

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 159**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**A61P 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.08.2013 PCT/EP2013/066962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014 WO14027012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2013 E 13748317 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2884991**

54 Título: **Procedimiento para la producción de una composición para el tratamiento de una lesión dental**

30 Prioridad:

**15.08.2012 EP 12180578**

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

**27.06.2018**

73 Titular/es:

**CREIDENTIS AG (100.0%)  
Dorfstrasse 69  
5210 Windisch, CH**

72 Inventor/es:

**HUG, MICHAEL y  
LYSEK, DOMENIKUS AMADEUS**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**ES 2 674 159 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

Procedimiento para la producción de una composición para el tratamiento de una lesión dental.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición para el tratamiento una lesión dental, comprendiendo dicha composición péptidos que son capaces de experimentar autoensamblaje a un cierto pH. Las composiciones de la invención son muy adecuadas para ser utilizadas en el campo de la medicina, en particular para remineralizar una lesión dental, tal como una lesión de caries de la subsuperficie.

## ANTECEDENTES

15 [0002] Hasta la fecha, la remineralización del diente se consigue principalmente mediante la liberación de iones de calcio y fosfato en las lesiones o cavidades de los dientes. Los iones de calcio y fosfato se incluyen normalmente en las pastas de dientes que contienen también, por ejemplo, abrasivos, fluoruros, agentes tensioactivos y otros agentes de remineralización. Los iones de calcio y fosfato se pueden utilizar en diversas formas cristalinas, por ejemplo, como materiales a base de hidroxiapatita, o como fosfato de calcio amorfo, tales como en algunos materiales a base de Recaldent.

20 [0003] Más recientemente, se ha descrito un enfoque alternativo de la remineralización de los dientes que se basa en péptidos cortos de autoensamblaje diseñados racionalmente. WO 2004/007532 da a conocer péptidos que son capaces de formar andamios tridimensionales, promoviendo de este modo la nucleación de fosfato de calcio de novo. Estos péptidos artificiales se ensamblan en una dimensión para formar ensamblajes de tipo cinta de láminas beta. Los ensamblajes de péptidos pueden cambiar de un estado de gel fluido a un estado de gel nemático más rígido en respuesta a desencadenantes químicos o físicos. Los péptidos fueron diseñados para formar ensamblajes en respuesta a ciertas condiciones de pH, fuerza iónica y/o temperatura en el siguiente orden jerárquico: cintas, lazos, fibrillas y fibras. Aggeli et al. (2003, J. Am. Chem. Soc. 125, 9.619-9.628) analiza el pH como un desencadenante del autoensamblaje de láminas beta de péptidos.

30 [0004] En la técnica anterior se han decrito varios otros péptidos de autoensamblaje. Por ejemplo, el documento WO 2010/041636 A1 describe un agente de oclusión del tejido de péptido bioadsorbible que contiene un péptido artificial que tiene 8-200 residuos de aminoácidos con los aminoácidos hidrófilos y aminoácidos hidrófobos unidos alternativamente, que se autoensamblan en una estructura beta a pH fisiológico. Los péptidos de autoensamblaje con la alternancia de residuos o tramos hidrófobos e hidrófilos que interactúan con la matriz extracelular se describen también en el documento WO 2008/113030 A2. El documento WO 2010/103887 A1 da a conocer péptidos de autoensamblaje, que comprenden aminoácidos básicos, hidrófobos y ácidos de una secuencia primaria específica y geles peptídicos de los mismos que tienen alta resistencia.

40 [0005] Otra solicitud, WO 2007/000979 A1, describe péptidos de autoensamblaje con aminoácidos polares y no polares. Los péptidos son capaces de formar una estructura de lámina beta en la que los residuos de aminoácidos no polares se disponen en un lado de la estructura en forma ensamblada. Los péptidos de autoensamblaje anfífilicos para su uso como membranas macroscópicas estables, que se utilizan en aplicaciones de biomateriales, tales como la administración de fármacos por difusión lenta, se describen en el documento US 6.548.630.

45 [0006] El documento EP 2 327 428 A2 se refiere a una composición farmacéutica que comprende nanofibras de péptidos de autoensamblaje, que son complementarias entre sí, y al menos una célula para la reparación de tejido dañado, tal como tejido después de un infarto de miocardio.

50 [0007] El uso de péptidos de autoensamblaje para el suministro de agentes bioactivos también se ha descrito en la técnica anterior, por ejemplo en el documento US 2008/199431 A1 y en el documento WO 2009/026729 A1. El documento WO 2006/073889 A2 se refiere a una composición en la que PDGF humano está unido directamente a los péptidos que se ensamblan en un gel que libera lentamente PDGF in vivo. El documento WO 2006/047315 A2 propone la unión de agentes terapéuticos a los péptidos de autoensamblaje utilizando enlazadores de biotina/estreptavidina.

