

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 456**

51 Int. Cl.:

**A61K 6/00** (2006.01)

**A61Q 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2011 PCT/US2011/048976**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027477**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2011 E 11749707 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2608761**

54 Título: **Métodos y materiales para proporcionar un aspecto blanco a los dientes**

30 Prioridad:

**24.08.2010 US 376523 P**

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

**09.12.2016**

73 Titular/es:

**SAFEWHITE, INC. (100.0%)  
5500 Frantz Rd, Suite 120  
Dublin, OH 43017, US**

72 Inventor/es:

**BRIDGEMAN, SCOTT JOSEPH;  
BRODY, RICHARD SIMON y  
ZUPANCIC, THOMAS JOEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 593 456 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

Métodos y materiales para proporcionar un aspecto blanco a los dientes

5 **Antecedentes****1. Campo técnico**

10 Este documento presenta métodos y materiales que intervienen para proporcionar a los dientes un aspecto blanco. Por ejemplo, este documento presenta métodos y materiales para poner en contacto los dientes con uno o más polipéptidos emisores de fluorescencia (por ejemplo, una proteína fluorescente azul) para proporcionar a los dientes un aspecto más blanco.

**2. Información de antecedentes**

15 En general, los dientes blancos se consideran cosméticamente deseables. Sin embargo, los dientes pueden decolorarse en ausencia de intervención. La estructura del diente que generalmente es responsable de presentar un aspecto con manchas es la capa de esmalte. Varios factores pueden contribuir a la decoloración del esmalte. Por ejemplo, la formación de matrices de placa y sarro sobre la superficie del diente puede atrapar manchas, ocasionando de esta manera la decoloración del esmalte.

20 Se han desarrollado preparaciones blanqueadoras de dientes que pueden comprarse sin receta para abordar la preferencia cosmética de muchas personas para restaurar el lustre en el esmalte de los dientes decolorado por materiales atrapados en la superficie. Aunque todos los dentífricos y colutorios contienen algunos agentes limpiadores y de pulido, algunos depósitos de esmalte no pueden eliminarse completamente por esos agentes en las condiciones de uso normales. Los fumadores con frecuencia desarrollan un esmalte decolorado debido a que los alquitranes y materiales en forma de partículas presentes en el humo exhalado del cigarrillo se acumulan en el diente. En algunos casos, los alimentos y las bebidas (por ejemplo, el té) pueden manchar o decolorar el esmalte de los dientes.

30 **Sumario**

35 Este documento proporciona métodos y materiales para proporcionar a los dientes un aspecto blanco. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para poner en contacto los dientes con uno o más polipéptidos emisores de fluorescencia (por ejemplo, una proteína fluorescente azul (BFP)) para proporcionar al diente un aspecto más blanco. Como se describe en el presente documento, pueden aplicarse polipéptidos emisores de fluorescencia tales como polipéptidos BFP a los dientes en condiciones que permitan que los polipéptidos emisores de fluorescencia se unan o se adhieran directa o indirectamente a los dientes. En estos casos, los polipéptidos emisores de fluorescencia pueden emitir fluorescencia a una longitud de onda particular. En el caso de los polipéptidos BFP, los polipéptidos BFP pueden emitir fluorescencia en el intervalo de aproximadamente 440 nm a aproximadamente 500 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 450 nm y aproximadamente 490 nm), que, cuando se emite desde los dientes, proporciona a los dientes un aspecto blanco. Este aspecto blanco puede existir, aunque los dientes subyacentes no presenten ese color blanco de forma natural. Por ejemplo, los métodos y materiales proporcionados en el presente documento pueden hacer que una persona tenga los dientes blancos, aunque los dientes estén manchados. De esta manera, el aspecto del diente puede obtenerse usando los métodos y materiales proporcionados en el presente documento sin un blanqueamiento riguroso (por ejemplo, sin tratamientos de blanqueamiento dental tales como los que implican peróxido de hidrógeno o peróxido de carbimida) o técnicas de eliminación de manchas.

50 En general, un aspecto de este documento presenta un método para alterar el aspecto de los dientes. El método comprende, o consiste esencialmente en, aplicar un polipéptido emisor de fluorescencia a los dientes, donde la fluorescencia emitida desde el polipéptido emisor de fluorescencia altera el aspecto de los dientes. Los dientes pueden ser dientes humanos. El método puede comprender alterar el aspecto de los dientes de tal forma que los dientes parezcan más blancos. El polipéptido emisor de fluorescencia puede ser un polipéptido BFP. El polipéptido emisor de fluorescencia puede estar conjugado con una molécula que tiene la capacidad de interactuar o de unirse a un diente o a un componente del diente. La molécula puede ser un polipéptido. La molécula puede ser un polipéptido de caseína. La molécula puede ser un polipéptido de estaterina. La molécula puede ser una molécula que tiene la capacidad de interactuar o de unirse al esmalte, a hidroxiapatita o a la película dental adquirida. El polipéptido emisor de fluorescencia puede ser un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos y un polipéptido de caseína. El polipéptido emisor de fluorescencia puede ser un polipéptido de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos y un polipéptido de estaterina. El polipéptido emisor de fluorescencia puede estar presente dentro de la pasta de dientes, y la etapa de aplicación puede comprender aplicar la pasta de dientes a los dientes. El polipéptido emisor de fluorescencia puede ser una unidad de un polímero que comprende dos o más polipéptidos emisores de fluorescencia. El polímero puede unirse a un polipéptido de caseína para formar un complejo, donde el complejo se aplica a los dientes.

En otro aspecto, este documento presenta una composición que comprende, o que consiste esencialmente en, un polipéptido emisor de fluorescencia y un polipéptido de caseína.

5 En otro aspecto, este documento presenta una composición que comprende, o que consiste esencialmente en, un polipéptido emisor de fluorescencia y un polipéptido de estaterina.

10 En otro aspecto, este documento presenta un polipéptido quimérico que comprende, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos de 20 o más restos de longitud de un polipéptido emisor de fluorescencia y una secuencia de aminoácidos de 20 o más restos de longitud de un polipéptido de caseína. El polipéptido quimérico puede comprender un polipéptido emisor de fluorescencia de longitud completa o un fragmento del mismo que sea idéntico en al menos aproximadamente un 90 por ciento al polipéptido emisor de fluorescencia de longitud completa. El polipéptido quimérico puede comprender un polipéptido de caseína de longitud completa o un fragmento del mismo que sea idéntico en al menos aproximadamente un 80 por ciento al polipéptido de caseína de longitud completa. El polipéptido quimérico puede comprender la capacidad de emitir fluorescencia y la capacidad de interactuar o de unirse a un diente o a un componente del diente.

20 En otro aspecto, este documento presenta un polipéptido quimérico, que comprende, o que consiste esencialmente en, una secuencia de aminoácidos de 20 o más restos de longitud de un polipéptido emisor de fluorescencia y una secuencia de aminoácidos de 20 o más restos de longitud de un polipéptido de estaterina. El polipéptido quimérico puede comprender un polipéptido emisor de fluorescencia de longitud completa o un fragmento del mismo que sea idéntico en al menos aproximadamente un 90 por ciento al polipéptido emisor de fluorescencia de longitud completa. El polipéptido quimérico puede comprender un polipéptido de estaterina de longitud completa o un fragmento del mismo que sea idéntico en al menos aproximadamente un 80 por ciento al polipéptido de estaterina de longitud completa. El polipéptido quimérico puede comprender la capacidad de emitir fluorescencia y la capacidad de interactuar o de unirse a un diente o a un componente del diente.

30 A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse métodos o materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no deben considerarse limitantes.

35 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes tras la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

**Descripción de los dibujos**

40 La Figura 1 es un listado de una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica un polipéptido BFP a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso U70497.1; GI n.º 1619752).  
 La Figura 2 es un listado de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de un polipéptido BFP a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso AAB16959.1; GI n.º 1619753).  
 La Figura 3 es un listado de una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) que codifica un polipéptido de  $\alpha$ -caseína a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso NM\_181029.2; GI n.º 31341348).  
 La Figura 4 es un listado de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de un polipéptido de  $\alpha$ -caseína a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso NP\_851372.1; GI n.º 30794348).  
 La Figura 5 es un listado de una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 5) que codifica un polipéptido de  $\beta$ -caseína a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso BC111172.1; GI n.º 83406092).  
 La Figura 6 es un listado de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de un polipéptido de  $\beta$ -caseína a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso AAI11173.1; GI n.º 83406093).  
 La Figura 7 es un listado de una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 7) que codifica un polipéptido de estaterina a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso AAH67219.1; GI n.º 45501309).  
 La Figura 8 es un listado de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de un polipéptido de estaterina a modo de ejemplo (GenBank n.º de acceso BC067219.1; GI n.º 45501308).  
 La Figura 9 es un listado de una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de un polipéptido BFP a modo de ejemplo.  
 La Figura 10 contiene fotografías de un diente al inicio (izquierda), después de aplicar un conjugado de polipéptido de  $\beta$ -caseína/BFP (centro), y después de realizar un pulido con piedra pómez (derecha). El diente presentó un aspecto más blanco después de aplicar un conjugado de polipéptido de  $\beta$ -caseína/BFP que al principio. Este aspecto más blanco se perdió después del pulido.

**Descripción detallada**

65 Este documento proporciona métodos y materiales para proporcionar a los dientes un aspecto blanco. La presente invención proporciona métodos y materiales para poner en contacto los dientes con una proteína fluorescente azul (BFP) conjugada con una molécula que tiene la capacidad de interactuar con o unirse a un diente o a un componente del diente para proporcionar al diente un aspecto más blanco.

