

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 610**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 8/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.1998 E 10184405 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2343314**

54 Título: **Complejos de fluoruro de calcio y fosfopéptido**

30 Prioridad:

13.03.1997 AU PO566297

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

05.02.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
Grattan Street
Parkville, Victoria 3052 , AU**

72 Inventor/es:

REYNOLDS, ERIC, C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 441 610 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

Complejos de fluoruro de calcio y fosfopéptido

5 La presente invención se refiere a nuevos complejos en los que fosfatos de calcio amorfos son estabilizados por fosfopéptidos. Estos complejos tienen efectos anticariogénicos y se pueden usar también como suplementos dietéticos para aumentar la biodisponibilidad del calcio y para curar o prevenir enfermedades asociadas a deficiencias de calcio. También se proporcionan métodos de preparación de los complejos de la invención y de tratamiento o prevención de caries dentales, malabsorción de calcio y enfermedades óseas.

10 Antecedentes

Caries dental

15 La caries dental se inicia por desmineralización del tejido duro de los dientes por acción de los ácidos orgánicos producidos a partir de la fermentación del azúcar de la dieta por bacterias odontopatógenas de la placa dental.

Aunque la prevalencia de caries dentales ha disminuido por el uso de fluoruro en los países más desarrollados, la enfermedad sigue siendo un problema importante de salud pública. La carga económica estimada del tratamiento de las caries dentales en Australia en 1991 fue de \$471 millones, superior al de otras enfermedades relacionadas con la dieta, como las coronariopatías, la hipertensión o los accidentes cerebrovasculares.

20 En los países en desarrollo donde está aumentando la disponibilidad de alimentos industrializados, también está aumentando la prevalencia de caries dentales. Estudios recientes han puesto de relieve una serie de variables sociodemográficas asociadas al riesgo de desarrollar caries; hay un alto riesgo asociado al origen étnico y al nivel socioeconómico bajo. El nivel de individuos con alto riesgo se ha mantenido constante a pesar de que la gravedad y la prevalencia globales de la enfermedad en la comunidad han disminuido. Las caries dentales, por lo tanto, siguen siendo un problema importante de salud pública, particularmente en determinados grupos étnicos y en grupos socioeconómicos bajos. Esto pone de relieve la necesidad de un anticariogénico no tóxico, que pueda complementar los efectos del fluoruro para reducir aún más la incidencia de caries dentales. Sería particularmente deseable contar con un agente que pudiera disminuir la dosis de fluoruro necesaria para reducir la incidencia de caries en vista de la ansiedad de la comunidad con respecto al fluoruro y en vista del hecho de que puede producirse fluorosis incluso en las dosis utilizadas actualmente.

25 El grupo de alimentos con actividad anticaries más reconocido es el de los productos lácteos (leche, concentrados de leche, leche en polvo y quesos). La patente de Estados Unidos N° 5,130,123 da a conocer que el componente responsable de esta actividad anticariogénica es la caseína. Sin embargo, el uso de la caseína como anticariogénico está impedido por sus propiedades organolépticas adversas y los muy altos niveles necesarios para su actividad.

40 Las investigaciones preliminares determinaron que fosfopéptidos tripticos de caseína contribuyeron a la actividad anticariogénica y este fue el tema de la patente de Estados Unidos N° 5,015,628. En particular, los péptidos Bos α_1 -caseína X-5P (f59-79) [1], Bos β -caseína X-4P (f1-25) [2], Bos α_{s2} -caseína X-4P (f46-70) [3] y Bos α_{s2} -caseína X-4P (f1-21) [4] se dieron a conocer en la patente de Estados Unidos 5,015,628 de la manera siguiente:

45 [1] Gln⁵⁹-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys⁷⁹. α_{s1} (59-79)

[2] Arg¹-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile- Thr-Arg²⁵. β (1-25)

50 [3] Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰. α_{s2} (46-70)

[4] Lys¹-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys²¹. α_{s2} (1-21)

55 La determinación preliminar de los fosfopéptidos anteriores para usar en combinación con CaHPO₄ e hidroxiapatita proporcionó nuevos péptidos con propiedades anticariogénicas. Sin embargo, investigaciones posteriores determinaron que el motivo secuencial del agrupamiento Ser(P) de los fosfopéptidos dados a conocer antes, tiene la inesperada capacidad de estabilizar su propio peso en fosfato de calcio amorfo. La capacidad de los fosfopéptidos anteriores y en particular del motivo Ser(P) de estabilizar el fosfato de calcio amorfo fue absolutamente inesperada y no fue dada a conocer ni comunicada en ninguna publicación conocida por los solicitantes. Encontramos en la actualidad que la forma amorfa del fosfato de calcio Ca₃(PO₄)_{1,87}(HPO₄)_{0,2}xH₂O donde x ≥ 1 estabilizada por los

fosfopéptidos de caseína, es la forma básica de fosfato de calcio no cristalino más soluble y una forma superior de fosfato de calcio que previene las caries y aumenta la biodisponibilidad del calcio. El fosfato de calcio amorfo (ACP) se debe preparar por titulación cuidadosa de iones Ca (por ej. CaCl_2) e iones fosfato (por ej. NaHPO_4) manteniendo simultáneamente el pH por encima de 7 (preferentemente 9.0) en presencia del fosfopéptido. A medida que se forma ACP, el fosfopéptido se une a los núcleos nacientes y estabiliza el ACP como un complejo de fosfopéptido-ACP. Sin el fosfopéptido, el ACP precipitará de la solución y se transformará en minutos en la fase de fosfato de calcio más estable, la hidroxiapatita cristalina (HA). La HA, al ser insoluble tiene una actividad anticariogénica limitada y presenta al calcio en una forma poco biodisponible. La fase ácida del fosfato de calcio, CaHPO_4 , aunque es sin duda más soluble que la hidroxiapatita, se une poco al fosfopéptido y se localiza escasamente en la superficie del diente y por lo tanto también tiene actividad anticariogénica limitada. La inesperada capacidad de los fosfopéptidos mencionados antes y en particular del motivo del agrupamiento Ser(P) de estabilizar el fosfato de calcio amorfo no fue dada a conocer ni comunicada en la patente de Estados Unidos N° 5,015,628 y proporciona por primera vez un método confiable y eficaz de producir un complejo de fosfato de calcio amorfo estabilizado, con ventajas distintivas y novedosas en tratamientos y administración de calcio. La patente de Estados Unidos N° 5,015,628 no da a conocer la fase excepcional de fluoruro pentafosfato de calcio amorfo $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5\text{F} \times \text{H}_2\text{O}$ donde $x \geq 1$ que encontramos ahora que es estabilizada por los fosfopéptidos anteriores y que se puede localizar en la superficie del diente para proporcionar una eficacia anticaries superior. Esta inesperada capacidad de estabilizar el fosfato de calcio amorfo constituye la base de la presente invención.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un complejo estable de fosfato de calcio, que comprende fosfato de calcio amorfo o un derivado de éste estabilizados por un fosfopéptido, donde dicho fosfopéptido contiene la secuencia -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-.

En una realización, el complejo puede incluir fosfato/fluoruro de calcio amorfo estabilizado por un fosfopéptido.

En otra realización, el complejo puede incluir fosfato de calcio amorfo estabilizado por un fosfopéptido, el cual proporciona un complejo soluble estable a un pH alcalino.

Cuando el complejo adopta la forma de un fosfato/fluoruro de calcio amorfo estabilizado por un fosfopéptido, el fosfato/fluoruro de calcio puede presentar la fórmula aproximada $[\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5\text{F} \times \text{H}_2\text{O}]$, donde $x \geq 1$.

El complejo puede incluir además HPO_4 como un componente minoritario opcional del complejo. Se cree que el HPO_4 actúa como un recubrimiento para el clúster de ACP. Cuando el complejo adopta la forma alternativa de un complejo de fosfato de calcio alcalino soluble estable, incluido el fosfato de calcio amorfo estabilizado, el fosfato de calcio amorfo puede presentar la fórmula aproximada $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}]$, donde $x \geq 1$.

El complejo puede incluir además HPO_4 como un componente minoritario opcional. De la forma más preferente, el complejo tiene un pH de aproximadamente 9.0.