55 [0008] Kirkham et al. se refiere a los andamios de péptidos de autoensamblaje que promocionan la remineralización del esmalte (2007, Dent. Res. 86 (5), 426-430).

60 [0009] Como puede observarse a partir de lo anterior, se han descrito varios péptidos de autoensamblaje que se pueden utilizar como plantillas o andamios en la remineralización de los dientes para la nucleación *in situ* de fosfato de calcio. Sin embargo, un problema particular que se puede encontrar en la remineralización de los dientes es que las lesiones subsuperficiales pueden ser inaccesibles para la forma ensamblada de los péptidos. Una vez que estos péptidos han formado cintas, lazos, fibrillas o fibras, el tamaño de los ensamblajes es tal que la difusión en la lesión de la subsuperficie a través de pequeños poros en la placa hipermineralizada sobre la superficie del diente ya no es posible en una cantidad necesaria para lograr un efecto significativo.

5 [0010] Por lo tanto, para tratar eficazmente las lesiones de la subsuperficie, el péptido de autoensamblaje tiene que estar en una forma monomérica fuera de la lesión dental para permitir la difusión en la lesión de la subsuperficie, y tiene que cambiar a una forma fibrillar una vez dentro de la lesión dental. Si los péptidos se ensamblan fuera de la lesión, no puede facilitar la remineralización dentro de la lesión, ya que las estructuras tridimensionales formadas son demasiado grandes para difundirse a través de los poros.

10 [0011] Se han descrito varios dispositivos de transferencia de fármacos en la técnica anterior. Por ejemplo, se han descrito dispositivos de transferencia de fluidos con medios de cierre herméticos para la aplicación directa de fármacos (por ejemplo, documentos WO 2011/058545 A1, WO 2011/104711 A1). Sin embargo, ninguno de estos dispositivos de transferencia de fármacos elimina el problema de ensamblajes fuera de una lesión dental.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 [0012] La presente descripción proporciona un procedimiento para la administración dirigida de un péptido de autoensamblaje a una lesión dental que permite que dicho péptido permanezca en una forma monomérica fuera de la lesión, lo que facilita la difusión en la lesión de la subsuperficie. Dentro de la lesión de la subsuperficie, el péptido cambia a un estado de autoensamblado fibrillar. También se proporcionan composiciones para la administración dirigida de péptidos de autoensamblaje a una lesión dental.

20 [0013] En particular, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una composición adecuada para el tratamiento de una lesión dental, tal como una lesión de caries, que comprende

a) proporcionar una solución que comprende un péptido que comienza a experimentar un autoensamblaje a un pH por debajo de 7,5, en el que dicha solución tiene un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje;

25 b) añadir un compuesto que aumenta el pH de la solución a 8,0 o superior, siendo dicho compuesto suficientemente volátil para ser eliminado durante la liofilización;

c) liofilizar la solución; y

30 d) opcionalmente, disolver el liofilizado en una solución acuosa para obtener una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, comprendiendo dicha solución el péptido en su estado monomérico.

35 [0014] La presente invención se basa, entre otras cosas, en la idea de que el uso de un compuesto básico como el amoníaco, que es volátil y se evapora durante la liofilización, es útil para el control del ensamblaje de péptidos de autoensamblaje. En particular, desplazando el pH desde básico hacia condiciones más ácidas a través de la evaporación de un compuesto básico durante la liofilización, es posible proporcionar un liofilizado que tras la resuspensión en agua proporciona una solución homogénea de péptidos predominantemente monoméricos con un pH cercano al pH en el que los péptidos comienzan a experimentar un autoensamblaje. Al aplicar esta solución a una superficie del diente, los péptidos monoméricos se difunden en la lesión dental donde debe lograrse la remineralización. En la lesión dental, el pH está normalmente entre 5,0 y 6,5 o inferior, como resultado de la producción continua de ácido láctico por las bacterias del ácido láctico que forman la microflora de la cavidad oral. A medida que el tampón en la solución reconstituida de la invención se diluye en la lesión dental, el ensamblaje inducido por el pH de los péptidos monoméricos comienza dentro de la lesión, formando de este modo ensamblajes multiméricos que pueden actuar como andamios para la posterior deposición de fosfato de calcio.

