições farmacêuticas constituídas de peptídeos STAT-LF são especialmente úteis para métodos de tratamento ou prevenção (profilaxia) de uma doença, distúrbio ou estado físico anormal provocado por infecção de Streptococci. Tais composições farmacêuticas são especialmente úteis para o tratamento de infecções por uma ou mais bactérias orais de Streptococci, tais como S. mutans, S. sobrinus, S. oralis, S. sanguis, S. mitis, ou S. gordonii. As composições farmacêuticas também são úteis para tratamento e prevenção de outros tipos de infecções por Streptococci, tais como S. pneumoniae, S. pyogenes, e S. agalactiae.

As composições farmacêuticas podem ser preparadas através de métodos conhecidos para a preparação de composições farmaceuticamente aceitáveis, que podem ser administradas a pacientes, de tal forma que uma quantidade eficaz de molécula de ácido nucleico ou peptídeo é combinada em uma mistura com um veículo farmaceuticamente aceitável. Veículos aceitáveis são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa, USA). Os veículos incluem solução salina e D5W (5% de dextrose e água). Excipientes incluem aditivos, tais como uma solução tampão, solubilizante, tensoativo, agente de colocação em suspensão, agente emulsificante, agente de controle de viscosidade, sabor, carga de lactose, antioxidante, conservante ou corante. Existem excipientes preferidos para a estabilização de peptídeos para a administração parenteral e outras. Os excipientes incluem albumina de soro, ácido glutâmico ou aspártico, fosfolipídios e ácidos graxos.

Em outras realizações preferidas, são incluídos tensoativos nas composições para auxiliar a penetração no biofilme. Os tensoativos que poderiam ser utilizados na presente invenção, geralmente incluem tensoativos aniônicos farmaceuticamente aceitáveis, tensoativos catiônicos, tensoativos anfotéricos (anfipático/anfofilico), e tensoativos não iônicos. Os tensoativos

aniônicos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, por exemplo, alquil carboxilatos monovalentes, acil lactilatos, alquil éter carboxilatos, N-acil sarcosinatos, alquil carbonatos polivalentes, N- acil glutamatos, condensados de ácido graxo-polipeptídio, ésteres de ácido sulfúrico, alquilsulfatos (incluindo laurilsulfato de sódio (SLS)), alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos ligados a éster (incluindo sódio docusato ou dioctil succinato de sódio (DSS)), alfa olefina sulfonatos, e álcoois etoxilados fosfatados. Tais tensoativos catiônicos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, por exemplo, sais de monoalquil amônio quaternário, compostos de dialquil amônio quaternário, amidoaminas e aminoimidas. Tensoativos anfotéricos farmaceuticamente aceitáveis adequados (anfipático/anfofílico), incluem, por exemplo, alquil amidas N- substituídas, N-alquil betaínas, sulfobetaínas, e N-alquil beta-aminopropionatos.

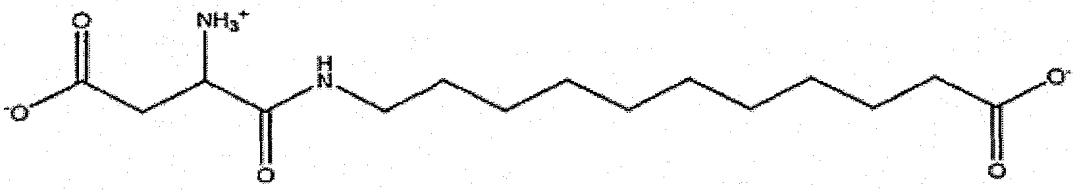
Em realizações preferidas, é utilizado o laurilsulfato de sódio. Em realizações ainda mais preferidas, a composição é constituída de cerca de 1 a cerca de 10%, cerca de 0,3 a cerca de 5%, ou cerca de 0,5 a cerca de 2% em volume de laurilsulfato de sódio. Alternativamente, uma seqüência substituída em um dos resíduos de lisina que incorpora atividades que produzem atividades como laurilsulfato de sódio, poderão ser inseridas no peptídeo de fusão. Por exemplo, a cadeia lateral de Lys poderá ser modificada com o ácido undecanóico: isto introduzirá uma cadeia alquila longa semelhante ao radical dodecila em SLS.



A cadeia lateral de Lys também poderá ser modificada com o ácido aminoundecanóico: isto introduzirá uma cadeia alquila longa semelhante ao radical dodecila em SLS e uma carga positiva (NH_2) no final.



A cadeia lateral Lys também poderá ser modificada, por exemplo, com o ácido aminoundecanóico e o ácido aspártico acoplado no final para introduzir um íon dipolar no final.



Baseado nisto, as composições farmacêuticas poderiam incluir um composto ativo ou substância, como um peptídeo STAT-LF, associado com um ou mais veículos ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis, e contido em soluções tamponadas com um pH adequado e iso-osmótico com os fluidos fisiológicos. Um veículo farmacêutico dependerá da rota pretendida de administração. Métodos de combinação das moléculas ativas com os veículos ou combinação dos mesmos com diluentes são bem conhecidos por aqueles adestrados na técnica. As composições poderão também conter aditivos, tais como antioxidantes, soluções tampão, bacteriostáticos, e antibióticos bactericidas e solutos que fazem com que a formulação se torne isotônica no recipiente pretendido; e suspensões aquosas e não aquosas estéreis que poderão incluir agentes de colocação em suspensão e agentes espessantes. A composição poderia incluir um agente de direcionamento para o transporte do composto ativo para sítios especificados.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem ser administradas através de qualquer rota adequada conhecida na técnica. Nos casos em que a infecção é localizada, a composição farmacêutica pode ser administrada topicamente na área infectada. Nos casos onde a infecção é sistêmica, a composição farmacêutica poderá ser administrada oralmente, intravenosamente, ou parenteralmente.