Como se describe en el presente documento, a los dientes se les pueden aplicar polipéptidos emisores de fluorescencia de tal forma que se emita fluorescencia desde los dientes. A los dientes se les puede aplicar cualquier polipéptido emisor de fluorescencia apropiado. Por ejemplo, cuando se desea tener los dientes con un aspecto más blanco, puede aplicarse un polipéptido que emite fluorescencia azul a los dientes de una persona. Dicha fluorescencia azul puede tener una longitud de onda de emisión comprendida entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 500 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 450 nm y aproximadamente 500 nm, entre aproximadamente 460 nm y aproximadamente 500 nm, entre aproximadamente 470 nm y aproximadamente 500 nm, entre aproximadamente 480 nm y aproximadamente 500 nm, entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 490 nm, entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 480 nm, entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 470 nm, entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 460 nm, entre aproximadamente 450 nm y aproximadamente 490 nm, o entre aproximadamente 460 nm y aproximadamente 480 nm). En algunos casos, a los dientes se les puede aplicar, como se describe en el presente documento, un polipéptido emisor de fluorescencia que emite fluorescencia a una longitud de onda de emisión comprendida entre aproximadamente 420 nm y aproximadamente 450 nm, entre aproximadamente 430 nm y aproximadamente 450 nm, entre aproximadamente 440 nm y aproximadamente 450 nm, entre aproximadamente 420 nm y aproximadamente 440 nm, o entre aproximadamente 485 nm y aproximadamente 505 nm.

Cuando se desea tener los dientes de un color diferente, a los dientes de la persona se les puede aplicar un polipéptido que emite fluorescencia en el espectro rojo, verde o amarillo. La fluorescencia roja puede tener una longitud de onda de emisión comprendida entre aproximadamente 555 nm y aproximadamente 655 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 565 nm y aproximadamente 645 nm, entre aproximadamente 575 nm y aproximadamente 635 nm, o entre aproximadamente 585 nm y aproximadamente 625 nm). La fluorescencia verde puede tener una longitud de onda de emisión comprendida entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 525 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 505 nm y aproximadamente 520 nm o entre aproximadamente 510 nm y aproximadamente 515 nm). La fluorescencia amarilla puede tener una longitud de onda comprendida entre aproximadamente 525 nm y aproximadamente 555 nm (por ejemplo, entre aproximadamente 530 nm y aproximadamente 550 nm o 535 nm y aproximadamente 545 nm). En algunos casos, a los dientes de una persona se les puede aplicar una combinación de diferentes polipéptidos emisores de fluorescencia. Por ejemplo, a los dientes de una persona se les puede aplicar una combinación de polipéptidos BFP y polipéptidos de proteína fluorescente roja (RFP). En algunos casos, a los dientes de una persona se les puede aplicar una combinación de polipéptidos RFP y polipéptidos de proteína fluorescente verde (GFP).

Cualquier polipéptido BFP apropiado puede usarse como se describe en el presente documento. Los ejemplos de polipéptidos BFP que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, EBFP (por ejemplo, un EBFP que tiene un máximo de emisión de 460 nm), proteína fluorescente SBFP1 (GenBank® n.º de acceso ABM97856; GI n.º 124264536), proteína fluorescente SBFP2 (GenBank® n.º de acceso ABM97857, GI n.º 124264538), EBFP2 (GenBank® n.º de acceso EF517318, GI n.º 145666498), Azurite (Mena *et al.*, Nature Biotechnology, 24: 1569-1571 (2006)), mKalama1 (GenBank® n.º de acceso EF517317, GI n.º 145666496), proteína 383 con dedos de zinc (GenBank® n.º de acceso EDU39924.1, GI n.º 187972425), SEQ ID NO: 445 presentada en la patente de Estados Unidos n.º 7.166.424 (GenBank® n.º de acceso ABN30727.1; GI n.º 125148618), proteína fluorescente azul modificada soluble (smBFP) (GenBank® n.º de acceso U70497.1; GI n.º 1619752), polipéptidos que tienen la secuencia indicada en GenBank® n.º de acceso CAE00365.1 (GI n.º 32260521), polipéptidos que tienen la secuencia indicada en GenBank® n.º de acceso CAE00361.1 (GI n.º 32260509), polipéptidos que tienen la secuencia indicada en GenBank® n.º de acceso CAE00361.1 (GI n.º 32260509), polipéptidos ECFP (GenBank® n.º de acceso ACO48275.1; GI n.º 226331138), polipéptidos Cerulean (GenBank® n.º de acceso ADE48834.1; GI n.º 293612838), polipéptidos de la proteína fluorescente Cypet (GenBank® n.º de acceso 3GEX\_A; GI n.º 290789997), polipéptidos MiCy (GenBank® n.º de acceso ADE48830.1; GI n.º 293612833), y polipéptidos de proteína fluorescente mTFP1 (GenBank® n.º de acceso ACO48263.1; GI n.º 226320339). En algunos casos, puede usarse como se describe en el presente documento un polipéptido BFP indicado en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2010/0062460.

Cualquier polipéptido RFP y polipéptido GFP apropiados pueden usarse como se describe en el presente documento. Los ejemplos de polipéptidos RFP que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos de la proteína fluorescente verde con desplazamiento al rojo modificada soluble (smRSGFP) (GenBank® n.º de acceso U70496.1; GI No.1619750), polipéptidos de la proteína fluorescente roja que tiene la secuencia indicada en GenBank® n.º de acceso AAG16224.1 (GI n.º 10304307); ABO38175.1 (GI No.133753343); o AAU06852.1 (GI n.º 51593130), polipéptidos de la proteína de tipo Gfp de emisión naranja (GenBank® n.º de acceso Z2MW\_D; GI n.º 209870302), polipéptidos de la proteína fluorescente mOrange (GenBank® n.º de acceso ACO48285.1; GI n.º 226331152), polipéptidos de NLS-dTomato (GenBank® n.º de acceso ADC42843.1; GI n.º 288188779), polipéptidos de tdTomato de la proteína fluorescente roja (GenBank® n.º de acceso ACQ43939.1; GI n.º 228484713), polipéptidos DsRed (GenBank® n.º de acceso BAE53441.1; GI n.º 83016748), polipéptidos DsRed2 (GenBank® n.º de acceso AAV73970.1; GI n.º 56119204), polipéptidos de DsRed-Express (GenBank® n.º de acceso ACU30027.1; GI n.º 255689290), polipéptidos DsRed-Monómero (GenBank® n.º de acceso ACF35425.1; GI n.º 194245628), polipéptidos de la proteína fluorescente naranja-roja monoméricos (GenBank® n.º de acceso AAV52170.1; GI n.º 55420625), polipéptido de la proteína fluorescente naranja-roja

monomérico (GenBank® n.º de acceso AAV52166.1; GI n.º 55420617), polipéptidos mCherry (GenBank® n.º de acceso ACY24904.1; GI n.º 262089840), polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 indicada en la patente de Estados Unidos n.º 7.393.923 (GenBank® n.º de acceso ACH06540.1; GI n.º 197013979), y polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 indicada en la patente de Estados Unidos 7.393.923 (GenBank® n.º de acceso ACH06541.1; GI n.º 197013980).

Los ejemplos de polipéptidos GFP que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos de la proteína fluorescente verde modificada soluble (smGFP) (GenBank® n.º de acceso U70495.1; GI n.º 1619748), polipéptido de la proteína fluorescente verde modificada GFP-ER (mfgp4-ER) (GenBank® n.º de acceso U87625.1; GI n.º 1842446), polipéptidos GFP (GenBank® n.º de acceso ACJ06700.1, GI n.º 210076685), polipéptidos GFP mejorados (GenBank® n.º de acceso ACV20892.1; GI n.º 256708579), polipéptidos turboGFP (GenBank® n.º de acceso ADD23343.1; GI n.º 290131407), polipéptidos GFP VisGreen (GenBank® n.º de acceso ABR26680.1; GI n.º 149393496), y polipéptidos Azami-Green (GenBank® n.º de acceso BAD52001.1; GI n.º 52839539).

En algunos casos, un polipéptido emisor de fluorescencia tal como los descritos en Subach *et al.* (Chem. Biol., 15:1116-1124 (2008)) puede usarse como se describe en el presente documento. Véase también GenBank® n.º de acceso 3M24\_A (GI n.º 296863586), GenBank® n.º de acceso 3M24\_B (GI:296863587), GenBank® n.º de acceso 3M24\_C (GI:296863588), y GenBank® n.º de acceso 3M24\_D (GI:296863589). Otros ejemplos de polipéptidos emisores de fluorescencia que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, los descritos en otras partes (Alieva *et al.* PLoS ONE, 3 (7): e2680 (2008) y Chudafov *et al.*, Physiol. Rev., 90: 1103-1163 (2010)). Véase, por ejemplo, la Tabla 1 de la referencia de Alieva *et al.* y las Figuras 5, 10, 12, y 14 de la referencia de Chudafov *et al.* En algunos casos, puede usarse un polipéptido emisor de fluorescencia coral como se describe en el presente documento. En algunos casos, puede usarse como se describe en el presente documento un polipéptido emisor de fluorescencia que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la Figura 2 o 9 o que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia indicada en la Figura 1.

Para fabricar un polipéptido emisor de fluorescencia puede usarse cualquier método apropiado. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de expresión de polipéptidos (por ejemplo, técnicas de expresión heterólogas usando células bacterianas, células de insecto o células de mamífero) para fabricar un polipéptido emisor de fluorescencia. En algunos casos, los polipéptidos emisores de fluorescencia tales como polipéptidos BFP pueden obtenerse como se describe en otras partes (Yakhnin *et al.*, Protein Expr. Purif., 14: 382-386 (1998) y Jain *et al.*, J. Chromatography A, 1035: 83-86 (2004)). En algunos casos, pueden usarse técnicas de síntesis de polipéptidos convencionales (por ejemplo, técnicas de síntesis de polipéptidos en fase líquida o técnicas de síntesis de polipéptidos en fase sólida) para producir polipéptidos emisores de fluorescencia de forma sintética.

Un polipéptido emisor de fluorescencia puede unirse o adherirse a un diente a través de una molécula (por ejemplo, un polipéptido) que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente (por ejemplo, esmalte, hidroxiapatita, película dental adquirida, cemento, corona, cuello, límite amelocementario, o ápex). Por ejemplo, un polipéptido emisor de fluorescencia puede unirse de forma covalente o no covalente a un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de caseína, un polipéptido de estaterina o un fragmento de los mismos). Los ejemplos de polipéptidos de caseína que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos de caseína  $\alpha$  (por ejemplo, polipéptidos de caseína  $\alpha$ -S1 y polipéptidos de caseína  $\alpha$ -S2), polipéptidos de caseína  $\beta$  (por ejemplo, polipéptidos de caseína A1  $\beta$  y polipéptidos de caseína A2  $\beta$ ), polipéptidos de caseína  $\gamma$  (por ejemplo, polipéptidos de caseína  $\gamma$ 1, polipéptidos de caseína  $\gamma$ 2 y polipéptidos de caseína  $\gamma$ 3), polipéptidos de caseína  $\delta$  y polipéptidos de caseína  $\epsilon$ . En algunos casos, puede usarse como se describe en el presente documento un polipéptido de caseína que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la Figura 4 o 6 o que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia indicada en la Figura 3 o 5.