El fosfopéptido (PP) puede provenir de cualquier fuente; se puede obtener por digestión triptica de la caseína u otras proteínas ricas en fosfo-ácido como fosfitina, o por síntesis química o recombinante, siempre que contenga la secuencia básica -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-. La secuencia que flanquea esta secuencia base puede ser cualquier secuencia. Sin embargo, se prefieren esas secuencias flanqueantes de $\alpha_{s1}(59-79)$ [1], $\beta(1-25)$ [2], $\alpha_{s2}(46-70)$ [3] y $\alpha_{s2}(1-21)$ [4]. Las secuencias flanqueantes pueden ser modificadas opcionalmente por supresión, adición o sustitución conservadora de uno o más residuos. La composición y la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante no son críticas siempre y cuando se mantenga la conformación del péptido, y que todos los grupos fosforilo y carboxilo que interactúan con los iones calcio se mantengan como las regiones flanqueantes preferidas parece contribuir a la acción estructural del motivo.

El complejo formado tiene preferentemente la fórmula $[(\text{PP})(\text{CP})_8]_n$ donde n es igual o mayor que 1, por ejemplo, 6. El complejo formado puede ser un complejo coloidal.

El fosfopéptido se une al agrupamiento de ACP para producir una solución metaestable, en la cual se evita el crecimiento de ACP a un tamaño que inicie la nucleación y la precipitación. De esta manera, se pueden localizar el calcio y otros iones como iones fluoruro, por ejemplo en una superficie de un diente para evitar la desmineralización y prevenir la formación de caries dentales.

Así, en un segundo aspecto, la invención proporciona un complejo de fosfato de calcio estable como el descrito antes, complejo que actúa como un vehículo de administración que colocaliza iones por ejemplo, pero no exclusivamente, iones calcio, fluoruro y fosfato en un sitio diana. En una realización preferida, el complejo está en una forma amorfa de liberación lenta que produce una eficacia anticaries superior.

En una realización particularmente preferida de la invención, el complejo de calcio estable se incorpora en dentífricos como una pasta dentífrica, enjuagues bucales o una formulación para la boca para ayudar a prevenir y tratar las caries dentales o la erosión dental. El complejo de calcio puede constituir 0.05 a 50% en peso de la composición, preferentemente 1.0 a 50%. Para las composiciones orales, se prefiere que la cantidad de CPP-ACP o CPP-ACFP administrada sea de 0.05 a 50% en peso, preferentemente de 1.0% a 50% en peso de la composición. La composición oral de esta invención que contiene los agentes mencionados se puede preparar y utilizar en diversas formas aplicables a la boca como dentífrico que incluye dentífricos en pasta, líquidos y en polvo, enjuagues bucales, trociscos, gomas de mascar, pastas dentales, cremas para masaje gingival, comprimidos para gargarismos, productos lácteos y otros productos alimenticios. La composición oral de acuerdo con esta invención puede además incluir otros ingredientes conocidos según el tipo y la forma de la composición oral particular.

En ciertas formas muy preferidas de la invención la composición oral puede ser de carácter sustancialmente líquido, como un colutorio o enjuague bucal. En una preparación de ese tipo el vehículo suele ser una mezcla de agua y alcohol que contiene deseablemente un humectante como se describe a continuación. Generalmente, la relación entre agua y alcohol está en el rango de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. La cantidad total de mezcla de agua y alcohol en este tipo de preparación está habitualmente en el rango de aproximadamente 70 a aproximadamente 99.9% en peso de la preparación. El alcohol es generalmente etanol o isopropanol. Se prefiere el etanol.

El pH de dicho líquido y de otras preparaciones de la invención está generalmente en el rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 y habitualmente de aproximadamente 7.0 a 9.0. El pH puede ser controlado con ácido (por ej. ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ej. hidróxido de sodio) o amortiguado (como con citrato de sodio, benzoato, carbonato o bicarbonato, fosfato ácido disódico, fosfato ácido monosódico, etc.).

En otras formas deseables de esta invención, la composición oral puede ser de carácter sustancialmente sólido o pastoso, como polvo dentífrico, tableta dental, pasta dentífrica (crema dental) o gel dentífrico. El vehículo de dichas preparaciones orales sólidas o en pasta generalmente contiene material de pulido dental aceptable. Son ejemplos de materiales de pulido: metafosfato de sodio insoluble en agua, metafosfato de potasio, fosfato tricálcico, fosfato de calcio dihidratado, fosfato dicálcico anhidro, pirofosfato de calcio, ortofosfato de magnesio, fosfato trimagnésico, carbonato de calcio, alúmina hidratada, alúmina calcinada, silicato de aluminio, silicato de circonio, sílice, bentonita y sus mezclas. Otro material de pulido adecuado incluye las resinas termoendurecibles particuladas como melamina, fenólicas y urea-formaldehídos, y poliepóxidos y poliésteres reticulados. Los materiales de pulido preferidos incluyen sílice cristalina con un tamaño de partícula de hasta aproximadamente 5 micras, un tamaño medio de partícula de hasta aproximadamente 1.1 micras y una superficie de hasta aproximadamente 50 000 cm²/g, gel de sílice o sílice coloidal y complejo amorfo de aluminosilicato de un metal alcalino.

Cuando se emplean geles visualmente transparentes, es especialmente útil un agente de pulido de sílice coloidal, como los que se venden bajo la marca SYLOID como Syloid 72 y Syloid 74 o bajo la marca SANTOCEL como Santocel 100, complejos de aluminosilicato de un metal alcalino, porque tienen índices de refracción próximos a los índices de refracción de los sistemas de gelificante-líquido (que incluyen agua y/o humectantes) utilizados comúnmente en dentífricos.

Muchos de los materiales de pulido denominados "insolubles en agua" son de carácter aniónico y también incluyen pequeñas cantidades de material soluble. Por lo tanto, metafosfato de sodio insoluble se puede preparar de cualquier manera adecuada como se ilustra en Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, volumen 9, 4ª edición, pp. 510-511. Las formas de metafosfato de sodio insoluble conocidas como sal de Madrell y sal de Kurrol son otros ejemplos de materiales adecuados. Estas sales de metafosfato tienen una mínima solubilidad en agua, y por consiguiente se denominan generalmente metafosfatos insolubles (IMP). Hay presente una pequeña cantidad de material de fosfato soluble como impurezas, generalmente un bajo porcentaje como hasta un 4% en peso. La cantidad de material de fosfato soluble, que se cree que incluye un trimetafosfato de sodio soluble en el caso de metafosfato insoluble, se puede reducir o eliminar por lavado con agua si se desea. El metafosfato de metal alcalino insoluble se emplea generalmente en forma de polvo de un tamaño de partícula de modo que no más del 1% del material sea mayor de 37 micras.

El material de pulido está presente en general en las composiciones sólidas o en pasta en concentraciones en peso entre aproximadamente 10% y 99%. Preferentemente, está presente en cantidades entre aproximadamente 10% y aproximadamente 75% en pasta dentífrica, y entre aproximadamente 70% y aproximadamente 99% en polvo dentífrico. En pastas dentífricas, cuando el material de pulido es de naturaleza sílicea, está generalmente presente en una cantidad entre aproximadamente 10 y 30% en peso. Otros materiales de pulido están habitualmente presentes en una cantidad entre aproximadamente 30 y 75% en peso.

En una pasta dentífrica, el vehículo líquido puede contener agua y humectante habitualmente en una cantidad que varía entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80% en peso de la preparación. La glicerina, el propilenglicol, el sorbitol y el polipropilenglicol ejemplifican humectantes/excipientes adecuados. También son ventajosas las

mezclas líquidas de agua, glicerina y sorbitol. En geles transparentes en los que el índice de refracción es una consideración importante, se emplean aproximadamente 2.5 a 30% p/p de agua, 0 a aproximadamente 70% p/p de glicerina y aproximadamente 20 a 80% p/p de sorbitol.

5 Las pastas, las cremas y los geles dentífricos contienen habitualmente un espesante natural o sintético o un gelificante en proporciones entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 10, preferentemente entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 5% p/p. Un espesante adecuado es hectorita sintética, una arcilla coloidal sintética compuesta por un silicato complejo de magnesio y un metal alcalino disponible por ejemplo como Laponita (por ej. CP, SP 2002, D) comercializada por Laporte Industries Limited. La laponita D es, aproximadamente en peso
10 58.00% de SiO₂, 25.40% de MgO, 3.05% de Na₂O, 0.98% de Li₂O y algo de agua y trazas de metales. Su gravedad específica verdadera es de 2.53 y tiene una densidad aparente de 1.0 g/ml a una humedad de 8% .