Em alguns casos, poderá ser desejável administrar-se as composições farmacêuticas de acordo com a invenção com um agente antibacteriano conhecido, como um antibiótico. Em alguns casos, as composições farmacêuticas que reprimem a formação do biofilme são também úteis para fazer com que as células bacterianas sejam mais suscetíveis a antibióticos.

O termo "antibiótico" utilizado aqui refere-se a qualquer composto conhecido pela pessoa com conhecimento normal na técnica que inibe o crescimento, ou mata a bactéria. O termo "antibiótico" inclui, mas não é limitado a, beta-lactamas (penicilinas e cefalosporinas), vancomicinas, bacitracinas, macrolídeos (eritromicinas), lincosamidas (clindomicina), cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglicosídeos (gentamicinas), anfotericinas, cefazolinas, clindamicinas, mupirocinas, sulfonamidas e trimetoprima, rifanpicinas, metronidazolas, quinolonas, novobiocinas, polimixinas, gramicidinas ou quaisquer sais ou variantes dos mesmos. O antibiótico usado dependerá do tipo de infecção bacteriana.

Uma dosagem terapeuticamente eficaz das composições farmacêuticas de acordo com a invenção dependerá do tipo e da severidade da infecção e se a composição farmacêutica é constituída de um outro ingrediente ativo, como um antibiótico. Geralmente, a dose terapeuticamente eficaz é a quantidade mínima suficiente para controlar a formação do biofilme ou cárie dentária e que não é tóxico para o ser humano ou animal tratado. Métodos para a determinação das dosagens eficazes e da toxidez são conhecidos na técnica.

De acordo com outro aspecto da presente invenção, é apresentado um processo para produção de células geneticamente modificadas para a produção de peptídeos STAT-LF que inibem a formação de biofilme ou cárie dentária. Outro aspecto constitui a administração a um paciente de células geneticamente modificadas para a produção de peptídeos STAT-LF

que inibem a formação de biofilme ou cáries dentárias.

Um outro aspecto da presente invenção apresenta o uso na preparação de um medicamento para a administração a um paciente mamífero para melhorar a saúde oral ou para aliviar cáries dentárias de células transfectadas viáveis, geneticamente modificadas, para produção de peptídeos STAT-LF que inibem a formação de biofilme.

Composições antimicrobianas

Os peptídeos STAT-LF descritos acima para o uso na preparação de composições farmacêuticas também podem ser utilizados para a preparação de composições antimicrobianas, tais como uma solução líquida desinfetante. Tais soluções poderão ainda ser constituídas de antimicrobianos ou antifungos, tais como álcool, solução de povidona-iodo e antibióticos, assim como conservantes. Estas soluções podem ser utilizadas, por exemplo, como desinfetantes da pele ou da área ao redor antes da inserção ou do implante de um dispositivo como um cateter, um fixador de cateter e/ou soluções de lavagem, como rinsagens antissépticas para qualquer dispositivo médico, incluindo, mas não limitado a componentes de cateter, tais como agulhas, conectores Leur-Lok, conectores sem agulha e cubos, assim como outros dispositivos de implante. Estas soluções também podem ser utilizadas para o revestimento ou desinfecção de instrumentos cirúrgicos, incluindo, mas não limitado a, grampos, forceps, tesouras, prendedores da pele, tubos, agulhas, retratores, escamadores, perfuradores, cinzéis, raspadores e serras.

As composições antimicrobianas para a inibição da formação de biofilme poderão ser constituídas de qualquer peptídeo, peptídeos anti-sentido e anticorpos STAT-LF descritos acima.

Uma composição antimicrobiana poderá ainda ser constituída de ingredientes adicionais, incluindo mas não limitados a: um tensoativo, um anti-séptico e um antibiótico (ver os exemplos listados acima).

Produção de STAT-LF em células eucariótica e procarióticas

As moléculas de ácido nucleico apresentadas aqui poderão ser obtidas a partir de uma coleção de cDNA. As moléculas de nucleotídeo também podem ser obtidas de outras fontes conhecidas na técnica, tais como pela análise direcionada de seqüência expressada de síntese in vitro. O DNA descrito nesta solicitação (incluindo as variantes que são equivalentes funcionais) podem ser introduzidos e expressos em uma variedade de células hospedeiras eucarióticas e procarióticas. Uma molécula recombinante de ácido nucleico para o STAT-LF contém elementos adequados reguladores transcricionais ou translacionais ligados operativamente. Os elementos regulatórios adequados são derivados de várias fontes, e eles poderão ser rapidamente escolhidos por alguém com conhecimento normal na técnica (Sambrook, J. Fritsch, E. EW. & Maniatis, T. (Edição mais recente). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York; Ausubel et al. (Edição mais recente). Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc.). Por exemplo, se uma pessoa necessita supra-regular a expressão da molécula de ácido nucleico, ela poderia inserir uma seqüência de sentido ou silenciar o RNA e o promotor apropriado no vetor. Os promotores podem ser induzíveis ou constitutivos, regulados e ambientalmente ou em desenvolvimento, ou específicos de célula ou de tecido. A transcrição é aumentada com os promotores conhecidos na técnica para a expressão. Os promotores CMV e SV40 são utilizados comumente para expressarem os peptídeos desejados em células. Outros promotores conhecidos na técnica também poderão ser utilizados (vários promotores e vetores adequados são descritos nas solicitações de patentes referidas nesta solicitação).

Se uma pessoa deve infra-regular a expressão da molécula de ácido nucleico, ela poderia inserir a seqüência anti-sentido e o promotor apropriado no veículo. Uma molécula de ácido nucleico poderá ser isolada de

uma fonte nativa (em orientações de sentido ou anti-sentido), sintetizada, ou ela poderá ser uma seqüência nativa mutada ou sintética ou uma combinação destes.