En algunos casos, un polipéptido de caseína puede ser una parte de un polipéptido de caseína de longitud completa siempre que la parte tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Por ejemplo, un polipéptido de caseína que puede usarse como se describe en el presente documento puede ser un polipéptido que incluye un dominio aniónico (por ejemplo, restos de aminoácido 59 a 79 de un polipéptido de caseína  $\alpha$ -S1 bovina de longitud completa, restos de aminoácido 2 a 20 de un polipéptido de caseína  $\alpha$ -S2 bovina de longitud completa o restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de caseína  $\beta$  bovina de longitud completa) de un polipéptido de caseína.

En algunos casos, un polipéptido de caseína puede ser (a) un polipéptido que consiste en los restos de aminoácido 59 a 79 de un polipéptido de caseína  $\alpha$ -S1 bovina de longitud completa, (b) un polipéptido que no tiene más de 50 restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, no más de 45, 40, 35, 30 o 25 restos de aminoácido de longitud) siempre que el polipéptido incluya los restos de aminoácido 59 a 79 de un polipéptido de una caseína  $\alpha$ -S1 bovina de longitud completa, o (c) un polipéptido que incluye los restos de aminoácido 59 a 79 de un polipéptido de caseína  $\alpha$ -S1 bovina de longitud completa con cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácido en comparación con los restos de aminoácido 59 a 79 de un polipéptido de caseína  $\alpha$ -S1 bovina de longitud completa. En algunos casos, un polipéptido de caseína puede ser (a) un polipéptido que consiste en los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de caseína  $\beta$  bovina de longitud completa, (b) un polipéptido que no tiene más de 50 restos

- de aminoácido de longitud (por ejemplo, no más de 45, 40, 35 o 30 restos de aminoácido de longitud) siempre que el polipéptido incluya los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de caseína  $\beta$  bovina de longitud completa, o (c) un polipéptido que incluye los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de caseína  $\beta$  bovina de longitud completa con cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos en comparación con los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de  $\beta$  caseína bovina de longitud completa. En algunos casos, puede fabricarse (por ejemplo, sintetizarse) un polipéptido de caseína de manera que incluya uno o más restos de cisteína para facilitar la conjugación del polipéptido de caseína con un polipéptido emisor de fluorescencia (por ejemplo, un polipéptido BFP).
- 5
- 10 Un polipéptido de caseína que puede usarse como se describe en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que existe de forma natural en cualquier tipo de mamífero. Por ejemplo, un polipéptido de caseína que puede usarse como se describe en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que aparece de forma natural en un ser humano, vaca, cabra, oveja, caballo, ratón, rata, mono, perro, gato, orangután, chimpancé, cerdo, caballo, elefante o zarigüeya. En algunos casos, un polipéptido de caseína bovina se conjuga con un polipéptido emisor de fluorescencia para formar un conjugado de polipéptido de caseína/polipéptido emisor de fluorescencia que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente.
- 15
- 20 Los ejemplos de polipéptidos de estaterina que pueden usarse como se describe en el presente documento incluyen, sin limitación, polipéptidos de estaterina humana, polipéptidos de estaterina bovina y polipéptidos de estaterina salival. En algunos casos, un polipéptido de estaterina puede ser una parte de un polipéptido de estaterina de longitud completa siempre que esa parte tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Por ejemplo, un polipéptido de estaterina que puede usarse como se describe en el presente documento puede ser un polipéptido que incluye un dominio altamente negativo (por ejemplo, restos de aminoácido 1 a 15 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa) de un polipéptido de estaterina.
- 25
- 30 En algunos casos, un polipéptido de estaterina puede ser (a) un polipéptido que consiste en los restos de aminoácido 1 a 15 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, (b) un polipéptido que no tiene más de 50 restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, no más de 45, 40, 35, 30, 25, o 20 restos de aminoácido de longitud) siempre que el polipéptido incluya los restos de aminoácido 1 a 15 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, o (c) un polipéptido que incluye los restos de aminoácido 1 a 15 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa con cero, uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácido en comparación con los restos de aminoácido 1 a 15 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa. En algunos casos, un polipéptido de estaterina puede ser (a) un polipéptido que consiste en los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, (b) un polipéptido que no tiene más de 50 restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, no más de 45, 40, 35 o 30 restos de aminoácido de longitud) siempre que el polipéptido incluya los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, o (c) un polipéptido que incluye los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa con cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácido en comparación con los restos de aminoácido 1 a 25 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa. En algunos casos, un polipéptido de estaterina puede ser (a) un polipéptido que consiste en los restos de aminoácido 19 a 43 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, (b) un polipéptido que no tiene más de 50 restos de aminoácido de longitud (por ejemplo, no más de 45, 40, 35, 30, o 25 restos de aminoácido de longitud) siempre que el polipéptido incluya los restos de aminoácido 19 a 43 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa, o (c) un polipéptido que incluye los restos de aminoácido 19 a 43 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa con cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácido en comparación con los restos de aminoácido 19 a 43 de un polipéptido de estaterina humana de longitud completa. En algunos casos, un polipéptido de estaterina puede fabricarse (por ejemplo, sintetizarse) con un resto negativo (por ejemplo, un ácido aspártico) en sustitución de uno o más restos de fosfoserina más negativos. En algunos casos, puede fabricarse un polipéptido de estaterina (por ejemplo, sintetizarse) para que incluya uno o más restos de cisteína para facilitar la conjugación del polipéptido de estaterina con un polipéptido emisor de fluorescencia (por ejemplo, un polipéptido BFP).
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 Un polipéptido de estaterina que puede usarse como se describe en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que exista de forma natural en cualquier tipo de mamífero. Por ejemplo, un polipéptido de estaterina que puede usarse como se describe en el presente documento puede tener una secuencia de aminoácidos que existe de forma natural en un ser humano, vaca, cabra, oveja, caballo, ratón, rata, mono, perro, gato, orangután, chimpancé, cerdo, caballo, elefante o zarigüeya. En algunos casos, un polipéptido de estaterina humana se conjuga con un polipéptido emisor de fluorescencia para formar un conjugado de polipéptido de estaterina/polipéptido emisor de fluorescencia que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. En algunos casos, un polipéptido de estaterina que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la Figura 8 o que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia indicada en la Figura 7 puede usarse como se describe en el presente documento.
- 60
- 65 Puede usarse cualquier método apropiado para fabricar un polipéptido que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de expresión de

polipéptidos (por ejemplo, técnicas de expresión heterólogas usando células bacterianas, células de insecto o células de mamífero) para fabricar un polipéptido que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. En algunos casos, un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente, tal como un polipéptido de caseína o un polipéptido de estaterina, puede fabricarse como se describe en otras partes (patentes de Estados Unidos n.º 7.666.996, 6.797.810, 6.558.717, 6.121.421, 6.080.844, 5.834.427, 5.391.497 y 4.713.254, y publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0074680 y 2010/0144598). En algunos casos, pueden usarse técnicas de síntesis de polipéptidos convencionales (por ejemplo, técnicas de síntesis de polipéptidos en fase líquida o técnicas de síntesis de polipéptidos en fase sólida) para producir polipéptidos de forma sintética que tengan la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente.

Puede usarse cualquier método apropiado para unir de forma covalente o no covalente un polipéptido emisor de fluorescencia a una molécula (por ejemplo, un polipéptido) que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Por ejemplo, un polipéptido emisor de fluorescencia tal como un polipéptido BFP puede conjugarse químicamente con un polipéptido de caseína y/o un polipéptido de estaterina a través de uno o más enlaces covalentes coordinados, enlaces covalentes, enlaces disulfuro, enlaces de alta energía, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos o enlaces peptídicos. En algunos casos, un polipéptido emisor de fluorescencia puede conjugarse químicamente con un grupo amino presente en un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente (por ejemplo, un polipéptido de caseína y/o un polipéptido de estaterina). Dicho grupo amino puede localizarse en el extremo N del polipéptido, en el extremo C del polipéptido o entre el extremo N y el extremo C del polipéptido.

En algunos casos, los polipéptidos a conjugar pueden activarse antes de la conjugación. Por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido de caseína o un polipéptido de estaterina) puede activarse mediante la incorporación de un grupo tiol reactivo. En el caso de un polipéptido de estaterina, por ejemplo, esto puede conseguirse añadiendo un resto de cisteína al polipéptido durante la síntesis química. En el caso de un polipéptido de caseína, un polipéptido de caseína puede tiolarse mediante la reacción con 2-iminotiolano (por ejemplo, un reactivo de Traut) como se describe en otras partes (McCall *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 1: 222-226 (1990)). En los casos de polipéptidos de caseína  $\alpha$  y  $\beta$ , puede haber múltiples aminas (por ejemplo, en el extremo N y lisinas) en el polipéptido que puedan reaccionar con el reactivo de Traut. Las condiciones de reacción pueden variarse para maximizar el rendimiento de moléculas activadas con uno o dos tioles para reducir la posibilidad de que la conjugación pueda interferir con la unión al diente. El grado de incorporación de tiol puede medirse usando un ensayo de fluorescencia sensible como se describe en otras partes (Lacy *et al.*, *Analytical Biochemistry*, 382: 66-68 (2008)).

Un polipéptido emisor de fluorescencia puede sustituirse con uno o más grupos maleimida mediante la reacción de las aminas del polipéptido con un reactivo bifuncional que contiene un grupo maleimida y un éster de N-hidroxisuccinimida reactivo. El polipéptido emisor de fluorescencia sustituido con maleimida después puede conjugarse con los grupos tiol del polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. El grado en el que el polipéptido emisor de fluorescencia se sustituye con grupos maleimida puede variarse como se describe en otras partes (Singh, *Bioconjugate Chem.*, 5: 348-351 (1994)).

Otros ejemplos de métodos de conjugación que pueden usarse para conjugar un polipéptido emisor de fluorescencia con una molécula (por ejemplo, un polipéptido) que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente incluyen, sin limitación, los descritos en otras partes (por ejemplo, Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, Segunda Edición, 2008, Elsevier). Véase, por ejemplo, la parte I, sección 4 y la parte II, sección 5.