15 Otros espesantes adecuados incluyen musgo irlandés, iota carragenina, goma tragacanto, almidón, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa (por ej. disponible como Natrosol), carboximetilcelulosa sódica y sílice coloidal como Syloid finamente molido (e.g. 244). También se pueden incluir solubilizantes como polioles humectantes por ejemplo propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, celosolves como metilcelosolve y etilcelosolve, aceites vegetales y ceras que contengan al menos aproximadamente 12 átomos de carbono en una cadena lineal como aceite de oliva, aceite de ricino y petrolato, y diésteres como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo.

20 Se comprenderá que, como es convencional, las preparaciones orales se deben vender o distribuir en envases rotulados adecuadamente. Por lo tanto, un frasco de enjuague bucal tendrá una etiqueta que lo describa, en sustancia, como un enjuague bucal o colutorio y tendrá indicaciones de uso; y una pasta, una crema o un gel dentífricos estarán generalmente en un tubo plegable, habitualmente de aluminio, revestido de plomo o plástico, u
25 otro dispensador para apretar, bombear o presurizado para dosificar el contenido, con una etiqueta que lo describa, en sustancia, como una pasta, una crema o un gel dentífricos.

30 En las composiciones de la presente invención se usan tensioactivos orgánicos para lograr mayor acción profiláctica, contribuir a lograr una dispersión exhaustiva y completa del principio activo en toda la cavidad bucal y tornar las presentes composiciones más aceptables desde el punto de vista cosmético. El material tensioactivo orgánico es preferentemente de naturaleza aniónica, no iónica o anfófica y preferentemente no interacciona con el principio activo. Se prefiere emplear como tensioactivo un material detergente que le imparta a la composición propiedades detergentes y espumantes. Son ejemplos adecuados de los tensioactivos aniónicos las sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicérido de ácidos grasos superiores, como la sal sódica del monoglicérido monosulfatado de
35 ácidos grasos del aceite de coco hidrogenado, los sulfatos de alquilos superiores como laurilsulfato de sodio, los sulfonatos de alquilarilos como dodecibencenosulfonato de sodio, los sulfoacetatos de alquilos superiores, los ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2-dihidroxi propanosulfonato, y las acilamidas alifáticas superiores substancialmente saturadas de compuestos de ácidos aminocarboxílicos alifáticos inferiores, como los que tienen 12 a 16 carbonos en el ácido graso, radicales alquilo o acilo, y similares. Son ejemplos de las últimas amidas
40 mencionadas N-lauroil sarcosina y las sales de sodio, potasio y etanolamina de N-lauroil, N-miristoil o N-palmitoil sarcosina que deben estar substancialmente exentas de jabón o material similar de ácidos grasos superiores. El uso de estos compuestos de sarcosina en las composiciones orales de la presente invención es particularmente ventajoso puesto que estos materiales presentan un marcado efecto prolongado de inhibición de la formación de ácido en la cavidad oral debida a la degradación de carbohidratos, además de ejercer cierta disminución en la
45 solubilidad del esmalte de los dientes en soluciones ácidas. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos solubles en agua adecuados para usar, son productos de condensación de óxido de etileno con diversos compuestos que contienen hidrógeno reactivos con él, que tienen cadenas hidrófobas largas (por ej. cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), cuyos productos de condensación ("etoxámeros") contienen restos polioxietileno hidrófilos, como productos de condensación de poli(óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes
50 grasos, amidas grasas, alcoholes polihídricos (por ej. monoestearato de sorbitán) y poli(óxido de propileno) (por ej. materiales Pluronic).

55 El tensioactivo está presente habitualmente en una cantidad entre aproximadamente 0.1 y 5% en peso. Es de destacar, que el tensioactivo puede ayudar a disolver el principio activo de la invención y de esa forma disminuir la cantidad necesaria de humectante solubilizante.

Pueden incorporarse otros diversos materiales en las preparaciones orales de esta invención como blanqueadores, conservantes, siliconas, compuestos de clorofila y/o material que contiene amonio como urea, fosfato de diamonio y sus mezclas. Estos adyuvantes, cuando están presentes, se incorporan en las preparaciones en cantidades que no afectan adversamente de manera sustancial las propiedades y características deseadas.
60

También se puede usar cualquier material saborizante o edulcorante adecuado. Son ejemplos de constituyentes saborizantes adecuados los aceites saborizantes, por ejemplo esencia de hierbabuena, menta, gaulteria, sasafrás, clavo de olor, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón y naranja, y salicilato de metilo. Los edulcorantes adecuados

incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perillartina, AMP (éster metílico de aspartilfenilalanina), sacarina y similares. Los saborizantes y edulcorantes adecuados pueden cada uno o en conjunto constituir entre aproximadamente 0.1% y 5% de la preparación

5 En la práctica preferida de esta invención una composición oral de acuerdo con la invención como un enjuague bucal o un dentífrico que contenga la composición de la presente invención se aplica preferentemente de forma regular a las encías y los dientes, por ejemplo todos los días o cada dos o tres días o preferentemente de 1 a 3 veces al día, a un pH entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 9, generalmente entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 9, durante al menos 2 semanas a 8 semanas o más, o durante toda la vida.

10 Las composiciones de esta invención también se pueden incorporar en pastillas o en goma de mascar u otros productos, por ejemplo por agitación en una base de goma caliente o recubriendo la superficie exterior con una base de goma, como ilustración de lo cual se pueden mencionar jelutong, goma látex, resinas vinilita, etc., deseablemente con plastificantes o ablandadores convencionales, azúcar u otros edulcorantes como glucosa, sorbitol y similares.

15 En otra realización, el complejo de la invención se formula para preparar un complemento alimenticio que contenga preferentemente 0.1 a 100% p/p, más preferentemente 1 a 50% p/p, muy preferentemente 1 a 10% y particularmente 2% p/p. El complejo también se puede incorporar en productos alimenticios.

20 En consecuencia, en un tercer aspecto, la invención proporciona composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas que contienen el complejo de calcio descrito junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones se pueden elegir del grupo integrado por composiciones dentales, composiciones anticariogénicas, composiciones terapéuticas y complementos alimenticios. Las composiciones dentales o las composiciones terapéuticas pueden estar en forma de gel, líquido, sólido, polvo, crema o pastilla. Las composiciones terapéuticas también puede estar en forma de comprimidos o cápsulas.

25 En un cuarto aspecto, se proporciona un método para tratar o prevenir las caries dentales o la erosión dental que comprende el paso de administrar un complejo o una composición de la invención a los dientes o encías de un sujeto que necesita dichos tratamientos. Se prefiere la administración tópica del complejo.

30 En un quinto aspecto, la invención se refiere a métodos para tratar una o más afecciones relacionadas con pérdida de calcio del organismo, especialmente de los huesos, deficiencia de calcio, malabsorción de calcio, o similares. Los ejemplos de dichas afecciones incluyen, pero no exclusivamente, osteoporosis y osteomalacia. En general se contempla cualquier afección que pueda ser mejorada por la biodisponibilidad de calcio.

35 En un sexto aspecto, la invención también proporciona un método para producir un complejo estable de fosfato de calcio como el descrito antes, que comprende los pasos de:

- 40 (i) obtener una solución de fosfopéptido que tenga un pH de aproximadamente 9.0;
 (ii) mezclar (i) con soluciones que contengan calcio y fosfato inorgánico y opcionalmente fluoruro a un pH de aproximadamente 9.0;
 (iii) filtrar la mezcla resultante del paso (ii), y
 (iv) secar para obtener dicho complejo.

45 Los complejos de la invención son útiles como complementos de calcio en sujetos que necesitan la estimulación del crecimiento óseo, por ejemplo sujetos que pasan por reparación de una fractura, reemplazo de una articulación, injertos óseos o cirugía craneofacial.

50 Estos complejos también son útiles como complementos alimenticios en sujetos que por cualquier razón, como intolerancia alimentaria, alergia o factores religiosos o culturales, no pueden o no están dispuestos a consumir productos lácteos en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos de calcio de la dieta.