Exemplos de elementos regulatórios incluem um promotor de transcrição e de melhoria ou uma seqüência de ligação de polimerases RNA, uma seqüência de ligação ribossomal, incluindo um sinal de iniciação de translação. Adicionalmente, dependendo do vetor utilizado, outros elementos genéticos, tais como marcadores selecionáveis poderão ser incorporados na molécula recombinante. Outras regiões regulatórias que poderiam ser utilizadas incluem um domínio promotor e uma região de terminação. Os elementos regulatórios poderão ser de origem bacteriana, de fungos, viral ou aviária. Da mesma forma, os elementos relatórios poderão ser originados de plantas, fermentos, insetos ou outras fontes, incluindo elementos produzidos sinteticamente e elementos mutados.

Além de se utilizar os vetores de expressão descritos acima, um peptídeo poderá ser expresso inserindo-se uma molécula de ácido nucleico recombinante em um sistema de expressão conhecido derivado de bactéria, vírus, fermento, mamífero, inseto, fungo ou pássaro. Uma molécula recombinante poderá ser introduzida nas células através de técnicas tais como a transformação mediada por Agrobacterium tumefaciens, transformação mediada por bombardeio de partícula, absorção direta, micro-injeção, co-precipitação, transfecção e eletroporação, dependendo do tipo de célula. Os vetores retrovirais, vetores adenovirais, vetores de vírus associados com Adeno (AAV), vetores de vírus DNA e lipossomas poderiam ser utilizados. Enxertos adequados são inseridos em um vetor de expressão, o qual poderá também incluir marcadores para a escolha das células transformadas. Um enxerto poderá ser inserido em um sítio criado pelas enzimas de restrição.

Em uma realização da invenção, uma célula é transfectada com uma molécula de ácido nucleico da invenção inserida em um vetor de

expressão para produzir células que expressam um peptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico.

Outra realização da invenção refere-se a um método de transfecção de uma célula com uma molécula de ácido nucleico apresentada aqui, em um vetor de expressão para produzir uma célula que expressam o peptídeo STAT-LF [Figura 1] ou outro peptídeo da invenção. De acordo com certas realizações da invenção, é apresentado um método para a expressão dos peptídeos apresentados em uma célula. Um processo preferido incluiria a cultura de uma célula incluindo um vetor DNA recombinante incluindo uma molécula de ácido nucleico que codifica o STAT-LF [Figura 1] (ou outra molécula de ácido nucleico da invenção) em um meio de cultura, de forma que o peptídeo é expresso. O processo, de preferência, inclui ainda a recuperação do peptídeo das células ou do meio de cultura.

Sondas

Certas realizações da presente invenção incluem sondas de oligonucleotídeos feitas a partir das moléculas clonadas do peptídeo STAT-LF descritas nesta solicitação ou de outras moléculas de ácido nucleico apresentadas aqui (ver a seção de materiais e métodos). As sondas poderão ter 15 a 20 peptídeos no comprimento. Uma sonda preferida tem pelo menos 15 peptídeos do STAT-LF na [figura 1]. Certas realizações da invenção também incluem pelo menos 15 nucleotídeos consecutivos da [figura 1]. As ondas são úteis para identificar os ácidos nucleicos que codificam os peptídeos STAT-LF assim como os peptídeos funcionalmente equivalentes a STAT-LF. As sondas de oligonucleotídeos são capazes de hibridização da seqüência mostrada na [figura 1] sob condições de hibridização rigorosa. Uma molécula de ácido nucleico que codifica um peptídeo apresentado aqui poderá ser isolada de outros organismos através da seleção de uma coleção sob condições de hibridização rigorosa moderadas a elevadas com uma sonda marcada. A atividade do peptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico

é avaliada pela clonagem e expressão do DNA. Depois do produto de expressão ser isolado, o peptídeo é testado em relação à atividade do STAT-LF conforme descrito nesta solicitação.

Moléculas de peptídeo STAT-LF funcionalmente equivalentes de outras células, ou cDNAs ou DNAs sintéticos de codificação de STAT-LF equivalente, também podem ser isoladas por amplificação utilizando-se métodos de reação em cadeia de polimerases (PCR). Os iniciadores de oligonucleotídeos, tais como os iniciadores degenerados, com base na [figura 1] podem ser preparados e utilizados com PCR e transcriptase reversa (E. S. Kawasaki (1990), em Innis et al, Eds., PCR Protocols, Academic Press, San Diego, capítulo 3, p. 21) para amplificar os DNAs equivalentes funcionais das coleções de cDNA ou genômico de outros organismos. Os oligonucleotídeos também podem ser utilizados como sondas para a seleção de coleções de cDNA.

Peptídeos funcionalmente equivalentes, peptídeos e proteínas

A presente invenção inclui não somente os peptídeos codificados pela seqüências apresentadas aqui, mas também os peptídeos funcionalmente equivalentes, peptídeos e proteínas que apresentam a mesma ou uma atividade semelhante ao peptídeo STAT-LF assim como miméticos (figura 1).

EXEMPLOS

MÉTODOS:

Foram executadas duas experiências diferentes para demonstrar a atividade antimicrobiana das substâncias testadas por nós. A primeira era um ensaio de escolha de difusão de disco que nós desenvolvemos no nosso laboratório. Naquele ensaio nós criamos uma cultura durante a noite de S. mutans em um caldo consistindo de soja tripticase e 20% de sacarose. As células foram cultivadas durante a noite e então germinadas em confluência em agar de Mitis Salivarius Bacitracin (MSB). Além disso, nós

utilizamos um disco de papel de filtro estéril de 25 cm e adicionamos 200 µl de saliva integral, a saliva contendo lisina ou a variante de arginina da lactoferrina, deixou-se esta saliva secar sobre o papel de filtro durante 1 hora e então colocou-se o papel de filtro contendo a proteína adicionada sobre o centro da cultura confluente de S. mutans sobre o agar MSB. Isto foi então deixado em incubação a 37°C durante 24h após o que, nós examinamos a placa em relação a uma zona de inibição do crescimento de S. mutans ao redor do disco de papel de filtro. Este ensaio foi utilizado para identificar a atividade antimicrobiana potencial.