En algunos casos, la señal fluorescente que se obtiene usando los métodos y materiales proporcionados en el presente documento puede aumentarse mediante la unión de múltiples polipéptidos emisores de fluorescencia a una sola molécula (por ejemplo, un polipéptido) que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Debido a los efectos estéricos, esta amplificación puede realizarse de forma eficaz preparando primero un polímero que contiene múltiples polipéptidos emisores de fluorescencia y uniendo después este polímero a una molécula (por ejemplo, un polipéptido de caseína) que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Los ejemplos de métodos (por ejemplo, métodos de polimerización) que pueden usarse para formar polímeros que contienen múltiples polipéptidos emisores de fluorescencia incluyen, sin limitación, los descritos en otras partes (por ejemplo, Hermanson, G.T. *Bioconjugate Techniques*, Segunda Edición, 2008, Elsevier). Véase, por ejemplo, la parte II, sección 25.

En algunos casos, un polipéptido emisor de fluorescencia puede producirse como un polipéptido de fusión o quimérico con un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de expresión de polipéptidos heterólogas o técnicas de síntesis de polipéptidos sintéticas para producir una sola cadena de polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos de un polipéptido emisor de fluorescencia y una secuencia de aminoácido de un polipéptido que tenga la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente. En algunos casos, la única cadena de polipéptido puede tener (a) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido emisor de fluorescencia seguida de una secuencia de aminoácido de un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a

un componente del diente o (b) una secuencia de aminoácido de un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente seguida de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido emisor de fluorescencia. En algunos casos, la única cadena de polipéptido puede tener una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco) secuencias de aminoácidos, codificando cada una de ellas un polipéptido emisor de fluorescencia, y una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco) secuencias de aminoácidos, codificando cada una un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente.

En algunos casos, un polipéptido de fusión o quimérico proporcionado en el presente documento puede incluir otras secuencias de aminoácidos (por ejemplo, espaciadores o restos de unión). Por ejemplo, un polipéptido de fusión o quimérico que tiene una secuencia de aminoácidos de un polipéptido emisor de fluorescencia y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente puede incluir uno o más restos de aminoácido adicionales, tales como restos de glicina, lisina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, prolina, histidina, valina, serina, tirosina, ornitina, taurina, pirolisina o seleocisteína, o derivados de aminoácido (por ejemplo, 5-hidroxitriptófano, L-dihidroxifenilalanina, o  $\alpha$ -difluorometilornitina). Dichos restos de aminoácido adicionales pueden diseñarse para ser espaciadores (por ejemplo, una cadena de cinco o más restos de glicina) o pueden diseñarse para permitir que los polipéptidos u otras moléculas se conjuguen químicamente con el polipéptido de fusión o quimérico. Por ejemplo, un polipéptido de fusión o quimérico que tiene una secuencia de aminoácidos de un polipéptido emisor de fluorescencia y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente puede incluir uno, dos, tres, cuatro, cinco o más restos de lisina adicionales de tal forma que uno o más polipéptidos que tienen la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente (por ejemplo, polipéptidos de caseína y/o polipéptidos de estaterina) puedan conjugarse químicamente con el polipéptido de fusión o quimérico.

Una composición proporcionada en el presente documento que contiene un polipéptido emisor de fluorescencia (por ejemplo, una composición que contiene un polipéptido emisor de fluorescencia, un conjugado de polipéptido emisor de fluorescencia/polipéptido de caseína, un conjugado de polipéptido emisor de fluorescencia/polipéptido de estaterina, un polipéptido de fusión de polipéptido emisor de fluorescencia/polipéptido de caseína, y/o un polipéptido de fusión de polipéptido emisor de fluorescencia/polipéptido de estaterina) puede aplicarse a los dientes para alterar el aspecto de los dientes. Por ejemplo, una composición proporcionada en el presente documento que contiene un polipéptido BFP (por ejemplo, un conjugado de polipéptido BFP/polipéptido de estaterina) puede aplicarse a los dientes para proporcionar a los dientes un aspecto más blanco. Puede usarse cualquier método apropiado para administrar una composición proporcionada en el presente documento a los dientes. Por ejemplo, una composición proporcionada en el presente documento puede incorporarse en una pasta de dientes, un colutorio, una bebida, un producto alimentario, chicles, geles, polvos o cremas.

En algunos casos, una cantidad eficaz de una composición proporcionada en el presente documento puede administrarse a los dientes de tal forma que el aspecto de los dientes se altere (por ejemplo, el aspecto de los dientes se vuelva más blanco). Una cantidad eficaz de una composición proporcionada en el presente documento puede ser cualquier cantidad que altere el aspecto de los dientes sin inducir una toxicidad significativa. Por ejemplo, una composición proporcionada en el presente documento puede incorporarse en un producto de pasta de dientes en una cantidad que dé como resultado entre aproximadamente 0,0001 mg y aproximadamente 100 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 0,01 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 50 mg, entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 25 mg, entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 50 mg, o entre aproximadamente 1 mg y aproximadamente 25 mg) de polipéptido emisor de fluorescencia por gramo de pasta de dientes.

En algunos casos, una composición proporcionada en el presente documento puede aplicarse a los dientes durante un periodo de tiempo antes del lavado, deglución, o eliminación de tal forma que el aspecto del diente se altere (por ejemplo, el aspecto del diente se vuelva más blanco). Por ejemplo, una pasta de dientes configurada para incluir un polipéptido emisor de fluorescencia como se describe en el presente documento puede aplicarse a los dientes y permanecer en contacto con esos dientes, sin aclarado, durante un periodo de tiempo comprendido ente 30 segundos y 10 minutos (por ejemplo, entre 30 segundos y 5 minutos, entre 30 segundos y 2,5 minutos, entre 30 segundos y dos minutos, entre 1 minuto y 10 minutos, entre 2 minutos y 10 minutos, o entre un minuto y 5 minutos).

En algunos casos, los dientes de una persona pueden prepararse antes de administrar una composición proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, los dientes de una persona pueden lavarse, cepillarse pulirse (por ejemplo, pulirse con piedra pómez) antes de administrar una composición proporcionada en el presente documento. En algunos casos, la superficie del diente o los dientes a tratar puede tratarse con uno o más agentes capaces de exponer sitios de unión a fosfato cálcico. Por ejemplo, los dientes a tratar con una composición proporcionada en el presente documento pueden ponerse en contacto con EDTA o ácido fosfórico para exponer los sitios de unión a fosfato cálcico presentes en el diente. En el caso de tratamiento con ácido fosfórico, sólo el esmalte

del diente puede exponerse al ácido para prevenir o reducir el riesgo de lesiones en los tejidos blandos.

En algunos casos, puede usarse un proceso de dos o más etapas para aplicar un polipéptido emisor de fluorescencia a los dientes. Por ejemplo, una composición que contiene una molécula (por ejemplo, un polipéptido) que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente puede administrarse al diente a tratar como una etapa seguida de una etapa de administración de un polipéptido emisor de fluorescencia que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a la molécula administrada. En algunos casos, estas dos etapas pueden realizarse al mismo tiempo usando una sola composición que contiene la molécula separada del polipéptido emisor de fluorescencia o usando composiciones separadas donde una composición contiene la molécula y otra composición contiene el polipéptido emisor de fluorescencia.

En algunos casos, puede realizarse un ensayo para confirmar que una composición proporcionada en el presente documento o un componente de una composición proporcionada en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido de caseína) tienen afinidad de unión por los dientes o un componente de los dientes. Por ejemplo, un material a ensayar puede incubarse con una matriz de hidroxiapatita (HA) y la cantidad de material en solución después de la unión de HA puede compararse con la concentración inicial para determinar, por diferencia, la cantidad de material unido. Véase, por ejemplo, Raj *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267: 5968-5976 (1992). En algunos casos, el material unido a HA puede medirse directamente después de disolver la matriz de HA con EDTA (Lamkin *et al.*, *J. Dent. Res.*, 75: 803-808 (1996)). En el caso de un material polipeptídico, la concentración de polipéptido en solución puede medirse usando un ensayo de ácido bicinónico y/o un ensayo de orto-ftalaldehído amina. Las constantes de unión pueden determinarse usando el modelo de Langmuir (Bouropoulos and Moradian-Oldak, *Calcif. Tissue Int.*, 72: 599-603 (2003)). En algunos casos, puede realizarse un ensayo con una matriz de HA que se preincubó con saliva humana para recubrir la HA con proteínas como se describe en otras partes (Lamkin *et al.*, *J. Dent. Res.*, 75: 803-808 (1996)). En estos casos, las proteínas de saliva no unidas pueden retirarse por lavado ya que su presencia puede interferir con las determinaciones de la concentración de polipéptido.

Puede usarse cualquier método apropiado para evaluar la afinidad de una composición proporcionada en el presente documento para dientes o una matriz de HA. Por ejemplo, las composiciones unidas y no unidas pueden cuantificarse midiendo la fluorescencia del polipéptido emisor de fluorescencia de la composición. La capacidad de utilizar fluorescencia para la cuantificación puede permitir medir la unión de la composición a HA en presencia de saliva humana. En algunos casos, una composición proporcionada en el presente documento puede evaluarse con respecto a la capacidad de unirse *in vitro* a dientes humanos. Los dientes pueden someterse a diferentes grados de limpieza, tales como cepillado o pulido con piedra pómez. Los dientes después pueden tratarse con saliva humana para formar la película dental adquirida e incubarse con una composición proporcionada en el presente documento en presencia y ausencia de saliva. La unión a los dientes puede determinarse midiendo la fluorescencia unida y no unida. La extracción de polipéptidos emisores de fluorescencia unidos de los dientes puede completarse usando procedimientos suaves. Por ejemplo, los dientes pueden frotarse con tiras de recogida de papel de filtro, y los polipéptidos pueden extraerse del papel en condiciones suaves como se describe en otras partes (Siqueira and Oppenheim, *Archives de Oral Biology*, 54: 437-444 (2009)). En algunos casos, los dientes pueden analizarse por microscopía de fluorescencia para evaluar la cantidad relativa de polipéptido emisor de fluorescencia unido en diferentes condiciones.