55 Se debe comprender claramente que, aunque esta memoria se refiera específicamente a aplicaciones en seres humanos, la invención también es útil con fines veterinarios. Por consiguiente, en todos los aspectos la invención es útil para animales domésticos como ganado, ovejas, caballos y aves; animales de compañía como perros y gatos; y para animales de zoológico.

Descripción detallada de la invención

60 La invención se describirá ahora en detalle sólo por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1 Preparación de CPP-ACP y CPP-ACFP

A. Preparación de CPP-ACP

Se preparó una solución de caseína o caseinato 10% p/v (Murray Goulburn Victoria, Australia) a pH 8.0 y después se digirió con tripsina al 0.2% p/p de la caseína durante 2 h a 50 °C con el pH controlado a 8.0 ± 0.1 por adición de NaOH. Después de la digestión la solución se ajustó a pH 4.6 por adición de HCl y el precipitado se separó por centrifugación o microfiltración. Sin embargo, la solución también se puede clarificar por microfiltración a pH 8.0 sin acidificación. Después el sobrenadante o microfiltrado se ajustó a pH 9.0 con NaOH, después se agregaron lentamente CaCl_2 (1.6 M) y Na_2HPO_4 (1 M) a pH 9.0 ($\leq 1\%$ vol por min) con agitación constante, manteniendo el pH constante a 9.0 ± 0.1 por adición de NaOH. Se agregaron CaCl_2 y fosfato de sodio a las concentraciones finales de 100 mM y 60 mM respectivamente. Luego de la adición de las soluciones de calcio y fosfato, la solución se microfiltró a través de un microfiltro de 0.1 o 0.2 μm (cerámico u orgánico) para concentrar la solución cinco veces. Después el retenido se diafiltró con uno a cinco volúmenes de agua destilada. Después de la diafiltración el retenido se secó por aspersión para producir un polvo blanco que era 50% de CPP y 40% de ACP y agua residual. El análisis de CPP del complejo CPP-ACP por HPLC de fase reversa, análisis de secuencia y espectrometría de masas reveló que los únicos péptidos capaces de estabilizar el fosfato de calcio amorfo y retenidos durante la microfiltración y la diafiltración son Bos α_{s1} -caseína X-5P (f59-79) [1], Bos β -caseína X-4P (f1-25) [2], Bos α_{s2} -caseína X-4P (f46-70) [3] y Bos α_{s2} -caseína X-4P (f1-21) [4] y formas truncadas y modificadas por calor de esos péptidos.

B. Preparación de CPP-ACFP

Se preparó una solución de caseína o caseinato al 10% p/v a pH 8.0 ± 0.1 y después se digirió con tripsina al 0.2% p/p de la caseína durante 2 h a 50 °C. Después de la digestión la solución se ajustó a pH 4.6 por adición de HCl y el precipitado se separó por centrifugación o microfiltración. Sin embargo, la solución también se puede clarificar por microfiltración a pH 8.0 sin acidificación. Después el sobrenadante o microfiltrado se ajustó a pH 9.0 con NaOH, después se agregaron lentamente CaCl_2 (1.6 M) y Na_2HPO_4 (1 M) a pH 9.0 y NaF 200 mM ($\leq 1\%$ vol por min) con agitación constante, manteniendo el pH constante a 9.0 ± 0.1 por adición de NaOH. Se agregaron CaCl_2 , fosfato de sodio y NaF a las concentraciones finales de 100 mM, 60 mM y 12 mM, respectivamente. Luego de la adición de las soluciones de calcio, fosfato y fluoruro, la solución se microfiltró a través de un microfiltro de 0.1 o 0.2 μm (cerámico u orgánico) para concentrar la solución cinco veces. Después el retenido se diafiltró con uno a cinco volúmenes de agua destilada. Después de la diafiltración el retenido se secó por aspersión para producir un polvo blanco que era 50% de CPP y 40% de ACFP y agua residual.

Después se reconstituyó el CPP-ACFP en polvo, en agua destilada, para producir soluciones muy concentradas. Por ejemplo, se preparó una solución de CPP-ACFP al 10% p/v que contenía Ca 640 mM, fosfato 400 mM y F 80 mM (1520 ppm de F) a pH 9.0 así como un gel de CPP al 20% que contenía Ca 1.28 M, fosfato 800 mM y F 160 mM (3040 ppm de F) a pH 9.0. Esa solución y ese gel tienen una anticariogenicidad significativamente mayor en comparación con el fluoruro solo y por lo tanto son aditivos superiores para pastas dentífricas y enjuagues bucales y para uso profesional, a fin de mejorar la eficacia de los dentífricos y productos actuales aplicados profesionalmente que contienen fluoruro.

Ejemplo 2 Estudios estructurales del CCP-ACP

A. Estructura e interacción de CCP-ACP

Los fosfopéptidos de caseína que contienen el agrupamiento Ser(P), es decir el motivo secuencial central Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-, tienen una notable habilidad para estabilizar el fosfato de calcio en solución. Se utilizaron soluciones que contenían 0.1% p/v de α_{s1} (59-79) [1] a diferentes pH y concentraciones de calcio y fosfato pero fuerzas iónicas constantes, para caracterizar la interacción de los péptidos con fosfato de calcio. Se encontró que el péptido unía como máximo 24 Ca y 16 Pi por molécula como se muestra en la tabla 1.

Se determinaron los productos de actividad iónica para las diversas fases del fosfato de calcio [hidroxiapatita (HA); fosfato octacálcico (OCP); fosfato tricálcico (TCP); fosfato de calcio amorfo (ACP); y fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) de las concentraciones libres de calcio y fosfato a cada pH usando un programa informático que calcula los coeficientes de actividad iónica a través del uso de la ecuación expandida de Debye-Hückel y toma en cuenta los pares iónicos CaHPO_4^0 , $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$, CaPO_4^- y la disociación de CaOH^+ del H_3PO_4 y H_2O y la fuerza iónica. El único producto de actividad iónica que se correlacionó significativamente con el fosfato de calcio unido al péptido independientemente del pH fue el correspondiente a ACP [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1.87}(\text{HPO}_4)_{0.2}\text{H}_2\text{O}$] lo que indica que esta es la fase estabilizada por α_{s1} (59-79). El péptido α_{s1} (59-79) se une para formar agrupamientos de ACP que producen una solución metaestable evitando que ACP crezca hasta el tamaño crítico necesario para la nucleación y la precipitación. La unión de α_{s1} (59-79) a ACP resulta en la formación de complejos coloidales con la fórmula unitaria $[\alpha_{s1}(59-79)(\text{ACP})_8]_n$ donde n es igual o mayor que 1. Es probable que la forma predominante sea n = 6 puesto que α_{s1} (59-79) reticulada con glutaraldehído en presencia de ACP corre como un hexámero en la electroforesis en gel de poliacrilamida. Curiosamente, el octapéptido sintético α_{s1} (63-70) AcGlu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-

GluNHMe sólo une 12 Ca y 8 Pi por molécula, es decir, (ACP)₄ y los péptidos sintéticos correspondientes a α_{s1}(59-63) N-terminal, Gln-Met-Glu-Ala-Glu y α_{s1}(71-78) C-terminal, Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln de α_{s1}(59-79) no se unen a fosfato de calcio como se muestra en la tabla 1. Estos resultados indican que la especificidad conformacional es esencial para la unión total de ACP.

B. Estudios de NMR

La flexibilidad de las proteínas en solución es la característica sobresaliente que emerge de los estudios espectroscópicos en proteínas que contienen la secuencia del agrupamiento de Ser(P) (-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-) como fosvitina de yema de huevo y fosforina de la dentina del diente. La fosforilación parece desestabilizar las estructuras secundaria y terciaria en vez de promover mayores niveles de ordenamiento. Sin embargo, las secuencias fosforiladas flexibles adoptan conformaciones más regulares cuando están unidas a fosfato de calcio. Las mediciones de dispersión rotatoria óptica (ORD), dicroísmo circular (CD), hidrodinámica y resonancia magnética nuclear (NMR) con ³¹P de las caseínas, todas indican que α_{s1}-caseína y β-caseína tienen una estructura bastante abierta en solución con muchas cadenas laterales de aminoácidos expuestas al solvente y relativamente flexibles. Las mediciones de relajación ³¹P-NMR indican que los residuos de Ser(P) son relativamente móviles en β-caseína.