O segundo conjunto de experiências consistiu do crescimento de uma cultura de estoque de S. mutans durante a noite em um caldo de soja de triticase contendo 20% de sacarose (TSBS) que deveria produzir aproximadamente 1 x 10^8 células por ml dentro de um período de 24h. Nós então centrifugamos intensamente esta cultura densa de forma que ela ficasse homogênea e então retiramos uma porção de 100 µl desta cultura e colocamos a mesma em um tubo novo contendo 9,8 ml de TSBS estéril no qual nós adicionamos 100 µl/ml de uma dose de 2 µg/ml de a) a variante de lisina de Lf, b) a variante de arginina de Lf, c) clorexidina [controle positivo], d) PBS [controle negativo]. Esta mistura foi deixada crescer durante a noite. Na manhã seguinte, foi removida uma porção de 100 µl e colocada sobre agar MSB, semeada sobre este agar que então é desenvolvido durante a noite e examinado no dia seguinte em relação a formação de colônias em unidades/ml. Este conjunto de experiências foi utilizado para comparar e quantificar a atividade antimicrobiana das variantes Lf por intermédio de padrões de crescimento standard MIC. Estas experiências também foram feitas misturando-se as culturas de bactérias e os agentes de teste durante 1 a 2h e então semeando-se durante a noite para se determinar a atividade do agente depois de um período de tempo de contato curto.

O terceiro conjunto de experiências utilizou o ensaio de

substantividade, que demonstra a habilidade dos peptídeos de se ligarem à hidroxiapatita (HA) (figura 4). Os resultados do ensaio são apresentados na figura 5.

Método para a síntese de peptídeo

O método utilizado para sintetizar os peptídeos envolve uma adição por etapas de aminoácidos protegidos que foram adicionados em uma partícula de resina sólida através de uma ligação covalente. O procedimento utiliza a química sintética Fmoc. O tempo médio de ciclo para uma adição de aminoácido levou cerca de 60 minutos. Os aminoácidos adicionados são protegidos. Os grupos de proteção, utilizados para proteger os grupos funcionais de cadeia lateral são ácidos lábeis, enquanto que a função amino N-terminal do aminoácido está protegida pelo grupo Fmoc que é vulnerável na base. A resina está na forma de contas porosas de 200 - 400 malhas que permite a penetração de reagentes na malha de gel. A adição dos aminoácidos é feita em um ambiente protegido e então os reagentes e os subprodutos são removidos através de filtração e recristalização. A cadeia de peptídeo cultivada é completamente protegida na fase sólida insolúvel. O peptídeo formado é idêntico às amostras preparadas pelo procedimento standard de éster p-nitrofenil.

RESULTADOS:

O ensaio de difusão de disco permite que proteínas específicas sejam adicionadas em um disco de papel de filtro através do que a proteína pode então ser difundida no agar para se determinar a atividade antimicrobiana. Foram adicionados no disco os seguintes peptídeos; R = forma arginina de Lf (figura 1 (a)). K = forma lisina de Lf (1 (a). PBS = solução salina tamponada de fosfato que é usada como a solução de controle e na qual é adicionado a forma R ou a forma K de Lf. Na figura 1 abaixo, nós adicionamos a forma R, ou a forma K em uma concentração de 1 μg/ml a 200 μl de PBS e então adicionamos a mesma na superfície de uma tira de papel de

filtro de 25 cm e deixamos que a tira secasse durante 1 hora. Nós então semeamos uma cultura de S. mutans para confluência sobre uma placa de agar de soja tripicase contendo 20% de sacarose e então colocamos o disco seco sobre o centro da placa. As culturas foram deixadas crescerem em um incubador regulado a 37°C e então foram avaliadas a 24 ou 48h depois da inoculação. Pode ser visto ao redor dos discos K uma zona de inibição, onde a variante de lisina foi colocada em suspensão em PBS, e no disco K, onde a lisina foi colocada em suspensão em saliva normal (que tinha uma atividade antibacterians antes da adição de K). Não foi vista nenhuma zona sobre o disco de R/PBS ou R/saliva, onde a variante de arginina foi substituída pela variante lisina (figura 3). A forma R e K do peptídeo Lf foi adicionada em uma concentração em torno de 15 µg/ml.

A figura 4 mostra que o ST6 e o ST15 não tem nenhuma atividade antimicrobiana. Na fileira do fundo da figura 4, da esquerda para a direita, pode ser visto que a formulação de LF11 (figura 1) inibiu o crescimento de S. mutans, visto como uma zona clara ao redor do disco. O LF fundido que é fundido na estaterina 6, esta proteína de fusão retém a atividade da lactoferrina 11 mero (figura 4). O Lf combinado com ST15, tem menos atividade do que a STAT-LF 6.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para a inibição do crescimento bacteriano na cavidade oral, caracterizada pelo fato de ser constituída de uma proteína de fusão composta de:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídio de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da proteína de fusão ser substancialmente purificada.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da composição ser ainda constituída de um excipiente farmaceuticamente aceitável.

4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da composição ser ainda constituída de um tensoativo, ou uma molécula tipo tensoativo.