Puede usarse cualquier método apropiado para evaluar una composición proporcionada en el presente documento con respecto a la capacidad de alterar el aspecto de los dientes. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de inspección visual para determinar si una composición proporcionada en el presente documento puede alterar o no el aspecto de los dientes. Dichas técnicas de inspección visual pueden incluir el uso de guías de colores para la comparación como se describe en otras partes (Paravina *et al.*, *J. Esthet. Restor. Dent.*, 19: 276-283 (2007)). En algunos casos, la capacidad de una composición proporcionada en el presente documento para alterar el aspecto de los dientes (por ejemplo, para hacer que los dientes parezcan más blancos) puede medirse usando espectrofotometría de reflectancia. En dichos casos, los dientes pueden iluminarse con una fuente de luz blanca y analizarse en cuanto a la cantidad de luz absorbida a diferentes longitudes de onda por espectrometría de reflectancia (colorimetría). Estas mediciones después pueden repetirse usando luz UV filtrada de la fuente de luz. La diferencia en los valores de reflectancia obtenidos con la inclusión y la exclusión de luz UV es el espectro de fluorescencia UV de la superficie del diente (véase, por ejemplo, Park *et al.*, *M. Dental Materials*, 23: 731-735 (2007)).

Una composición proporcionada en el presente documento puede tener un bajo riesgo de toxicidad para la persona que usa la composición, puede contener uno o más polipéptidos de origen humano, puede contener uno o más polipéptidos presentes de forma natural en productos alimentarios o bebidas, y/o puede carecer de colorantes potencialmente tóxicos.

La invención de describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### Ejemplos

Ejemplo 1 – Métodos para obtener mezclas de polipéptidos de caseína

Se hicieron reaccionar caseína, caseína  $\alpha$  y caseína  $\beta$  con tripsina para producir los fosfopéptidos de caseína respectivos (caseína-PP, caseína  $\alpha$ -PP y caseína  $\beta$ -PP). La tripsina y las tres caseínas se adquirieron en Sigma-Aldrich. Los métodos usados en estas preparaciones se adaptaron a partir de los descritos en otras partes (Reynolds *et al.*, Anal. Biochem., 217: 277-284 (1994)). En resumen, se realizó la hidrólisis de polipéptidos de caseína, caseína  $\alpha$  y caseína  $\beta$  en reacciones de 3 ml que contenían 60 mg de polipéptido, tampón Tris 0,05 M (pH 8), y 1,2 mg, 0,6 mg o 0,3 mg de tripsina. Las reacciones se dejaron progresar durante una noche a temperatura ambiente (21 °C), después de lo cual el pH de las mezclas de reacción se ajustó a pH 4,6 con ácido clorhídrico 1 M. Cualquier precipitado en esta etapa se retiró por centrifugación (12.000 x g durante 15 minutos). Después se añadió una solución de cloruro cálcico al 10 % en agua para ajustar la concentración de calcio al 1 %, y los polipéptidos que contenían múltiples grupos de fosfoserina se precipitaron mediante la adición de un volumen igual de etanol al 100 %. Los polipéptidos precipitados se recogieron por centrifugación (12.000 x g durante 15 minutos). Los precipitados se redisolviéron en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato para el análisis.

La concentración de polipéptido en los precipitados se determinó mediante el ensayo de ácido bicinonínico usando los reactivos y el protocolo del kit de ensayo BCA de Pierce. Los tamaños y las concentraciones relativas de los polipéptidos después de la hidrólisis con tripsina se determinaron por electroforesis en geles de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) usando geles de tricina al 16,5 % (BioRad). Se mezclaron muestras (10  $\mu$ l) con un volumen igual de tampón de muestra de tricina (BioRad) y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos antes de cargarse en un gel y someterse a electroforesis durante 100 minutos a 100 voltios (constante) a temperatura ambiente. Los geles se fijaron agitándolos suavemente durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de 40 % de metanol/10 % de ácido acético y después se tiñeron por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de un 50 % de azul brillante de Coomassie (BioRad) y un 50 % de la solución de fijación. Finalmente, los geles se destiñeron por agitación suave durante una noche en ácido acético al 1 %.

La caseína se hidrolizó a pH 8 en reacciones de tres ml que contenían 60 mg de caseína y 1,2 mg, 0,6 mg y 0,3 mg de tripsina. El porcentaje de los polipéptidos producidos por las reacciones de hidrólisis que se recuperaron por el procedimiento de precipitación fueron 9 %, 9 % y 13 % para las reacciones que contenían 1,2 mg, 0,6 mg y 0,3 mg de tripsina, respectivamente. El análisis de SDS-PAGE indicó que, en todos los casos, la caseína se hidrolizó a una mezcla de polipéptidos más pequeños. Después de la precipitación, el material recuperado de las tres reacciones era principalmente polipéptidos de bajo peso molecular.

Se hidrolizaron caseína  $\alpha$  y caseína  $\beta$  en reacciones de tres ml a pH 8 que contenían 60 mg de polipéptidos y 1,2 mg de tripsina. Los precipitados de cloruro cálcico/etanol para la caseína  $\alpha$  y caseína  $\beta$  contenían un 4 % y un 7 % de los polipéptidos hidrolizados, respectivamente. El análisis de SDS-PAGE indicó que las muestras precipitadas contienen muestras de polipéptidos.

#### Ejemplo 2 – Formación de conjugados de polipéptidos BFP y moléculas que tienen la capacidad de interactuar con o de unirse a un componente del diente

Se conjugaron caseína  $\beta$  no marcada (Sigma-Aldrich), fosfopéptidos de caseína  $\beta$  (producidos de acuerdo con el Ejemplo 1), y estaterina(1-25)-C (Biomatic) con polipéptidos BFP obtenidos en Biovision para formar conjugados de caseína  $\beta$ /BFP, conjugados de caseína  $\beta$ -PP/BFP y conjugados de estaterina(1-25)C/BFP, respectivamente. Este ejemplo describe la conjugación de caseína  $\beta$ , pero la conjugación de caseína  $\alpha$  y fosfopéptidos de caseína  $\beta$  se realizó usando procedimientos similares. En resumen, se preparó BFP activada con maleimida en una reacción de 3 ml que contenía 1 mg/ml de BFP, 0,33 mg/ml de SM(PEG)<sub>4</sub> (Pierce, n.º cat. 22104), EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,05 %, y tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,2). La reacción se dejó continuar durante 40 minutos a temperatura ambiente y después se desalificó en una columna G-25 Sephadex equilibrada en tampón MES 5 mM (pH 6), EDTA 2 mM, y Tween 20 al 0,05 %.

La caseína  $\beta$  activada con tiol se preparó en una reacción de 2 ml que contenía 4,5 mg/ml de caseína  $\beta$ , 2-iminotiolano 5 mM, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,05 % y tampón borato sódico 0,05 M (pH 8,0). Se dejó que la reacción continuara durante 1 hora a temperatura ambiente y después se desalificó en una columna de Sephadex G-25 equilibrada en tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0), EDTA 2 mM y Tween 20 al 0,05 %. Este material se usó en la reacción de conjugación inmediatamente después de la preparación.

El conjugado de caseína  $\beta$ /BFP se preparó en una reacción de 3,825 ml que contenía 0,37 mg/ml de BFP activada con maleimida, 1,57 mg/ml de caseína  $\beta$  activada con tiol, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,05 % y tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0). La reacción se dejó continuar durante 1 hora a temperatura ambiente y después todos los tioles restantes se inactivaron mediante la adición de 0,038 ml de una solución recién preparada de N-metilmaleimida 0,1 M en agua desionizada.

El conjugado se concentró a 1,5 ml mediante un concentrador de centrífuga (límite 10 kDa) y después se aplicó a una columna 16/600 Superdex 200 de HiLoad (GE Healthcare) equilibrada en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05 %. La columna se eluyó a 1,1 ml/minuto, y se recogieron fracciones de 1,5 ml y se analizaron tanto por fluorescencia (excitación 320 nm, emisión 445 nm) como por concentración de proteína total (ensayo de ácido bicinonínico).

Como tanto la caseína  $\beta$  como la BFP contienen múltiples grupos de activación, se formaron conjugados de diversos tamaños en la reacción. Son ejemplos de conjugados de diferentes tamaños caseína  $\beta$ -BFP; caseína  $\beta$ -BFP-caseína  $\beta$ ; caseína  $\beta$ -BFP-caseína  $\beta$ -BFP, etc. La columna Superdex 200 separó los materiales de partida más pequeños de los conjugados basándose en el tamaño molecular. Sin embargo, la columna también separó parcialmente los conjugados de diferentes tamaños producidos en la reacción. Los productos de la columna se recogieron en dos grupos: los productos de mayor peso molecular que eluyeron primero de la columna y los productos de menor peso molecular que eluyeron después de los productos de mayor peso molecular pero antes que los materiales de partida que no habían reaccionado. Después, los dos grupos de productos se concentraron por filtración molecular, el conjunto de menor peso molecular (contenido de BFP 0,28 mg/ml) presentó una mayor unión a los dientes que el grupo de mayor peso molecular (contenido de BFP de 0,36 mg/ml). En los ejemplos mostrados a continuación se usó la fracción de bajo peso molecular y mayor unión.

Se tioló fosfopéptido de caseína  $\beta$ , se acopló a BFP activada con maleimida, se purificó en una columna Superdex 200 y se concentró como se ha descrito en el caso de la caseína  $\beta$ . La fracción de mayor peso molecular del fosfopéptido de caseína  $\beta$ -BFP tenía una concentración de 0,38 mg/ml, y la fracción de menor peso molecular tenía una concentración de 0,48 mg/ml.

Se preparó un conjugado típico de esterina(1-25)C/BFP en una reacción de 1,4 ml que contenía 1,1 mg/ml de BFP activada con maleimida, 1,1 mg/ml de esterina(1-25)C, EDTA 2 mM, Tween 20 al 0,05 % y tampón fosfato sódico 0,05 M (pH 7,0). La esterina(1-25)C contenía un tiol libre y no requería activación. Aunque sólo hay un grupo activo por molécula de esterina, múltiples moléculas de esterina se pueden unir a una sola BFP activada, creando una distribución de producto. Los productos se separaron parcialmente entre sí en la columna Superdex 200 dando como resultado una fracción de mayor peso molecular (contenido de BFP de 0,22 mg/ml) y una fracción de menor peso molecular (contenido de BFP de 0,36 mg/ml). La fracción de mayor peso molecular se usó en el ejemplo de unión/ extracción mostrado a continuación.