45 [0015] A pesar de que una solución de péptido fresco con un pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje contendrá inicialmente sólo un pequeño porcentaje de multímeros autoensamblados, el almacenamiento de la solución y la exposición al aire puede causar un ensamblaje debido a la formación de hidrogenocarbonato y la posterior acidificación de la solución.

50 [0016] Según el procedimiento de la invención, la monomerización eficaz de los péptidos se logra aumentando el pH de la solución que contiene el péptido a 8,0 o superior. Se prefiere que la monomerización de los péptidos se logre aumentando el pH de la solución a un pH que es al menos 0,5 unidades mayor que el pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje. Por ejemplo, cuando se utilizan los péptidos a lo que se hace referencia en este documento como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, la monomerización se logra a un pH de 8,0 o superior, ya que el autoensamblaje de estos péptidos se inicia a un pH de 7,5. A dicho pH alto, más del 95%, preferiblemente más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99%, y lo más preferiblemente, el 100% de los péptidos en la solución son están ensamblados, es decir son monoméricos. Después de la liofilización de la solución y la posterior reconstitución en agua u otro medio acuoso con pH neutro o casi neutro, los péptidos permanecen en una forma monomérica. De esta manera, la presente invención permite la administración dirigida de péptidos monoméricos en una lesión dental y el posterior autoensamblaje de dichos péptidos dentro de la lesión dental, en la que la última etapa es iniciada por el pH en la lesión dental sin ninguna intervención del usuario, por ejemplo el dentista. Los procedimientos y composiciones de la presente invención son particularmente ventajosos porque se evita la pérdida de cantidades significativas de péptidos debido al autoensamblaje de los péptidos fuera de la lesión dental. Al mismo tiempo los procedimientos y composiciones de la presente invención facilitan la concentración necesaria en el interior del cuerpo de la lesión para permitir el autoensamblaje.

5 [0017] El procedimiento de la invención proporciona una composición que es muy adecuada para el tratamiento de una lesión dental, tal como una lesión de caries, en un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Además, el procedimiento de la invención proporciona una composición que es muy adecuada para la mineralización de una cavidad en un diente. Específicamente, los procedimientos y composiciones de la invención se pueden usar para  
10 llenar las lesiones dentales y/o cavidades con una red de péptidos interconectados que promueven la remineralización de la lesión mediante la deposición de iones de calcio y fosfato, que están presentes por ejemplo en la saliva. Tal como se usa en el presente documento, una "lesión" de caries es una lesión de la subsuperficie o una microlesión de la subsuperficie en el diente o la superficie del diente que normalmente es causada por la  
15 formación de ácido de las bacterias presentes en la película adquirida. Tal como se usa en el presente documento, una "cavidad" dental es un agujero en la superficie de un diente. Las bacterias, en particular de los géneros Streptococcus, Lactobacillus y Actinomyces, producen ácido mediante la fermentación de hidratos de carbono que se originan de los alimentos. El ácido formado tras la fermentación da lugar a una desmineralización de los tejidos duros del diente, es decir, el esmalte, la dentina y el cemento. Las lesiones dentales y cavidades también pueden ser el resultado de un trauma físico. Si no se trata, una lesión de caries o cavidad pueden conducir a una infección de la cámara de la pulpa, que contiene vasos sanguíneos y nervios, que pueden en última instancia dar lugar a la pérdida de los dientes.

20 [0018] En general, la lesión o cavidad puede estar presente en cualquier diente, por ejemplo, en los incisivos (Dentesincisivi), los dientes caninos (Dentescanini), los dientes premolares (Dentespraemolares) y/o los dientes molares (Dentesmolares). De manera similar, la lesión o cavidad puede afectar a cualquiera de las superficies de un diente, es decir, superficie labial, mesial, bucal, palatal, proximal y/o distal.

25 [0019] En una primera etapa del procedimiento de la invención, se proporciona una solución que comprende uno o más péptidos de autoensamblaje. Los péptidos de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la invención se seleccionan de tal manera que experimentan un autoensamblaje tan pronto como el pH de su entorno disminuye por debajo de un determinado pH, por ejemplo, por debajo de pH 7,5. El pH al que los péptidos de autoensamblaje de la invención comienzan a experimentar un autoensamblaje está por debajo de 7,5, preferiblemente por debajo de 7,2, más preferiblemente por debajo de 7,0. Por ejemplo, el pH en el que los péptidos de autoensamblaje P11-4 (SEQ ID NO: 1) y P11-4 modificados terminalmente (SEQ ID NO: 2) comienzan a experimentar un autoensamblaje es de  
30 aproximadamente 7,5. Esto significa que los péptidos de autoensamblaje comienzan a autoensamblarse en un grado significativo cuando el pH cae por debajo de 7,5.