5. Composição de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato do tensoativo ser lauril sulfato de sódio.

6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato do lauril sulfato de sódio estar presente em uma quantidade eficaz para permitir que a composição penetre no biofilme.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato da proteína de fusão ser ainda composta de uma seqüência adicional de polipeptídeo.

8. Composição de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato da composição ser uma forma de dosagem escolhida do grupo consistindo de um alimento, um aditivo alimentício, dentifrícios, géis, pasta de dentes, solução de lavagem bucal, fio dental, solução de lavagem de dentadura, adesivos de dentadura, goma de mascar, doces, tabletes de mascar

e solução.

9. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de ser ainda composta de um agente antibacteriano, um agente antimicrobiano, um agente antifungos ou uma combinação dos mesmos.

10. Método para a inibição de bactérias na cavidade oral, caracterizado pelo fato de constituir a administração de uma quantidade eficaz de uma composição composta de uma proteína de fusão compreendendo:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo

a um paciente necessitando do mesmo.

11. Método para o tratamento ou prevenção de cáries dentárias, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição constituída de uma proteína de fusão composta de:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo

a um paciente necessitando do mesmo.

12. Método para o tratamento ou prevenção de doença periodontal, caracterizado pelo fato de constituir a administração de uma quantidade eficaz de uma composição composta de uma proteína de fusão constituída de:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo

a um paciente necessitando do mesmo.

13. Método para o tratamento ou prevenção de placa dentária, caracterizado pelo fato de ser composto da administração de uma quantidade eficaz de uma composição constituída de uma proteína de fusão composta de:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo

a um paciente necessitando do mesmo.

14. Método para o tratamento de inflamação da cavidade oral associada com a presença de placa dentária, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma quantidade eficaz de uma composição composta de uma proteína de fusão constituída de:

i. uma forma de lisina de um polipeptídeo de lactoferrina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo; e

ii. um polipeptídeo de estaterina ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo

a um paciente necessitando do mesmo

15. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da proteína de fusão ser substancialmente purificada.

16. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da composição ser ainda constituída de um excipiente farmaceuticamente aceitável.

17. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da composição ser ainda constituída de um tensoativo, ou uma molécula tipo tensoativo.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato do tensoativo ser lauril sulfato de sódio.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato do lauril sulfato de sódio estar em uma quantidade eficaz para permitir que a composição penetre no biofilme.

20. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da composição ser administrada através de uma forma de dosagem escolhida do grupo consistindo de um alimento, um aditivo alimentício, dentifrícios, géis, pasta de dentes, soluções bucais, fio dental, solução de lavagem de dentadura, adesivos de dentadura, goma de mascar, doces, tabletes mastigáveis e solução.

21. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da composição ser ainda constituída de um agente antibacteriano, um agente antimicrobiano, um agente anti- fungos ou uma combinação dos mesmos.

22. Método de acordo com qualquer das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo fato da proteína de fusão ser ligada a uma seqüência adicional de polipeptídeo.

23. Composição para a inibição do crescimento bacteriano na cavidade oral, caracterizada pelo fato de ser constituída de uma proteína de fusão tendo uma SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; ou SEQ ID NO. 13, ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo.

24. Proteína de fusão, caracterizada pelo fato de ter uma SEQ ID NO. 10; SEQ ID NO. 11; ou SEQ ID NO. 13, ou uma molécula de peptídeo funcionalmente equivalente do mesmo.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> University of Medicine and Dentistry de Nova Jérsei
Fine, Daniel
Ramasubbu, Narayanan

<120> Polipeptídeos naturais para cuidado com a saúde oral
<130> 18622-22
<150> US 60/880,753
<151> 2007-01-16
<160> 13
<170> PatentIn version 3.4
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Peptídeo lactoferrina
<400> 1
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
1 5 10
<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> Peptídeo lactoferrina
<400> 2
ttccaatggc aaaggaatat gagaaaagtg cgt 33
<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Peptídeo lactoferrina
<400> 3
Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Arg Val Arg
1 5 10
<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Peptídeo estaterina
<400> 4
Asp Asp Asp Glu Glu Lys
1 5
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Peptídeo estaterina
<400> 5
gatgatgatg aagagaaa 18
<210> 6
<211> 18
<212> PRT

<213> Peptídeo estaterina
<400> 6
Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala
1 5 10 15
Ala Ala

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Peptídeo estaterina
<400> 7
Asp Asp Asp Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly
1 5 10 15
<210> 8
<211> 45
<212> DNA
<213> Peptídeo estaterina
<400> 8
gatgatgatg aagagaaatt tttgcgtaga attggaagat tcggt 45
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Peptídeo de fusão lactoferrina-Estaterina
<400> 9
Asp Asp Asp Glu Glu Lys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
1 5 10 15
Arg

<210> 10
<211> 51
<212> DNA
<213> Peptídeo de fusão lactoferrina-Estaterina
<400> 10
gatgatgatg aagagaaatt ccaatggcaa aggaatatga gaaaagtgcg t 51
<210> 11
<211> 51
<212> DNA
<213> Peptídeo de fusão lactoferrina-Estaterina
<400> 11
gatgatgatg aagaaaaatt ccaatggcaa aggaatatga gaaaagtgcg t 51
<210> 12
<211> 26
<212> PRT
<213> Peptídeo de fusão lactoferrina-Estaterina
<400> 12
Asp Asp Asp Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Gly Phe
1 5 10 15

Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg
20 25

<210> 13
<211> 45
<212> DNA
<213> Peptídeo de fusão lactoferrina-Estaterina
<400> 13
gatgatgatg aagagaaatt tttgcgtaga attggaagat tcggt 45

Figura 1: peptídeoS para o peptídeo de fusão ativo L f

a) peptídeo de lactoferrina (Lf) com o = LF11
Seqüências 21- 31 de aminoácidos

Forma ativa - FQWQRNMRKVR (SEQ ID NO. 1)
Seqüência DNA– TTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAAAAGTGCGT (SEQ ID NO.