Hemos demostrado efectos Overhauser nucleares (nOes) de rango medio y largo en espectros 2D ¹H NMR de α_{s1}(59-79) [1] en presencia de Ca²⁺ lo que indica una preferencia conformacional. Se identificaron dos regiones estructuradas. Los residuos Val72 a Val76 están implicados en una conformación de giro β. Los residuos Glu61 a Ser(P)67, que se extienden sobre parte del motivo del agrupamiento Ser(P) -Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- están involucrados en una estructura tipo bucle. Los estudios 2D NMR en β-caseína(1-25) en presencia de calcio muestran un nOe de rango medio en la región del motivo -Ser(P)¹⁷-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu²¹ - entre CaH de Ser(P)¹⁸ y NH de Glu²⁰. Otros nOe de rango medio incluyen uno entre CaH de Ser²² y NH de Thr²⁴. La evidencia de los espectros ¹H NMR de α_{s2}-caseína(1-21) [4] ha demostrado que varios residuos incluidos los que están alrededor de -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- están perturbados. Además, hay efectos nOe de rango medio entre NH de Ser(P)⁸ y NH de Glu¹⁰. Este es otro ejemplo de un efecto nOe de rango medio en el motivo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-. Otros ejemplos de efectos nOe de rango medio incluyen el que está entre NH de Ile¹⁴ y NH de Ser(P)¹⁶.

En resumen los datos de NMR indican que existen conformaciones preferidas para esos péptidos en presencia de iones calcio. El modelado molecular de α_{s1}(59-79) y β(1-25) usando las limitaciones derivadas de la espectroscopía NMR indicaron que los péptidos adoptan conformaciones que permiten que cadenas laterales tanto de glutamilo como de fososerilo del motivo del agrupamiento -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu interaccionen colectivamente con los iones calcio de ACP.

Se investigó la relación entre la estructura de CPP y la interacción con el fosfato de calcio amorfo utilizando una serie de homólogos y análogos de péptidos sintéticos indicados en la tabla 1. Esos estudios demostraron que la secuencia del agrupamiento -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- era responsable principalmente de la interacción con ACP y que los tres residuos contiguos de Ser(P) son necesarios para la máxima interacción con ACP.

TABLA 1.

Unión de fosfato de calcio por CPP y homólogos y análogos sintéticos					V _{Ca} mol/mol	V _{Pi} mol/mol	Ca/P
ΣΣΣEE					9	6	1.5
SΣΣEE					2	1	2.0
EΣΣEE					2	1	2.0
DΣΣEE					2	1	2.0
θθθEE					9	6	1.5
SθθEE					2	1	2.0
AΣAE					0	0	
IAΣAEA					0	0	
EAIASAEA					0	0	
AΣAΣAE					0	0	
AΣAΣAΣAE					2	1	1.5

Unión de fosfato de calcio por CPP y homólogos y análogos sintéticos					V _{Ca} mol/mol	V _{Pi} mol/mol	Ca/P
ΑΣΑΣΑΣΑΣΑΕ					6	4	1.5
α _{s1} (59-79)	QMEAEΣΙΣΣΣΕΕΙVPNΣVEQK				24	16	1.5
α _{s1} (63-70)	ΕΣΙΣΣΣΕΕ				12	8	1.5
α _{s1} (66-70)	ΣΣΣΕΕ				9	6	1.5
α _{s1} (71-78)	IVPNΣVEQK				0	0	
α _{s1} (59-63)	QMEAE				0	0	
β(1-25)	RELEELNVPGEIVEΣLΣΣΣΕESITR				24	16	1.5
β(14-21)	ΕΣLΣΣΣΕΕ				12	8	1.5

Σ = Ser(P), θ = Thr(P), E = Glu, D = Asp, S = Ser, A = Ala, I = Ile, Q = Gln, M = Met, V = Val, P = Pro, K = Lys, L = Leu, T = Thr, G = Gly y R = Arg.

Ejemplo 3 Estudios estructurales utilizando hidroxiapatita (HA)

5 De manera similar, investigamos la adsorción de CPP y homólogos y análogos sintéticos en HA (Tabla 2). Estos datos también confirman que la secuencia del agrupamiento Ser(P) es el determinante principal de la alta afinidad de unión y que los tres residuos de Ser(P) contiguos son esenciales puesto que la pérdida de cualquiera de ellos, aun cuando estuviera sustituido por Glu o Asp, resultó en una constante de afinidad K considerablemente menor como se muestra en la tabla 2.

TABLA 2.

Unión de CPP y péptidos sintéticos a HA a 37 °C					K ml/ μmol	N μmol/ m ²	Área molecular nm ²
α _{s1} (59-79)	QMEAEΣΙΣΣΣΕΕΙVPNΣVEQK				415	0.35	4.75
α _{s1} (63-70)	ΕΣΙΣΣΣΕΕ				10,370	0.47	3.56
α _{s1} (66-70)	ΣΣΣΕΕ				12,845	0.52	3.27
α _{s1} (71-78)	IVPNΣVEQK				-	-	-
α _{s1} (59-63)	QMEAE				-	-	-
	ΣΣΣΕΕ				12,845	0.52	3.27
	ΕΣΣΕΕ				1,513	0.96	1.74
	DΣΣΕΕ				6,579	0.81	2.04
	θθθΕΕ				12,234	0.51	3.27
	TθθΕΕ				1,013	0.55	3.03
	θTθΕΕ				837	0.44	3.77
	θθTEΕ				1,799	0.46	3.61

Σ = Ser(P), θ = Thr(P)

15 Curiosamente, la repetición de los experimentos de adsorción de HA con HA recubierta con saliva (sHA) reveló que el motivo del agrupamiento Ser(P) seguía siendo el determinante principal de la adsorción aunque las afinidades de los péptidos por sHA fueron ligeramente reducidas por la presencia de las proteínas salivales. Estos resultados sugieren que la interacción predominante del CPP con la película y la placa es probable que sea electrostática y sea mediada por el motivo del agrupamiento Ser(P) de CPP.

20 También estudiamos el ensamblaje del péptido Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- en tres planos cristalográficos de HA, {100}, {010} y {001} usando técnicas de simulación informática y las coordenadas de la celda de HA sintética. Estos estudios de simulación revelaron que es más probable que el péptido -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- se una a la superficie {100}, seguida de la superficie {010}. Por lo tanto el motivo del agrupamiento Ser(P) puede unirse a ambas

superficies {100} y {010} permitiendo que se depositen iones calcio, fosfato y oxhidrilo en la superficie {001} lo que permite el crecimiento del cristal de HA sólo a lo largo del eje c. Estos resultados, por consiguiente, pueden explicar ahora el crecimiento en el eje c de cristales de HA en el esmalte y la dentina. Un examen detallado de los datos de simulación informática muestra que el confórmero de -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- con la mayor energía de unión relativa se coloca sobre la superficie de HA de modo que los grupos carboxilo de los residuos glutamilo y los grupos fosforilo de los residuos fosfoserilo estén próximos a la superficie de HA con máximo contacto entre estos grupos y los átomos de calcio superficiales.

Ejemplo 4 Actividad anticariogénica de CCP-ACP en estudios en humanos in situ

La capacidad de la solución de CPP-ACP al 1.0% p/v de pH 7.0 para evitar la desmineralización del esmalte se estudió en un modelo humano de caries in situ. El modelo consiste en un aparato removible que contiene un par izquierdo y otro derecho de losas de esmalte colocadas para producir un sitio de retención de placa. La placa que se desarrolló entre el esmalte (3-5 mg) fue bacteriológicamente similar a la placa supragingival normal. Con la exposición frecuente a soluciones de sacarosa durante un período de tres semanas, el aumento en los niveles de estreptococos mutans y lactobacilos y en la desmineralización del esmalte subsuperficial produjo la formación de lesiones "tipo caries" incipientes.