35 [0020] Tal como se usa en el presente documento, "autoensamblaje" de los péptidos se refiere a la organización espontánea y reversible de péptidos con otros péptidos de su propio tipo (o péptidos que tienen una estructura similar) en ensamblajes multiméricos mediante interacciones no covalentes. Las interacciones no covalentes que son responsables de la formación de los ensamblajes multiméricos incluyen van-der-Waals, interacción pi, enlaces de hidrógeno, interacciones polares e iónicas entre los esqueletos de aminoácidos y/o las cadenas laterales de aminoácidos de los péptidos.

40 [0021] Como se usa en el presente documento, el pH en el que el péptido de autoensamblaje comienza a experimentar un autoensamblaje se refiere al pH por debajo del cual se observa un grado significativo de autoensamblaje de los péptidos en solución, lo que significa que al menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%,  
45 aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o incluso aproximadamente el 100% de los péptidos que se encuentran en la solución se ensamblan. En una realización preferida, al menos aproximadamente el 25% de los péptidos que se encuentran en la solución se ensamblan por debajo del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje.

50 [0022] Preferiblemente, en el pH que se inicia el autoensamblaje, por ejemplo aproximadamente pH 7,5 para P11-4 y P11-4 modificado, sólo aproximadamente el 20% o menos, preferiblemente sólo aproximadamente el 15% o menos, más preferiblemente 10% o menos, y aún más preferiblemente 5% o menos de los péptidos están en un estado multimérico. Por lo tanto, una solución en la que el péptido está "predominantemente" presente en una forma monomérica en el sentido de la presente invención es una solución en la que sólo un 20% o menos, preferiblemente sólo aproximadamente el 15% o menos, más preferiblemente el 10% o menos, y aún más preferiblemente el 5%,  
55 4%, 3%, 2%, 1% o menos de los péptidos están en un estado multimérico.

60 [0023] Por el contrario, por debajo del pH en el que se inicia el autoensamblaje, por ejemplo, pH 7,5 para P11-4 (SEQ ID NO: 1) y modificado P11-4 (SEQ ID NO: 2), se observa un grado significativo de autoensamblaje de los péptidos en solución, lo que significa que al menos aproximadamente el 25%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 35%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 45%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 55%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 65%, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90%,  
65 aproximadamente el 95%, aproximadamente el 99% o incluso aproximadamente el 100% de los péptidos que se encuentran en la solución están ensamblados, es decir, son multiméricos.

5 [0024] Los péptidos de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la presente invención se ensamblan preferiblemente en láminas beta plegadas. En la lámina beta plegada, la estructura de tipo lámina se crea mediante una serie de enlaces de hidrógeno entre los residuos en diferentes cadenas polipeptídicas o entre los residuos en diferentes secciones de un polipéptido plegado. Típicamente, las cadenas de polipéptidos adyacentes en láminas beta plegadas son anti-paralelas, lo que significa que se disponen en direcciones opuestas. Sin embargo, las cadenas adyacentes también pueden disponerse en paralelo. Si varias cadenas polipeptídicas participan en la formación de la lámina, la lámina es una estructura rígida de tipo pared. Las múltiples láminas plegadas proporcionan la dureza y rigidez requeridas. Los péptidos que se pueden utilizar en el procedimiento de la invención están diseñados para formar estructuras secundarias estables tras el autoensamblaje. Preferiblemente, los péptidos para usar en el procedimiento de la presente invención formarán "cintas beta" largas que comprenden una estructura beta plegada de una sola molécula de grosor. Los péptidos formarán estructuras complejas durante el ensamblaje, tales como cintas helicoidales (de una sola molécula de grosor), lazos retorcidos (cintas dobles), fibrillas (pilas retorcidas de lazos) y fibras (fibrillas entrelazadas). Con una disminución del pH, se pueden formar cintas helicoidales, lazos retorcidos, fibrillas y por último fibras.

10 [0025] El tamaño de los péptidos de autoensamblaje que se pueden utilizar en los procedimientos de la invención no está limitado específicamente. Los péptidos de la invención pueden ser de cualquier longitud que permita el autoensamblaje de una manera dependiente del pH. Preferiblemente, los péptidos tendrán un tamaño de aproximadamente 4-200 aminoácidos, más preferiblemente, 6-100 aminoácidos, 8-50 aminoácidos, 10-30 aminoácidos o 11-20 aminoácidos. Incluso más preferiblemente, los péptidos de autoensamblaje tendrán una longitud de aproximadamente 27 aminoácidos, 24 aminoácidos, 21 aminoácidos, 15 aminoácidos, o 11 aminoácidos. En una realización particularmente preferida, los péptidos de autoensamblaje tienen una longitud de 11 aminoácidos.