Forma inativa: FQWQRNMRRVR (SEQ ID NO. 3)

b) Este é o peptídeo de staterina (STAT) = STAT 6
Seqüência de aminoácido:
DDDEEK (SEQ ID NO. 4)

Seqüência de DNA:
GATGATGATGAAGAGAAA (SEQ ID NO. 5)
GATGATGATGAAGAAAAA (SEQ ID NO. 6)

c) Este é o segundo peptídeo de staterina = STAT 15
Seqüência de aminoácido:
DDDEEKFLRRIGRFG (SEQ ID NO. 7)

Seqüência de DNA:
GATGATGATGAAGAGAAATTTTTGCGTAGAATTGGAAGATTCGGT (SEQ ID NO 8)

d) Este é o peptídeo combinado de STAT e LF = STAT-LF6
Seqüência de aminoácidos:
DDDEEKFQWQRNMRKVR (SEQ ID NO. 9)

STAT-LF6 (a): Seqüência de DNA

GATGATGATGAAGAGAAATTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAAAAGTGCGT (SEQ ID NO 10)

STAT-LF 6(b): seqüência de DNA

GATGATGATGAAGAAAAATTCCAATGGCAAAGGAATATGAGAAAAGTGCGT (SEQ ID NO 11)

e) Este é o segundo peptídeo combinado STAT-LF STAT-LF 15
Seqüência de aminoácidos:
DDDEEKFLRRIGRFGFQWQRNMRKVR (SEQ ID NO. 12)

Seqüência de DNA:
GATGATGATGAAGAGAAATTTTTGCGTAGAATTGGAAGATTCGGT (SEQ ID NO 13)

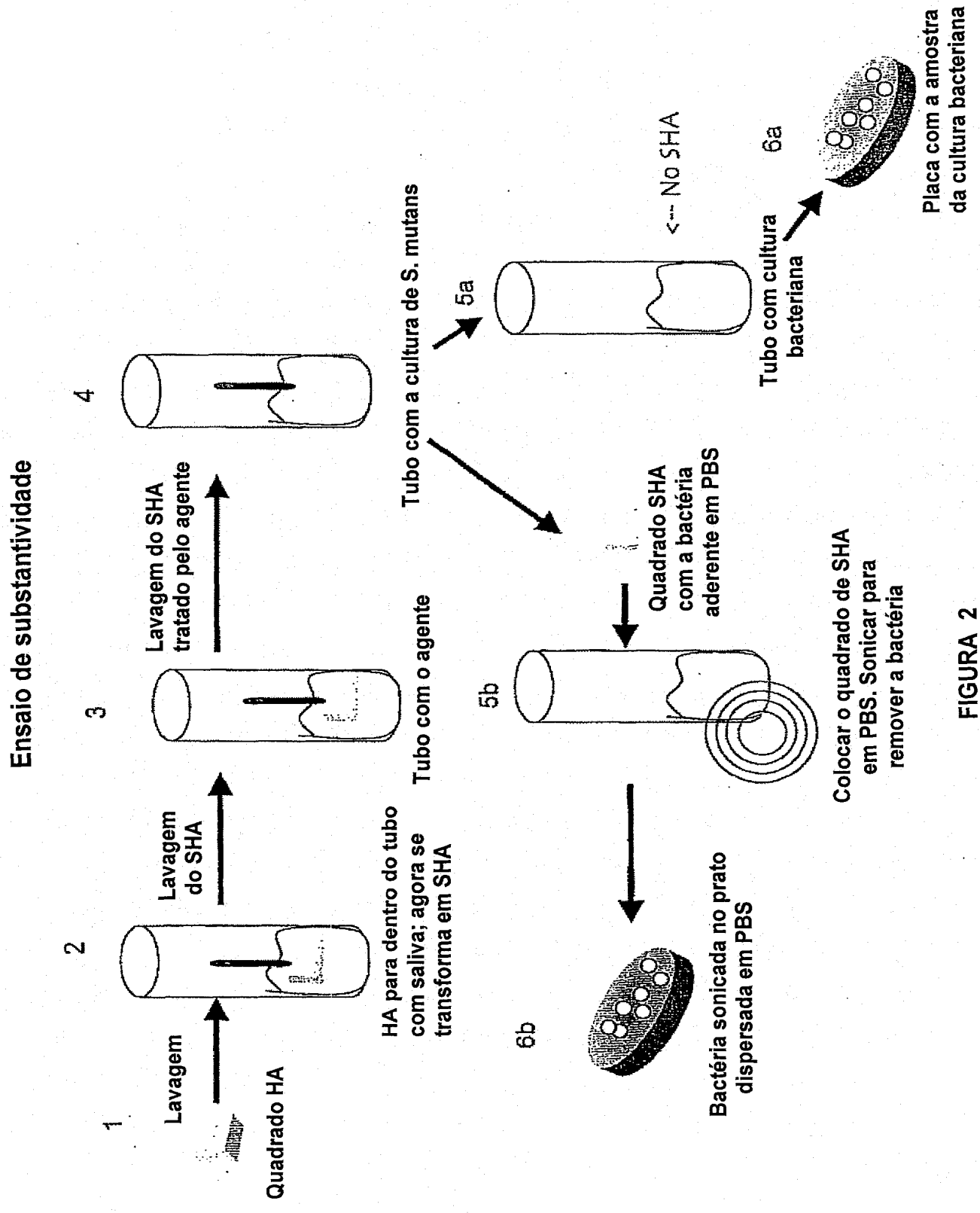

Ensaio de substantividade
1
Lavagem
Quadrado HA
2
Lavagem do SHA
HA para dentro do tubo com saliva; agora se transforma em SHA
3
Lavagem do SHA tratado pelo agente
Tubo com o agente
4
Tubo com a cultura de S. mutans
5a
<-- No SHA
Tubo com cultura bacteriana
6a
Placa com a amostra da cultura bacteriana
5b
Quadrado SHA com a bactéria aderente em PBS
Colocar o quadrado de SHA em PBS. Sonicar para remover a bactéria
6b
Bactéria sonicada no prato dispersada em PBS