Dos exposiciones de la solución de CPP-ACP por día al par derecho de las losas de esmalte en 12 sujetos produjeron una disminución de $51\% \pm 19\%$ en la pérdida mineral del esmalte en relación con la del lado izquierdo, control del esmalte. La placa expuesta a la solución de CPP-ACP contenía $78 \pm 22 \mu\text{mol/g}$ de calcio, $52 \pm 25 \mu\text{mol/g}$ de P_i y $2.4 \pm 0.7 \text{ mg/g}$ de CPP en comparación con $32 \pm 12 \mu\text{mol/g}$ de calcio y $20 \pm 11 \mu\text{mol/g}$ de P_i en la placa de control. El nivel de CPP se determinó por una técnica de ELISA competitiva usando un anticuerpo que reconoce tanto a $\alpha_{s1}(59-79)$ como a $\beta(1-25)$. Micrografías electrónicas de cortes de la placa teñidos inmunohistoquímicamente revelaron la localización del péptido predominantemente en la superficie de los microorganismos pero también en la matriz extracelular.

Aunque estos resultados indican que los CPP se incorporan en la placa dental en desarrollo, el nivel real determinado por ELISA no sería una representación verdadera de la incorporada, debido a la descomposición del CPP en la placa por la acción de las actividades de la fosfatasa y la peptidasa. La incorporación de CPP-ACP en la placa produjo un aumento de 2.4 veces en el calcio de la placa y de 2.6 veces en el P_i de la placa con una relación Ca/ P_i compatible con ACP.

Ejemplo 5 Potencial anticariogénico de CPP-ACP en un estudio de enjuague bucal

Un ensayo clínico de un enjuague bucal utilizado tres veces al día que contenía 3.0% de CPP-ACP de pH 9.0 demostró que el contenido de calcio de la placa supragingival (dientes anteriores inferiores excluidos) aumentó de $169 \pm 103 \mu\text{mol/g}$ en peso seco a $610 \pm 234 \mu\text{mol/g}$ después del uso del enjuague bucal durante un período de tres días, y el fosfato inorgánico aumentó de $242 \pm 60 \mu\text{mol/g}$ en peso seco a $551 \pm 164 \mu\text{mol/g}$. Estos niveles de calcio y fosfato inorgánico post-enjuague bucal son los mayores niveles reportados hasta la fecha para placa supragingival no mineralizada.

Sin querer quedar restringidos a ningún mecanismo propuesto para las ventajas observadas, se cree que el mecanismo de anticariogenicidad para CPP-ACP es la incorporación de fosfato de calcio amorfo en la placa, disminuyendo por consiguiente la desmineralización del esmalte y reforzando la remineralización. En la placa, CPP-ACP actuaría como un depósito de calcio y fosfato, amortiguando las actividades del calcio libre y del ión fosfato ayudando así a mantener un estado de sobresaturación en relación con el esmalte de los dientes. La unión de ACP a CPP es dependiente del pH con muy poca unión a valores inferiores a pH 7.0.

Ejemplo 6 Remineralización de las lesiones del esmalte por CPP-ACP

A. Estudios in vitro.

Se utilizó un sistema de remineralización del esmalte in vitro para estudiar la remineralización de lesiones artificiales en terceros molares humanos por soluciones de CPP-ACP. Mediante este sistema, una solución de CPP-ACP al 1.0% reemplazó $56 \pm 21\%$ de pérdida mineral. Una solución de CPP-ACP al 0.1% reemplazó $34 \pm 18\%$ de pérdida mineral. Se prepararon más soluciones que contenían diferentes cantidades de CPP (0.1-1.0%), calcio (6-60 mM) y fosfato (3.6-36 mM) a diferentes valores de pH (7.0-9.0). Se determinaron las asociaciones entre las actividades de las diversas especies de fosfato de calcio en solución y la tasa de remineralización de las lesiones del esmalte para esta serie de soluciones.

Se encontró que la actividad de la especie iónica neutra CaHPO_4^0 en las diversas soluciones de remineralización estaba muy correlacionada con la tasa de remineralización de las lesiones. El coeficiente de difusión para el proceso de remineralización se estimó en $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ que es compatible con los coeficientes de difusión para las

moléculas neutras a través de la matriz cargada. La tasa de remineralización del esmalte obtenida con la solución de CPP-ACP al 1.0% fue de 3.3×10^{-2} mol HA/m²/10 días que es la mayor tasa de remineralización obtenida hasta la fecha. Los iones de fosfato de calcio, en particular el par iónico neutro CaHPO₄⁰, luego de la difusión en la lesión del esmalte, se disociarán y aumentarán por consiguiente el grado de saturación con respecto a HA. La formación de HA en la lesión dará lugar a la generación de H₃PO₄, que al ser él también neutro, difundirá por la lesión a un gradiente de concentración descendente.

Los resultados indican que ACP unido a CPP, CPP[Ca₃(PO₄)_{1.87}(HPO₄)_{0.2}xH₂O]₈ actúa como un depósito de la especie ión neutro, CaHPO₄⁰, que se forma en presencia de ácido. El ácido puede ser generado por bacterias de la placa dental; en estas condiciones, el ACP unido a CPP amortiguaría el pH de la placa y produciría iones de calcio y fosfato, en particular CaHPO₄⁰. El aumento de CaHPO₄⁰ en la placa compensaría cualquier caída en el pH evitando así la desmineralización del esmalte. También se genera ácido en la placa como H₃PO₄ por formación de HA en la lesión del esmalte durante la remineralización. Esto explica por consiguiente por qué las soluciones de CPP-ACP son soluciones de remineralización tan eficaces, porque consumirían el H₃PO₄ producido durante la remineralización de la lesión del esmalte generando más CaHPO₄⁰ manteniendo así su gradiente de concentración en la lesión. Por lo tanto, estos resultados son compatibles con el mecanismo anticariogénico de CPP propuesto, que es la inhibición de la desmineralización del esmalte y el aumento de la remineralización a través de la localización de ACP en la superficie del diente.

B. Estudios de remineralización humana in situ

Se investigó la capacidad de CPP-ACP agregado a goma de mascar sin azúcar (sorbitol) para remineralizar el esmalte de lesiones subsuperficiales en un estudio doble ciego, aleatorizado y cruzado. Diez sujetos usaron aparatos palatinos removibles con seis, medias losas de esmalte humano encastradas, que contenían lesiones de desmineralizadas subsuperficiales. La otra mitad de cada losa de esmalte se almacenó en un recipiente humedecido y se usó como control de la lesión de desmineralizada. Hubo cuatro grupos de tratamiento en el estudio, goma de mascar sin azúcar que contenía 3.0% p/p de CPP-ACP, goma de mascar sin azúcar que contenía 1.0% p/p de CPP-ACP, goma de mascar sin azúcar sin CPP-ACP y un grupo de control sin goma de mascar. Las gomas de mascar se masticaron durante periodos de 20 minutos cuatro veces al día. Los aparatos se usaron durante este período de 20 minutos y durante otro período de 20 minutos después de masticar las gomas de mascar. Cada tratamiento fue de 14 días de duración y cada uno de los 10 sujetos llevó a cabo cada tratamiento con una de semana de descanso entre tratamientos. Al finalizar cada tratamiento se retiraron las losas de esmalte, se compararon con sus respectivos controles desmineralizados, se incluyeron en un medio, se cortaron y se sometieron a microrradiografía y análisis densitométrico de imágenes asistido por computadora para determinar el nivel de remineralización. El tratamiento con goma de mascar sin azúcar produjo una remineralización de $9.82 \pm 1.81\%$ con respecto al control sin goma de mascar mientras que la goma de mascar que contenía 1.0% de CPP-ACP produjo una remineralización de $1.7.06 \pm 2.48\%$ y la goma de mascar que contenía 3.0% de CPP-ACP produjo $22.70 \pm 3.40\%$ de remineralización siendo todos los valores significativamente diferentes. Estos resultados mostraron que la adición de 1.0% y 3.0% de CPP-ACP a goma de mascar sin azúcar produjo 74% y 131% de aumento respectivamente en la remineralización del esmalte sub-superficial.