### Ejemplo 3 – Aplicación de conjugados que contienen polipéptido BFP a los dientes

Se incubaron conjugados de caseína  $\beta$ /BFP (aproximadamente 0,09 mg/ml), conjugados de caseína  $\beta$ -PP/BFP (aproximadamente 0,24 mg/ml) y conjugados de esterina(1-25)C/BFP (aproximadamente 0,05 mg/ml) con dientes no recubiertos o dientes recubiertos con saliva durante aproximadamente una hora. Después de la incubación de una hora, los dientes se lavaron, y se extrajeron de los dientes las proteínas unidas usando EDTA al 0,4 por ciento seguido de SDS al 2 por ciento. La cantidad de proteína extraída en cada disolvente de extracción se determinó a través de un ensayo fluorescente (Tabla 1).

Tabla 1

Muestras	Concentración de muestra mg/ml	Conjugado de BFP extraído de los dientes		
		Extracción con EDTA al 0,4 %, $\mu$ g	Extracción con SDS al 2 %, $\mu$ g	Conjugado de BFP total extraído, $\mu$ g
<b>Dientes sin recubrir</b>				
Caseína $\beta$ -BFP	0,09	0,25	0,42	<b>0,67</b>
Caseína $\beta$ -PP	0,24	0,20	0,14	<b>0,34</b>
Esterina(1-25)Cys-BFP	0,05	0,40	0,18	<b>0,58</b>
Control	---	0,01	<0,01	<b>&lt;0,02</b>
<b>Dientes recubiertos con saliva</b>				
Caseína $\beta$ -BFP	0,09	0,14	0,10	<b>0,24</b>
Caseína $\beta$ -PP	0,24	0,14	0,16	<b>0,3</b>
Esterina(1-25)Cys-BFP	0,05	0,10	0,13	<b>0,23</b>
Control	---	<0,02	0,05	<b>&lt;0,07</b>

Estos resultados demuestran que los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP, los conjugados de caseína  $\beta$ -PP/BFP y los conjugados de esterina(1-25)C/BFP tienen la capacidad de unirse a los dientes.

Se realizaron otros experimentos usando conjugados de caseína  $\beta$ /BFP para evaluar los efectos del pH y la temperatura sobre la unión. No hubo ningún cambio significativo en la unión de los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP a los dientes de pH 6 a pH 9. Además, tampoco hubo un efecto significativo de la temperatura (21 °C a 37 °C) sobre la unión de conjugados de caseína  $\beta$ /BFP a los dientes.

En otro experimento, se incubaron conjugados de caseína  $\beta$ /BFP con dientes en presencia de etanol al 40 por ciento. En algunos casos, se observó que un tampón que contenía etanol al 40 por ciento aumentaba el nivel de unión de los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP a los dientes en comparación con el uso de conjugados de caseína  $\beta$ /BFP en ausencia de etanol.

5 El pretratamiento de los dientes con EDTA al 2 por ciento durante una hora dio como resultado un aumento en el nivel de unión de los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP y los conjugados de estaterina(1-25)C/BFP a los dientes.

10 Lo siguiente se realizó para evaluar el blanqueamiento de los dientes. En resumen, se incubaron dientes pulidos con piedra pómez con SDS al 2 por ciento durante 30 minutos seguido de una incubación con etanol al 50 por ciento durante 10 minutos. Después de la incubación de 10 minutos con etanol al 50 por ciento, los dientes se expusieron a un tampón de unión que contenía sales de saliva durante 30 minutos y después se incubó con EDTA al 2 por ciento durante una hora. Después de la incubación de una hora con EDTA, los dientes se expusieron al conjugado que contenía BFP durante una hora y después se lavaron. El conjugado unido se extrajo con SDS al 2 por ciento durante 15 30 minutos a 37 °C y se midió. En este momento, los dientes se pulieron con piedra pómez y opcionalmente se reutilizaron en un experimento posterior. En las muestras generalmente se analizó el blanqueamiento (a) después del tratamiento con EDTA y antes de la unión al conjugado, (b) después de la etapa de unión al conjugado de una hora, (c) después de la etapa de extracción con SDS, y (d) después del pulido con piedra pómez. En cada una de estas etapas, los dientes se analizaron usando un análisis con guía de colores, imágenes de fluorescencia y/o 20 fotografía (por ejemplo, una cámara fija, iluminación (bombillas 6500 °K) y colocación de la muestra). Se analizó la fluorescencia en las muestras sometidas a extracción con SDS.

25 Los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP en presencia de tampón que contenía etanol al 40 por ciento blanqueaban de forma reproducible los dientes como se determina tanto por el análisis de guía de colores como por las comparaciones fotográficas (Figura 10). Los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP en presencia de tampón solo, se evaluaron usando el análisis de guía de colores y se observó que blanqueaban los dientes. Los conjugados de estaterina(1-25)C/BFP en presencia de etanol al 40 por ciento blanqueaban los dientes según se determinó tanto por el análisis de guía de colores como por las comparaciones fotográficas. El nivel de blanqueamiento fue menor que el de los conjugados de caseína  $\beta$ /BFP. Los conjugados de estaterina(1-25)C/BFP en presencia de tampón solo 30 presentaron un blanqueamiento pequeño o nulo basándose en la guía de colores y en los análisis fotográficos.

35 En algunos casos, las mediciones de blanqueamiento que confirmaban la capacidad de los conjugados de blanquear los dientes se realizaron después de lavar los dientes con tampón. Estos resultados indican que el conjugado unido no se retiraba fácilmente. Después del pulido con piedra pómez, los dientes perdieron su blanqueamiento. Antes del pulido con piedra pómez, sin embargo, los dientes se lavaron con tampón y se extrajeron con SDS para retirar el conjugado. Después de este tratamiento con SDS, los dientes eran sólo ligeramente menos blancos que antes del lavado con el tampón y la extracción con SDS. Estos resultados también indican que el conjugado unido no se retiraba fácilmente.

40 Considerados conjuntamente, los resultados proporcionados en el presente documento demuestran que conjugados tales como el conjugado de caseína  $\beta$ /polipéptido BFP tienen la capacidad de unirse a los dientes y hacerlos parecer moderadamente más blancos.

#### 45 Ejemplo 4 – Aplicación de una composición que contiene polipéptidos BFP a dientes humanos

Se usa una composición de pasta de dientes convencional para limpiar los dientes de un ser humano usando técnicas de cepillado convencionales. Una vez limpiados los dientes, el ser humano se autoaplica una composición de pasta que contiene polipéptidos BFP a los dientes limpios. Una vez aplicada, se deja que la composición que contiene polipéptidos BFP permanezca en contacto con los dientes durante al menos 30 segundos (por ejemplo, 50 entre aproximadamente 30 segundos y 60 minutos). Después de este periodo de tiempo, los dientes se aclaran.

#### Otras realizaciones

55 Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> SafeWhite LLC  
 <120> MÉTODOS Y MATERIALES PARA PROPORCIONAR A LOS DIENTES UN ASPECTO BLANCO  
 65 <130> 29673-0002WO1

ES 2 593 456 T3

<150> 61/376.523  
<151> 24-08-2010

<160>9

5

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 743

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína fluorescente azul modificada soluble

15

<400> 1

```

ggatccaag agatataaca atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa 60
ttcttgttga attagatggt gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg 120
aaggtgatgc aacatacggg aaacttacc ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac 180
ctgttccatg gccaacactt gtcactactt tctctcatgg tgttcaatgc ttttcaagat 240
accagatca tatgaagcgg cagcacttct tcaagagcgc catgcctgag ggatacgtgc 300
aggagaggac catctctttc aaggacgacg ggaactaaa gacacgtgct gaagtcaagt 360
ttgagggaga cacctcctgc aacaggatcg agcttaaggg aatcgatttc aaggaggacg 420
gaaacatcct cggccacaag ttggaataca actacaactc ccacaacgta tacatcacgg 480
cagacaaaca aaagaatgga atcaaagcta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg 540
gaagcgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggcctctgtcc 600
ttttaccaga caaccattac ctgtccacac aatctgccct ttcgaaagat cccaacgaaa 660
agagagacca catggtcctt cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg 720
atgaactata caataagag ctc                                     743
    
```

20

<210>2

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Proteína fluorescente azul modificada soluble

<400> 2

```

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1          5          10          15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
          20          25          30
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
          35          40          45
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
          50          55          60
Ser His Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg
65          70          75          80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
          85          90          95
Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
          100          105          110
    
```

30

ES 2 593 456 T3

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile  
 115 120 125  
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn  
 130 135 140  
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly  
 145 150 155 160  
 Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val  
 165 170 175  
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro  
 180 185 190  
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val  
 210 215 220  
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 225 230 235

<210>3  
 <211> 1172  
 <212> ADN  
 <213> *Bos taurus*

5

<400>3

```

agtaggttta aatagcttgg aagcaaaagt ctgccatcac cttgatcatc aaccagctt 60
gctgcttctt cccagtcttg ggttcaagat cttgacaacc atgaaacttc tcatccttac 120
ctgtcttggt gctgttgctc ttgctaggcc taacatcct atcaagcacc aaggactccc 180
tcaagaagtc ctcaatgaaa atttactcag gttttttgtg gcaccttttc cagaagtgtt 240
tggaaaggag aagggtcaatg aactgagcaa ggatattggg agtgaatcaa ctgaggatca 300
agccatggaa gatattaagc aaatggaagc tgaaagcatt tcgtcaagtg aggaaattgt 360
tccaatagt gttgagcaga agcacattca aaaggaagat gtgccctctg agcgttacct 420
gggttatctg gaacagcttc tcagactgaa aaaatacaaa gtaccccagc tggaaattgt 480
tccaatagt gctgaggaac gacttcacag tatgaaagag ggaatccatg cccaacagaa 540
agaacctatg ataggagtga atcaggaact ggcctacttc taccctgagc ttttcagaca 600
attctaccag ctggatgcct atccatctgg tgcctgggtat tacgttccac taggcacaca 660
atacactgat gccccatcat tctctgacat ccctaactct attggctctg agaacagtga 720
aaagactact atgccactgt ggtgaggagt caagtgaatt ctgagggact ccacagttat 780
ggtctttgat gggtctgaaa attccatgct ctacatgtct tttcatctat catgtcaaac 840
cattctatcc aaaggcttca actgctgttt tagaataggg caatctcaa ttgaaggcac 900
tctttcttct tgagttctct actgtatfff agatagtgtg acatccttaa gtgaaattgt 960
cctaacagct tgttacctaa attccagtag tatcatgctg gtataaaggc cactgagtca 1020
aagggattaa agtcttcatt aaatttctgt atggaaaatg ttttaaaagc ctttgaatca 1080
cttctcctgt aagtgccatc atatcaata attgtgtgca ttaactgaga ttttgtcttt 1140
cttcttttca ataaattaca ttttaaggca ct 1172
    
```