FIGURA 2

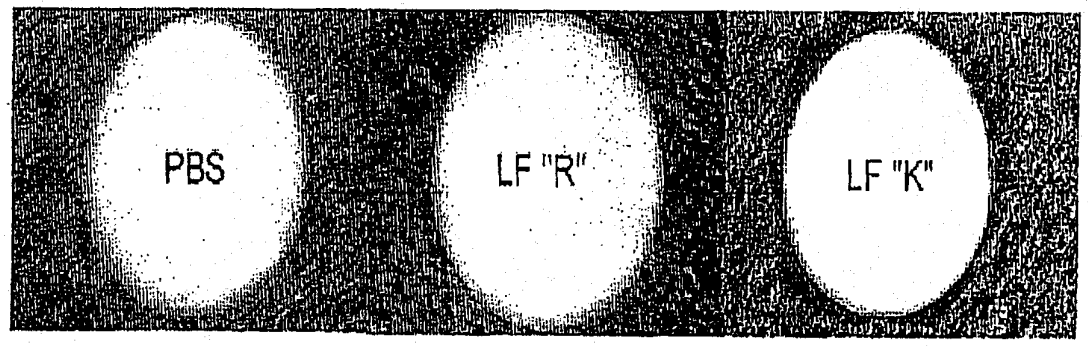


Figura 3: painel da esquerda = PBS, painel do meio = arginina; painel da direita = lisina Zona notada de inibição em LF "K" = variante de lisina.

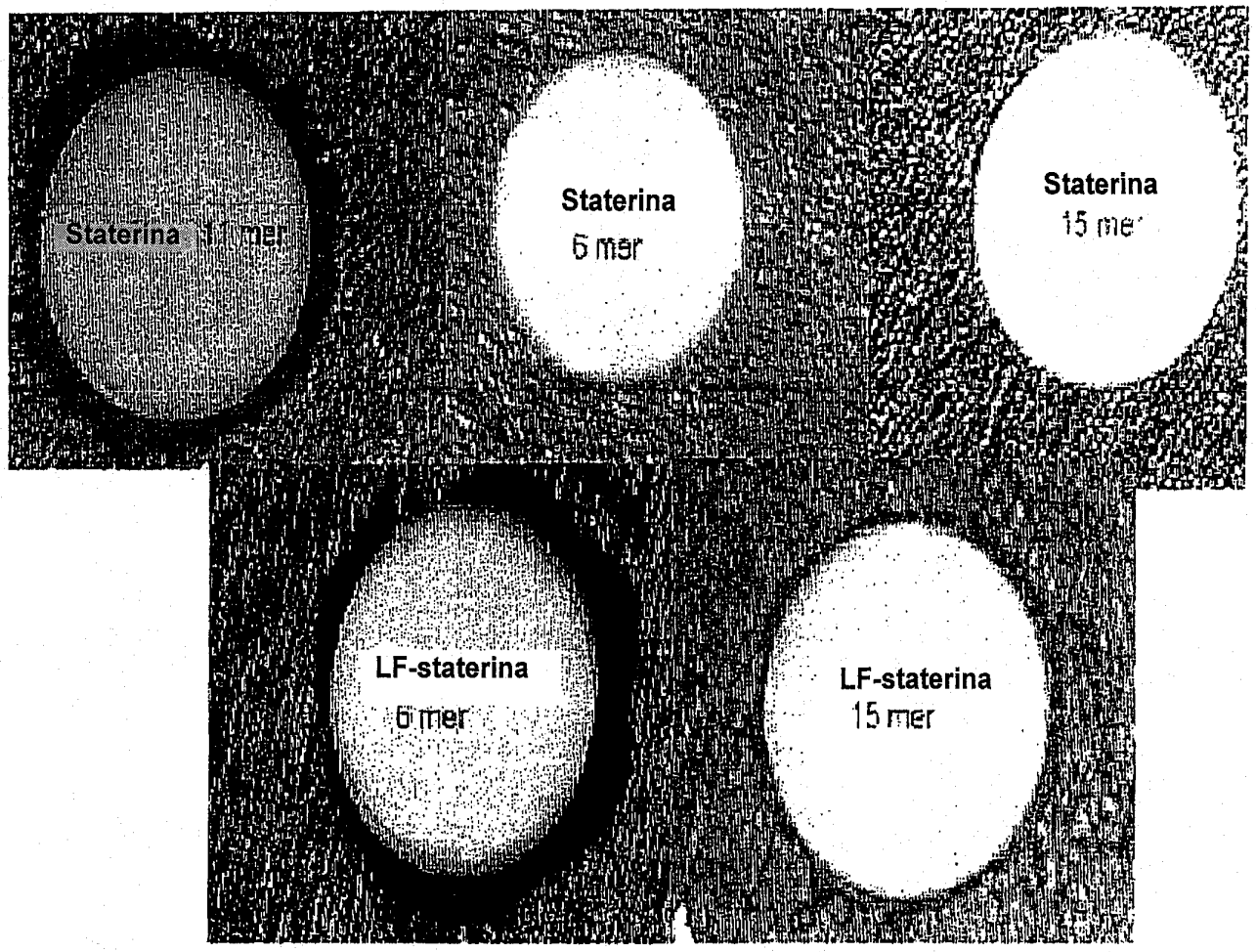


Figura 4: Painel superior a esquerda = Lf, no meio = staterina 5 mer, superior à direita = staterina 15 mer
Inferior a esquerda = STAT-LF de fusão, inferior a direita STAT-LF (stat 15 mer)
Notar que o LF é ativo assim como o STAT-LF com o stat como 6mer e com o stat como 15 mer há menos atividade.