Ejemplo 7 Estudio de enjuague bucal de CPP-ACFP

Se realizó un estudio de enjuague bucal para determinar la capacidad de un enjuague bucal de CPP-ACFP al 3.0% utilizado tres veces al día para aumentar los iones calcio, fosfato inorgánico y fluoruro de la placa supragingival. La solución de CPP-ACFP al 3.0% utilizada como enjuague bucal durante cuatro días contenía 192 mM de iones calcio unidos, 120 mM de iones fosfato unidos y 24 mM (456 ppm) de iones F unidos, estabilizados por CPP. El uso del enjuague bucal produjo un aumento de 1.9 veces en el calcio de la placa, un aumento de 1.5 veces en el fosfato de la placa y un aumento excepcional de 18 veces en el ión fluoruro de la placa como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3.

Efecto de CPP-ACFP en los niveles de Ca, P, y F en la placa			
	Ca μmol/g	P, μmol/g	F μmol/g
Control.	177 ± 53	306 ± 82	1.1 ± 0.9
3% de CPP - ACFP	336 ± 107	471 ± 113	19.9 ± 14.1
1000 ppm de F	158 ± 54	287 ± 29	1.9 ± 1.0
3% de CaCPP	193 ± 56	343 ± 102	1.5 ± 0.8

Aunque se encontraron esos marcados aumentos en el calcio, el fosfato y el fluoruro de la placa, no se observó cálculo dental en ninguno de los sujetos, lo que sugiere que el fluorofosfato de calcio permaneció estabilizado como

la fase amorfa por el CPP y no se transformó en una fase cristalina. Estos aumentos en los niveles de iones Ca, fosfato y fluoruro en la placa supragingival producidos por CPP-ACP son considerablemente mayores que los obtenidos en un estudio similar utilizando pastas dentífricas de CaCPP y 1000 ppm de F (MFP y NaF) dos veces al día durante un periodo de tiempo similar, como se indica en la tabla 3. Estos resultados muestran un marcado efecto sinérgico entre los iones fluoruro y el CPP-ACP. Esto es particularmente ventajoso teniendo en cuenta que el nivel de fluoruro en las composiciones orales como pasta dentífrica se puede entonces reducir, resultando en ahorro de costos y menor riesgo de fluorosis para individuos que viven en zonas de elevado fluoruro.

Ejemplo 8 Interacción de CPP-ACP con fluoruro

Se observó un efecto anticariogénico sinérgico de CPP-ACP al 1.0% junto con 500 ppm de F⁻ en un modelo de caries en ratas. El análisis de la solución que contenía CPP al 1.0%, CaCl₂ 60 mM, fosfato de sodio 36 mM y 500 ppm de F (NaF 26.3 mM) de pH 7.0 después de ultrafiltración reveló que casi la mitad del ión fluoruro se había incorporado en la fase de ACP estabilizada por CPP para producir una fase de fluoruro pentafluoruro de calcio amorfo de la composición Ca₈(PO₄)₅FxH₂O, con 24 moléculas de Ca, 15 de PO₄ y 3 de F por molécula de CPP.

Sin querer quedar restringidos por ningún mecanismo propuesto para el efecto beneficioso observado, consideramos que el mecanismo anticariogénico de CPP-ACP es la localización de ACP en la superficie del diente de modo que en presencia de ácido, el ACP se disocia para liberar iones Ca y fosfato, aumentando el grado de saturación con respecto a HA, evitando la desmineralización del esmalte y promoviendo la remineralización. El mecanismo anticariogénico del fluoruro es la localización de iones fluoruro en la superficie del diente, especialmente en la placa, en presencia de iones Ca y fosfato. Esta localización aumenta el grado de saturación con respecto a fluoroapatita (FA) promoviendo así la remineralización del esmalte con FA. Está claro que para la formación de FA [Ca₁₀(PO₄)₆F₂], los iones calcio y fosfato se deben colocalizar en la placa en la superficie del diente con el ión fluoruro. El efecto anticariogénico sinérgico de CPP-ACP y F es por lo tanto atribuible a la localización de ACP en la superficie del diente por el CPP que en efecto colocalizaría Ca, Pi y F.

Esto se demostró en el estudio del enjuague bucal descrito en el ejemplo 7.

Se prepararon soluciones metaestables de CPP a pH 7.0 que contenían fluorofosfato de calcio amorfo a concentraciones marcadamente elevadas. Por ejemplo, se preparó una solución de CPP-ACFP al 10% p/v que contenía Ca 640 mM, fosfato 400 mM y F 80 mM (1520 ppm de F⁻) a pH 7.0 así como un gel de CPP al 20% que contenía Ca 1.28 M, fosfato 800 mM y F 160 mM (3040 ppm de F⁻) a pH 7.0. Esta solución y este gel tienen una anticariogenicidad significativamente mayor en comparación con el fluoruro solo y por consiguiente son aditivos superiores para pastas dentífricas y enjuagues bucales y para uso profesional, para mejorar la eficacia de los dentífricos y productos actuales aplicados profesionalmente que contienen fluoruro.

A continuación se proporcionan ejemplos específicos de las formulaciones que contienen los complejos de la invención.

Ejemplo 9 Formulación de pastas dentífricas que contienen CPP-ACFP

Formulación 1

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50.0
Glicerol	20.0
Carboximetilcelulosa sódica	1.0
Laurilsulfato de sodio	1.5
Lauroilsarcosinato de sodio	0.5
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Gluconato de clorhexidina	0.01
Dextransa	0.01
CPP-ACFP	1.00
Agua	resto

ES 2 441 610 T3

Formulación 2

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	10.0
Carboximetilcelulosa sódica	1.0
Laurilsulfato de sodio	1.5
Lauroilsarcosinato de sodio	0.5
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Monofluorofosfato de sodio	0.3
Gluconato de clorhexidina	0.01
Dextranasa	0.01
CPP-ACFP	2.0
Agua	resto

Formulación 3

5

Ingrediente	% p/p
Fosfato dicálcico dihidratado	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	10.0
Carboximetilcelulosa sódica	1.0
Lauroil dietanolamida	1.0
Monolaurato de sacarosa	2.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Monofluorofosfato de sodio	0.3
Gluconato de clorhexidina	0.01
Dextranasa	0.01
CPP-ACFP	5.0
Agua	resto

Formulación 4

Ingrediente	% p/p
Sorbitol	22.0
Musgo irlandés	1.0
Hidróxido de sodio (50%)	1.0
Gantrez	19.0
Agua (desionizada)	2.69
Monofluorofosfato de sodio	0.76

ES 2 441 610 T3

Ingrediente	% p/p
Sacarina sódica	0.3
Pirofosfato	2.0
Alúmina hidratada	48.0
Esencia saborizante	0.95
CPP-ACFP	1.0
Laurilsulfato de sodio	2.00

Formulación 5

Ingrediente	% p/p
Poliacrilato de sodio	50.0
Sorbitol	10.0
Glicerol	20.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Monofluorofosfato de sodio	0.3
Gluconato de clorhexidina	0.01
Etanol	3.0
CPP-ACFP	2.0
Ácido linólico	0.05
Agua	resto

5 Ejemplo 10 Formulaciones de enjuagues bucales

Formulación 1

Ingrediente	% p/p
Etanol	20.0
Sabor	1.0
Sacarina sódica	0.1
Monofluorofosfato de sodio	0.3
Gluconato de clorhexidina	0.01
Lauroil dietanolamida	0.3
CPP-ACFP	2.0
Agua	resto

10 Formulación 2

Ingrediente	% p/p
Gantrez S-97	2.5
Glicerina	10.0
Esencia saborizante	0.4
Monofluorofosfato de sodio	0.05

ES 2 441 610 T3

Ingrediente	% p/p
Gluconato de clorhexidina	0.01
Lauroil dietanolamida	0.2
CPP-ACFP	2.0
Agua	resto

Ejemplo 11 Formulación de pastillas

Ingrediente	% p/p
Azúcar	75-80
Jarabe de maíz	1-20
Esencia saborizante	1-2
NaF	0.01-0.05
CPP-ACFP	3.0
Estearato de Mg	1-5
Agua	resto

5 Ejemplo 12 Formulación de crema para masaje gingival

Ingrediente	% p/p
Petrolato blanco	8.0
Propilenglicol	4.0
Alcohol estearílico	8.0
Polietilenglicol 4000	25.0
Polietilenglicol 400	37.0
Monoestearato de sacarosa	0.5
Gluconato de clorhexidina	0.1
CPP-ACFP	3.0
Agua	resto

Ejemplo 13 Formulación de goma de mascar

Ingrediente	% p/p
Base de goma	30.0
Carbonato de calcio	2.0
Sorbitol cristalino	53.0
Glicerina	0.5
Esencia saborizante	0.1
CPP-ACFP	2.0
Agua	resto

10

Ejemplo 14 Complemento alimenticio

Se agregó CPP-ACP a una concentración de 1.0% p/p a la dieta de gallinas raquílicas para determinar la capacidad del CPP-ACP para suministrar calcio disponible para el acrecentamiento del hueso. CPP-ACP a una concentración

de 1.0% p/p en la dieta produjo una reducción del 34% en la incidencia de anomalías en la placa de crecimiento, un aumento de 17% en la ceniza tibial y una reducción de 22% en la placa de crecimiento cartilaginosa en los animales, que fue significativamente mayor que con CPP solo (cuadro 4) lo que indica que CPP-ACP es superior a CPP en el suministro de calcio biodisponible de la dieta y en facilitar el acrecentamiento del hueso.