10

<210>4  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

15

<400> 4

ES 2 593 456 T3

Met Lys Leu Leu Ile Leu Thr Cys Leu Val Ala Val Ala Leu Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Pro Lys His Pro Ile Lys His Gln Gly Leu Pro Gln Glu Val Leu Asn  
 20 25 30  
 Glu Asn Leu Leu Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly  
 35 40 45  
 Lys Glu Lys Val Asn Glu Leu Ser Lys Asp Ile Gly Ser Glu Ser Thr  
 50 55 60  
 Glu Asp Gln Ala Met Glu Asp Ile Lys Gln Met Glu Ala Glu Ser Ile  
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Glu Glu Ile Val Pro Asn Ser Val Glu Gln Lys His Ile  
 85 90 95  
 Gln Lys Glu Asp Val Pro Ser Glu Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu Gln  
 100 105 110  
 Leu Leu Arg Leu Lys Lys Tyr Lys Val Pro Gln Leu Glu Ile Val Pro  
 115 120 125  
 Asn Ser Ala Glu Glu Arg Leu His Ser Met Lys Glu Gly Ile His Ala  
 130 135 140  
 Gln Gln Lys Glu Pro Met Ile Gly Val Asn Gln Glu Leu Ala Tyr Phe  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Glu Leu Phe Arg Gln Phe Tyr Gln Leu Asp Ala Tyr Pro Ser  
 165 170 175  
 Gly Ala Trp Tyr Tyr Val Pro Leu Gly Thr Gln Tyr Thr Asp Ala Pro  
 180 185 190  
 Ser Phe Ser Asp Ile Pro Asn Pro Ile Gly Ser Glu Asn Ser Glu Lys  
 195 200 205  
 Thr Thr Met Pro Leu Trp  
 210

<210>5  
 <211> 1108  
 <212> ADN  
 <213> *Bos taurus*

5

<400>5

tgatccattc agctcctcct tcactttcttg tcctctactt tggaaaaaag gaattgagag 60  
 ccatgaaggt cctcatcctt gcctgcctgg tggctctggc ccttgcaaga gagctggaag 120  
 aactcaatgt acctggtgag attgtggaaa gcctttcaag cagtgaggaa tctattacac 180  
 gcatcaataa gaaaattgag aagtttcaga gtgaggaaca gcagcaaaca gaggatgaac 240  
 tccaggataa aatccacccc tttgcccaga cacagtctct agtctatccc ttccctgggc 300  
 ccatccataa cagcctccca caaaacatcc ctctctttac tcaaaccctt gtggtggtgc 360  
 cgcctttcct tcagcctgaa gtaatgggag tctccaaagt gaaggaggct atggctccta 420  
 agcacaaaaga aatgccttc cctaaatc cagttgagcc ctttactgaa aggcagagcc 480  
 tgactctcac tgatgttgaa aatctgcacc tctctctgcc tctgctccag tcttggatgc 540  
 accagcctca ccagcctctt cctccaactg tcatgtttcc tctcagtc ccgtctgtccc 600  
 tttctcagtc caaagtctct cctgttcccc agaaagcagt gccctatccc cagagagata 660  
 tgcccattca ggcctttctg ctgtaccagg agcctgtact cggctctgtc cggggaccct 720  
 tccttattat tgtctaagag gatttcaaag tgaatgcccc ctctcactt ttgaattgac 780  
 tgcgactgga aatatggcaa cttttcaatc cttgcatcat gttactaaga taatttttaa 840  
 atgagtatac atggaacaaa aatgaaact ttattccttt atttatttta tgctttttca 900  
 tcttaatttg aatttgagtc ataaactata tatttcaaaa ttttaattca acattagcat 960  
 aaaagttcaa ttttaacttg gaaatatcat gaacatatca aaatatgtat aaaaataatt 1020  
 tctggaattg tgattattat ttctttaaga atctatttcc taaccagtca tttcaataaa 1080  
 ttaatcctta ggcaaaaaaa aaaaaaaa 1108

10

<210>6  
 <211> 224  
 <212> PRT  
 <213> *Bos taurus*

15

ES 2 593 456 T3

<400>6

```

Met Lys Val Leu Ile Leu Ala Cys Leu Val Ala Leu Ala Leu Ala Arg
 1           5           10           15
Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu Ser
 20           25           30
Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg Ile Asn Lys Lys Ile Glu Lys Phe
 35           40           45
Gln Ser Glu Glu Gln Gln Gln Thr Glu Asp Glu Leu Gln Asp Lys Ile
 50           55           60
His Pro Phe Ala Gln Thr Gln Ser Leu Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro
 65           70           75           80

Ile His Asn Ser Leu Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro
 85           90
Val Val Val Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys
 100          105          110
Val Lys Glu Ala Met Ala Pro Lys His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys
 115          120          125
Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu Arg Gln Ser Leu Thr Leu Thr Asp
 130          135          140
Val Glu Asn Leu His Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gln Ser Trp Met His
 145          150          155          160
Gln Pro His Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro Pro Gln Ser
 165          170          175
Val Leu Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala
 180          185          190
Val Pro Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr
 195          200          205
Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val Arg Gly Pro Phe Pro Ile Ile Val
 210          215          220

```

5

<210>7  
 <211> 587  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 7

```

agggatctct tgaagcttca cttcaacttc actacttctg tagtctcacc ttgagtaaaa 60
gagaaccag ccaactatga agttccttgt ctttgccctc atcttggtc tcattgggttc 120
catgattgga gctgattcat ctgaagagaa atttttgcgt agaattggaa gattcgggta 180
tggttatggc ccttatcagc cagttccaga acaaccacta taccacaac cataccaacc 240
acaataccaa caatatacct ttaatatca tcagtaactg caggacatga ttattgaggc 300
ttgattggca aatacgactt ctacatocat attotocat ttcataocat atcacactac 360
taccactttt tgaagaatca tcaaagagca atgcaaatga aaaacactat aatttactgt 420
atactctttg tttcaggata cttgcctttt caattgtcac ttgatgat aattgcaatt 480
taaactgtta agctgtgttc agtactgttt ctgaataata gaaatcactt ctctaaaagc 540
aataaatttc aagcacattt tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 587

```

15

<210>8  
 <211> 62  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 8

ES 2 593 456 T3

Met Lys Phe Leu Val Phe Ala Phe Ile Leu Ala Leu Met Val Ser Met  
 1 5 10 15  
 Ile Gly Ala Asp Ser Ser Glu Glu Lys Phe Leu Arg Arg Ile Gly Arg  
 20 25 30  
 Phe Gly Tyr Gly Tyr Gly Pro Tyr Gln Pro Val Pro Glu Gln Pro Leu  
 35 40 45  
 Tyr Pro Gln Pro Tyr Gln Pro Gln Tyr Gln Gln Tyr Thr Phe  
 50 55 60

<210>9  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Proteína fluorescente mTagBFP

10

<400> 9

Met Ser Glu Glu Leu Ile Lys Glu Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Thr Val Asp Asn His His Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu  
 20 25 30  
 Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Met Arg Ile Lys Val Val Glu  
 35 40 45  
 Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Leu  
 50 55 60  
 Tyr Gly Ser Lys Thr Phe Ile Asn His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe  
 65 70 75 80  
 Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Val Thr Thr  
 85 90 95  
 Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln  
 100 105 110  
 Asp Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val Lys Ile Arg Gly Val Asn Phe Thr  
 115 120 125  
 Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Phe  
 130 135 140  
 Thr Glu Thr Leu Tyr Pro Ala Asp Gly Gly Leu Glu Gly Arg Asn Asp  
 145 150 155 160  
 Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly Ser His Leu Ile Ala Asn Ile Lys  
 165 170 175  
 Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly  
 180 185 190  
 Val Tyr Tyr Val Asp Tyr Arg Leu Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asn Asn  
 195 200 205  
 Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu Val Ala Val Ala Arg Tyr Cys Asp  
 210 215 220  
 Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Lys Leu Asn  
 225 230

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para hacer que los dientes parezcan más blancos, en donde dicho método comprende aplicar a los dientes un polipéptido emisor de fluorescencia conjugado con una molécula que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a un diente o a un componente del diente, en donde dicho polipéptido emisor de fluorescencia es un polipéptido BFP y en donde la fluorescencia emitida desde dicho polipéptido emisor de fluorescencia hace que dichos dientes parezcan más blancos.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que dichos dientes son dientes humanos.
3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula es un polipéptido.
- 15 4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula es un polipéptido de caseína o un polipéptido de estaterina.
5. El método de la reivindicación 1, en el que dicha molécula es una molécula que tiene la capacidad de interactuar con o de unirse a esmalte, a hidroxiapatita o a película dental adquirida.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido emisor de fluorescencia está presente dentro de una pasta de dientes, y dicha etapa de aplicación comprende aplicar dicha pasta de dientes a dichos dientes.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido emisor de fluorescencia es una unidad de un polímero que comprende dos o más polipéptidos emisores de fluorescencia.
- 25 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho polímero se une a un polipéptido de caseína para formar un complejo, en el que dicho complejo se aplica a dichos dientes.
9. Una composición que comprende un polipéptido emisor de fluorescencia conjugado con un polipéptido de caseína, en donde dicho polipéptido emisor de fluorescencia es un polipéptido BFP.
- 30 10. Una composición que comprende un polipéptido emisor de fluorescencia conjugado con un polipéptido de estaterina, en donde dicho polipéptido emisor de fluorescencia es un polipéptido BFP.