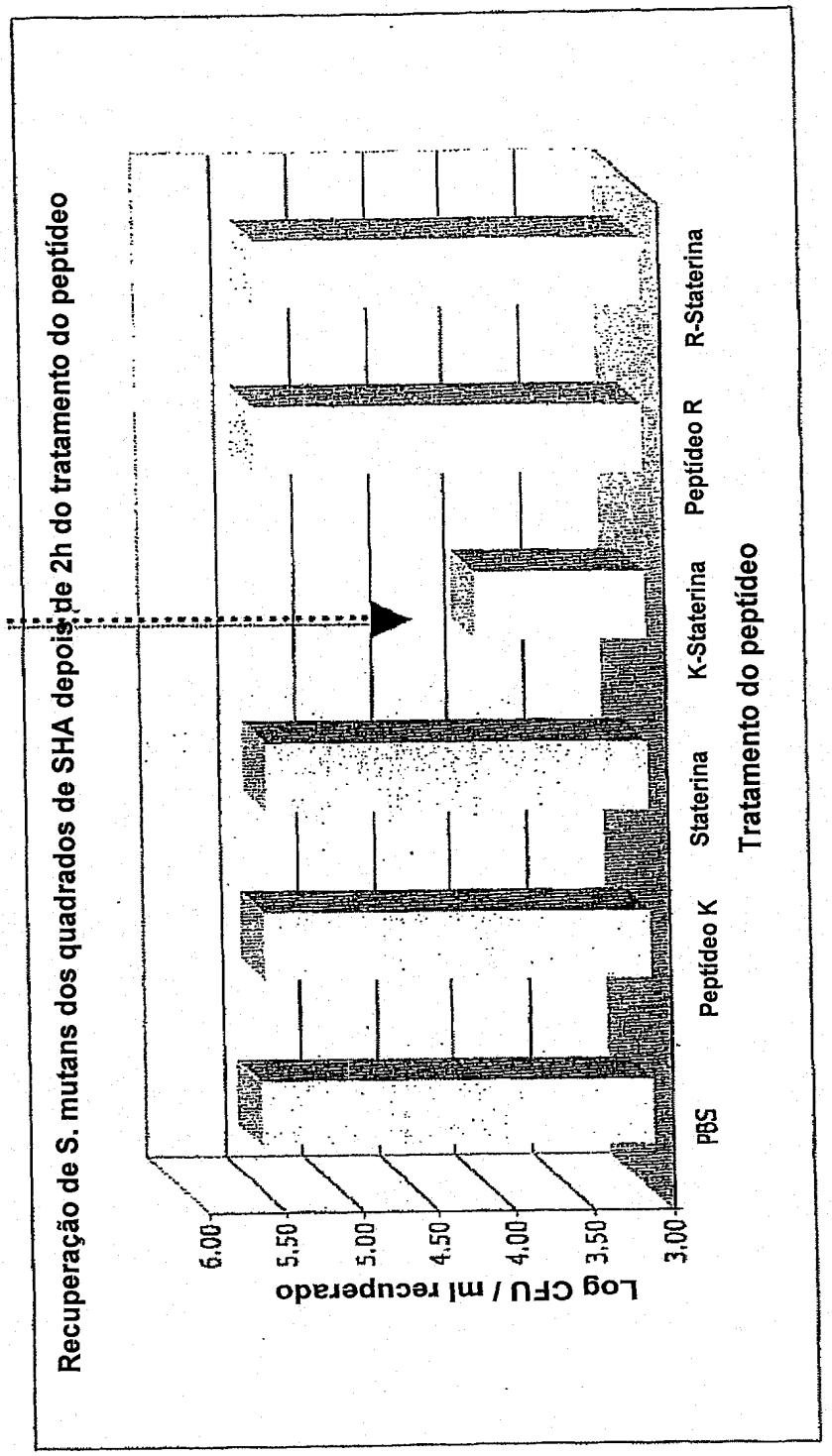

Recuperação de S. mutans dos quadrados de SHA depois de 2h do tratamento do peptídeo
Log CFU / ml recuperado
6,00
5,50
5,00
4,50
4,00
3,50
3,00
PBS
Peptídeo K
Staterina
K-Staterina
Peptídeo R
R-Staterina
Tratamento do peptídeo

FIGURA 5

RESUMO

"COMPOSIÇÃO PARA A INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO BACTERIANO NA CAVIDADE ORAL, MÉTODO PARA A INIBIÇÃO DE BACTÉRIAS NA CAVIDADE ORAL, MÉTODOS PARA O TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE CÁRIES DENTÁRIAS, DE DOENÇA PERIODONTAL, E DE PLACA DENTÁRIA, E PARA O TRATAMENTO DE INFLAMAÇÃO DA CAVIDADE ORAL ASSOCIADA COM A PRESENÇA DE PLACA DENTÁRIA, E, PROTEÍNA DE FUSÃO"

A presente invenção refere-se genericamente a doenças dos dentes, cáries e doença periodontal. Mais especificamente, a invenção se refere às proteínas de fusão Lactoferrin e Statirrrina (STAT-LF) juntamente com os usos terapêuticos de diagnóstico e de pesquisa para estes polipeptídeos. A presente invenção também apresenta métodos de tratamento de doenças dos dentes, cáries e doença periodontal.