5

TABLA 4.

Efecto de la adición de 1.0% p/p de CPP-ACP a la dieta de gallinas raquílicas en la incidencia de anomalías en la placa de crecimiento, la ceniza tibial y el ancho de la placa de crecimiento cartilaginosa			
	Anomalías de crecimiento %	Ceniza tibial %	Ancho de la placa de crecimiento (mm)
Control	53 ± 5	30 ± 2	5.4 ± 0.2
1.0% de CPP	47 ± 9	30 ± 2	5.3 ± 0.2
1.0% de CPP-ACP	35 ± 3	35 ± 1	4.2 ± 0.2

Se debe sobreentender que, aunque la invención se ha descrito detalladamente para que sea clara y comprensible, los ejemplos tienen fines meramente ilustrativos. Otras modificaciones de las realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica de la biología molecular, los diagnósticos dentales y disciplinas relacionadas, y se engloban en el alcance de la invención según se describe.

10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Melbourne

<120> Complejos de fluoruro de calcio y fosfopéptido

<130> 68830

5 <140> EP 10184405.8
<141> 30-09-2010

<150> AU PO5662
<151> 13-03-1997

<160> 24

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Alfa-S caseína

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> FOSFORILACIÓN

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> FOSFORILACIÓN

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> FOSFORILACIÓN

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> FOSFORILACIÓN

35 <400> 1
Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn
1 5 10 15

Ser Val Glu Gln Lys
20

<210> 2
<211> 25
<212> PRT

ES 2 441 610 T3

<213> Beta caseína

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
5 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> FOSFORILACIÓN

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> FOSFORILACIÓN

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 2
Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg
20 25

20 <210> 3
<211> 25
<212> PRT
<213> Alfa-S caseína

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
30 <221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
35 <221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> FOSFORILACIÓN

40 <400> 3

ES 2 441 610 T3

Asn Ala Asn Glu Glu Glu Tyr Ser Ile Gly Ser Ser Ser Glu Glu Ser
 1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Thr Glu Glu Val Lys
 20 25

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 5 <213> Alfa-S caseína

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> FOSFORILACIÓN

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> FOSFORILACIÓN

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> FOSFORILACIÓN

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 4
 Lys Asn Thr Met Glu His Val Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Ile Ser
 1 5 10 15

Gln Glu Thr Tyr Lys
 20

25 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Alfa-S caseína o beta caseína

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> FOSFORILACIÓN

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> FOSFORILACIÓN

40 <400> 5

ES 2 441 610 T3

Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>
<221> MOD_RES
10 <222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 6
Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

<210> 7
<211> 5
20 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN

<220>
<221> MOD_RES
30 <222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 7
Glu Ser Ser Glu Glu
1 5

<210> 8
<211> 5
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)

<223> FOSFORILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 5 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 8
 Asp Ser Ser Glu Glu
 1 5

<210> 9
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 20 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 9
 Thr Thr Thr Glu Glu
 1 5

<210> 10
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 10

ES 2 441 610 T3

Ser Thr Thr Glu Glu
1 5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (2)..(2)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 11

Ala Ser Ala Glu

1

<210> 12

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

20 <220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> FOSFORILACIÓN

<400> 12

Ile Ala Ser Ala Glu Ala

25 1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

35 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 13

Glu Ala Ile Ala Ser Ala Glu Ala

1 5

<210> 14

<211> 6

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 441 610 T3

- <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- 5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN
- 10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> FOSFORILACIÓN
- <400> 14
Ala Ser Ala Ser Ala Glu
1 5
- 15 <210> 15
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- 20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN
- 25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> FOSFORILACIÓN
- 30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> FOSFORILACIÓN
- <400> 15
Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Glu
1 5
- 35 <210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN
- 45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)

<223> FOSFORILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)

5 <223> FOSFORILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> FOSFORILACIÓN

10 <400> 16
 Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser Ala Glu
 1 5 10

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT

15 <213> Alfa-S caseína

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> FOSFORILACIÓN

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> FOSFORILACIÓN

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> FOSFORILACIÓN

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 17
 Glu Ser Ile Ser Ser Ser Glu Glu
 1 5

35 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Alfa-S caseína

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 18
 Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys
 1 5

<210> 19

ES 2 441 610 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Alfa-S caseína

<400> 19
Gln Met Glu Ala Glu
5 1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Beta caseína

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> FOSFORILACIÓN

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> FOSFORILACIÓN

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 20
Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

30 <210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> FOSFORILACIÓN

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN

ES 2 441 610 T3

- <400> 21
Thr Thr Thr Glu Glu
1 5
- 5 <210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- 10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> FOSFORILACIÓN
- 15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN
- <400> 22
Thr Thr Thr Glu Glu
1 5
- 20 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- 25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> FOSFORILACIÓN
- 30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> FOSFORILACIÓN
- <400> 23
Thr Thr Thr Glu Glu
1 5
- 35 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> Péptido sintético homólogo o análogo al péptido derivado de alfa-S o beta caseína
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> FOSFORILACIÓN

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

5 <223> FOSFORILACIÓN

<400> 24

Thr Thr Thr Glu Glu

1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo de fosfato/fluoruro de calcio estable, incluido un fosfato/fluoruro de calcio amorfo estabilizado por un fosfopéptido, donde dicho fosfopéptido incluye la secuencia de aminoácidos Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu y donde el complejo se forma por la titulación de iones calcio, fosfato y fluoruro manteniendo simultáneamente el pH por encima de 7 en presencia de dicho fosfopéptido.
- 10 2. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho fosfopéptido incluye una secuencia de aminoácidos elegida entre cualquiera de las siguientes:
- [1] Gln⁵⁹-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys⁷⁹.
 $\alpha_{s1}(59-79)$
 [2] Arg¹-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg²⁵. $\beta(1-25)$
 15 [3] Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰. $\alpha_{s2}(46-70)$
 [4] Lys¹-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys²¹.
 $\alpha_{s2}(1-21)$.
- 20 3. Un método para producir un complejo de fosfato/fluoruro de calcio estable, incluida una forma básica de un fosfato/fluoruro de calcio amorfo estabilizada por un fosfopéptido, donde dicho fosfopéptido incluye la secuencia de aminoácidos Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, que incluye los pasos de:
- 25 (i) obtener una solución de fosfopéptido con un pH por encima de 7;
 (ii) mezclar (i) con soluciones que comprendan calcio, fosfato y fluoruro inorgánicos, y mantener el pH por encima de 7.
- 30 4. Un complejo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que se produce de acuerdo con el método de la reivindicación 3.
5. Una composición oral que incluye, como principio activo, un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4.
- 35 6. Una composición oral de acuerdo con la reivindicación 5 que es uno de los siguientes: pasta dentífrica, polvo dentífrico, dentífricos líquidos, enjuague bucal, trociscos, goma de mascar, pasta dental, crema para masaje gingival, comprimidos para gargarismos, productos lácteos y otros productos alimenticios.
- 40 7. Una composición farmacéutica que contiene un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 en combinación con un excipiente farmacéutico.
8. Un complemento alimenticio que contiene un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4.
- 45 9. El uso de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 para la elaboración de una composición oral para el tratamiento o la prevención de las caries dentales o la erosión dental.
10. El uso de un complejo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 para la elaboración de una composición oral para la remineralización del esmalte de los dientes.
- 50 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 donde la composición se administra tópicamente.