**Figura 1**

1 ggatccaagg agatataaca atgagtaaag gagaagaact tttcactgga gttgtcccaa  
 61 ttcttggtga attagatggt gatgttaatg ggcacaaatt ttctgtcagt ggagaggggtg  
 121 aaggatgatgc aacatacggg aaacttacc c ttaaatttat ttgcactact ggaaaactac  
 181 ctgttccatg gccaacactt gtcactactt tctctcatgg tgttcaatgc ttttcaagat  
 241 acccagatca tatgaagcgg cacgacttct tcaagagcgc catgcctgag ggatacgtgc  
 301 aggagaggac catctctttc aaggacgacg ggaactacaa gacacgtgct gaagtcaagt  
 361 ttgagggaga caccctcgtc aacaggatcg agcttaaggg aatcgatttc aaggaggacg  
 421 gaaacatcct cggccacaag ttggaataca actacaactc ccacaacgta tacatcacgg  
 481 cagacaaaca aaagaatgga atcaaagcta acttcaaaat tagacacaac attgaagatg  
 541 gaagcgttca actagcagac cattatcaac aaaatactcc aattggcgat ggccctgtcc  
 601 ttttaccaga caaccattac ctgtccacac aatctgcctt ttcgaaagat cccaacgaaa  
 661 agagagacca catggctcctt cttgagtttg taacagctgc tgggattaca catggcatgg  
 721 atgaactata caaataagag ctc

**Figura 2**

```
1 MSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEDATYG KLTLKFICTT GKLPVPWPTL
61 VTTFSHGVQC FSRYPDHMKR HDEFFKSAMPE GYVQERTISF KDDGNYKTRA EVKFEGDTLV
121 NRIELKGIDF KEDGNILGHK LEYNYNSHNV YITADKQKNG IKANFKIRHN IEDGSVQLAD
181 HYQQNTPIGD GPVLLPDNHY LSTQSALSKD PNEKRDHMLV LEFVTAAGIT HGMDELYK
```

**Figura 3**

```

1 agtaggttta aatagcttgg aagcaaaagt ctgcoatcac cttgatcadc aaccagctt
61 gctgcttctt cccagtcttg ggttcaagat cttgacaacc atgaaacttc tcacacctac
121 ctgtcttgtg gctgttgctc ttgctaggcc taaacatcct atcaagcacc aaggactccc
181 tcaagaagtc ctcaatgaaa atttactcag gttttttgtg gcaccttttc cagaagtgtt
241 tggaaaggag aaggtcaatg aactgagcaa ggatattggg agtgaatcaa ctgaggatca
301 agccatggaa gatattaagc aaatggaagc tgaaagcatt tcgtcaagtg aggaaattgt
361 tccaatagtg gttgagcaga agcacattca aaaggaagat gtgccctctg agcgttacct
421 gggttatctg gaacagcttc tcagactgaa aaaatacaaa gtaccccagc tggaaattgt
481 tccaatagtg gctgaggaac gacttcacag tatgaaagag ggaatccatg cccaacagaa
541 agaacctatg ataggagtga atcaggaact ggcctacttc taccotgagc ttttcagaca
601 attctaccag ctggatgcct atccatctgg tgccctggat tacgttccac taggcacaca
661 atacactgat gccccatcat tctctgacat ccctaactct attggctctg agaacagtga
721 aaagactact atgccactgt ggtgaggagt caagtgaatt ctgagggact ccacagttat
781 ggtctttgat ggttctgaaa attccatgct ctacatgtct tttcatctat catgtcaaac
841 cattctatcc aaaggcttca actgctgttt tagaataggg caatctcaaa ttgaaggcac
901 tctttcttct tgagttctct actgtatctt agatagtgta acatccttaa gtgaaattgt
961 cctaacagct tgttacctaa attccagtag tatcatgctg gtataaaggc cactgagtca
1021 aagggattaa agtcttcatt aaatttctgt atggaaaatg ttttaaaagc ctttgaatca
1081 cttctcctgt aagtgccatc atatcaaata attgtgtgca ttaactgaga ttttgtcttt
1141 cttcttttca ataaattaca ttttaaggca ct

```

**Figura 4**

```
1 MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV LNENLLRFFV APFPEVFGKE KVNELSKDIG
61 SESTEDQAME DIQOMEAESI SSSEEIVPNS VEQKHIQKED VPSEYRLGYL EQLRLKKYK
121 VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQELAYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY
181 YVPLGTQYTD APSFSDIPNP IGSENSEKTT MPLW
```

**Figura 5**

```

1  tgatccattc agtcctcctc tcacttcttg tcctctactt tggaaaaaag gaattgagag
61  ccatagaagg cctcatcctt gctgcctgg tggetctggc cettgcaaga gagctggaag
121 aactcaatgt acctgggtgag attgtggaaa gcctttcaag cagtgaggaa tctattacac
181 gcatcaataa gaaaattgag aagtttcaga gtgaggaaca gcagcaaaaca gaggatgaac
241 tccaggataa aatccacccc ttgcccaga cacagtctct agtctatccc tccctgggc
301 ccatccataa cagcctccca caaaacatcc ctctcttac tcaaaccctt gtgggtggtgc
361 cgcctttcct tcagcctgaa gtaatgggag tctccaaagt gaaggaggct atggctccta
421 agcaciaaaga aatgccttc cctaaatatic cagttgagcc ctttactgaa aggcagagcc
481 tgactctcac tgatggtgaa aatctgcaec ttctctgoc tetgctccag tcttgatgc
541 accagcctca ccagcctctt cctccaactg tcatgtttcc tctcagtcc gtgctgtccc
601 tttctcagtc caaagtctct cctgttcccc agaaagcagt gccctatccc cagagagata
661 tgcccattca ggctttctg ctgtaccagg agcctgtact cggctctgtc cggggaccct
721 tccctattat tgtctaagag gatttcaaag tgaatgccc ctctcactt ttgaattgac
781 tggcactgga aatattggcaa cttttcaatc cttgcatcat gttactaaga taatttttaa
841 atgagtatac atggaacaaa aatgaaact ttattccttt atttatttta tgctttttca
901 tcttaatttg aatttgagtc ataaactata tatttcaaaa ttttaattca acattagcat
961 aaaagttcaa ttttaacttg gaaatatcat gaacatatca aaatatgtat aaaaataatt
1021 tctggaattg tgattattat ttctttaaga atctatttcc taaccagtca tttcaataaa
1081 ttaatcctta ggcaaaaaaa aaaaaaaa

```

**Figura 6**

1 MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVES LSSSEESITR INKKIEKFQS EEQQQTEDEL  
61 QDKIHPFAQT QSLVYPPFGP IHNSLPQNIP PLTQTPVVVP PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK  
121 HKEMPPFKYP VEPFTERQSL TLTDVENLHL PLPLLQSWMH QPHQPLPPTV MFPPQSVLSL  
181 SQSKVLPVPQ KAVPYPQRDM PIQAFLLYQE PVLGPVRGPF PIIV

**Figura 7**

```
1 agggatctct tgaagcttca cttcaacttc actacttctg tagtctcatc ttgagtaaaa
61 gagaaccag ccaactatga agttccttgt ctttgccttc atcttggctc tcatggtttc
121 catgattgga gctgattcat ctgaagagaa atttttgcgt agaattggaa gattcgggta
181 tgggtatggc ctttatcagc cagttccaga acaaccacta taccacaac cataccaacc
241 acaataccaa caatatacct ttaatatca tcagtaactg caggacatga ttattgaggc
301 ttgattggca aatagcactt ctacatccat attctcatct ttcataccat atcacactac
361 taccactttt tgaagaatca tcaaagagca atgcaaatga aaaacactat aatttactgt
421 atactctttg tttcaggata cttgcctttt caattgtcac ttgatgatat aattgcaatt
481 taaactgtta agctgtgttc agtactgttt ctgaataata gaaatcactt ctctaaaagc
541 aataaatttc aagcacattt tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

**Figura 8**

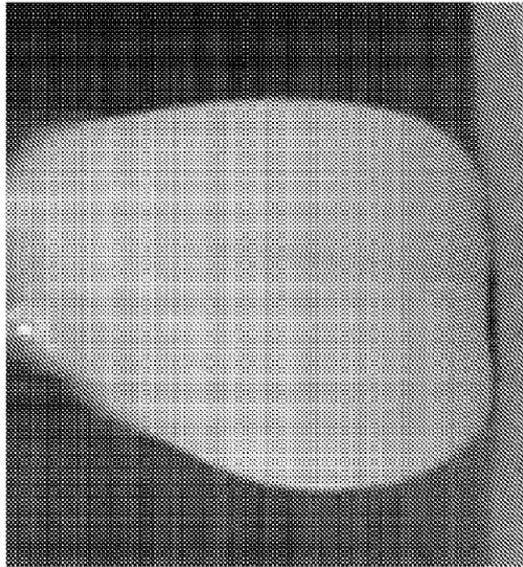
```
1 mkflvfafil almvsrigad sseekflrri grfgygygpy qpvpeqplyp qpyqpyqpy  
61 tf
```

**Figura 9**

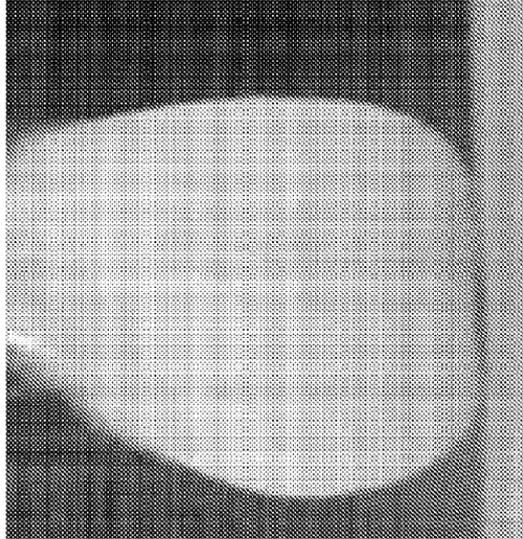
MSEELIKENMHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVVEGGPLPFAFDI  
LATSFLYGSKTFINHTQGIPDFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGCLY  
NVKIRGVNFTSNGPVMQKKTWGWEAFTETLYPADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANIK  
TTYRSKKPAKNLKM PGVYYVDYRLERIKEANNETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHKL  
N

**Figura 10**

INICIO



Tratamiento con  $\beta$ -Caseína-BFD



Después de pulido con  
piedra pómez