20 [0026] Los péptidos de autoensamblaje se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado que se conozca habitualmente en el campo de la síntesis de péptidos. Por ejemplo, los péptidos con una longitud de más de 50 aminoácidos se pueden preparar mediante procedimientos recombinantes. En una realización, los péptidos de autoensamblaje se producen como péptidos de fusión. Tal como se usa en el presente documento, un péptido de fusión se refiere a una fusión de una primera secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de autoensamblaje de interés que es N-terminal o C-terminal unida a una segunda secuencia de aminoácidos. La segunda secuencia de aminoácidos puede ser una etiqueta de afinidad, es decir, una secuencia de aminoácidos que está fusionada al extremo 5' o 3' del péptido de autoensamblaje y que presenta una mayor afinidad a otro compuesto, permitiendo de este modo la purificación del péptido de fusión. Preferiblemente, la secuencia de etiqueta se elimina del péptido de autoensamblaje de interés después de la purificación, por ejemplo, proporcionando un sitio de escisión proteolítica entre el péptido de autoensamblaje y la etiqueta de afinidad. En una realización, el péptido de autoensamblaje se prepara tal como se describe en Kyle et al., 2010, Biomaterials 31, 9395-9405.

30 [0027] Los péptidos de autoensamblaje más pequeños se preparan habitualmente por síntesis química. Por ejemplo, los péptidos pueden sintetizarse químicamente mediante procedimientos en fase sólida o fase líquida. Se han descrito protocolos para la síntesis química en fase de solución de los péptidos (véase, por ejemplo, Andersson et al, Biopolymers 55: 227-250, 2000). Para la síntesis en fase sólida, se puede utilizar la técnica descrita por Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85, 2149-2154). En esta estrategia, el péptido en crecimiento se ancla en una resina insoluble y los reactivos solubles que no han reaccionado se separan mediante etapas de filtración o lavado sin pérdidas de manipulación. La síntesis de péptidos en fase sólida puede llevarse a cabo fácilmente mediante el uso de dispositivos automatizados.

35 [0028] Los péptidos para usar en los procedimientos de la invención pueden comprender cualquier aminoácido proteínogénico natural. Además, los péptidos también pueden comprender aminoácidos no proteínogénicos inusuales, tales como carnitina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), hidroxiprolina, selenometionina, hipusina, lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, deshidroalanina, ornitina (Orn, O), citrulina, beta alanina (ácido 3-aminopropanoico) y similares. Los aminoácidos no proteínogénicos pueden incorporarse en el péptido mediante la modificación post-traducciona l o mediante la incorporación directa durante la síntesis química del péptido.

40 [0029] Los péptidos de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la presente invención comprenden preferiblemente cadenas laterales de aminoácidos que incluyen un grupo -COOH. Las cadenas laterales de aminoácidos con un -COOH se desprotonarán a valores de pH por encima de sus valores nominales de pK. Por ejemplo, los aminoácidos que comprenden un grupo -COOH en su cadena lateral, tales como ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E) se desprotonan esencialmente a un pH por encima de neutro, es decir, a un pH de 7, debido a que presentan un pKa bajo (Asp: 3,71; Glu: 4,15). En los péptidos de autoensamblaje de la presente invención, las cadenas laterales de los aminoácidos que contienen un grupo -COOH están situadas específicamente en la cadena peptídica con el fin de controlar las interacciones electrostáticas entre los péptidos vecinos, es decir, de modo que péptidos de autoensamblaje idénticos adyacentes son repelidos a través de interacciones electrostáticas cuando el grupo -COOH se desprotona a  $\text{COO}^-$  y domina la energía libre de asociación en los enlaces entre péptidos. La reducción del pH por debajo de un cierto umbral, es decir, el pH al cual el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, tal como aproximadamente pH 7,5 para P11-4 (SEQ ID NO: 1) y P11-4 modificado

(SEQ ID NO: 2), conduce a la protonación del grupo -COOH en los péptidos de autoensamblaje de la presente invención, lo que reduce las interacciones electrostáticas de repulsión entre los péptidos y permite el autoensamblaje de los péptidos.

5 **[0030]** El péptido de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la presente invención comprende preferiblemente la secuencia de la fórmula X1-X2-X1-X2-X1, en la que X1 es un aminoácido con una cadena lateral  
 10 ácida y X2 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano (SEQ ID NO: 3). En una realización más preferida, el péptido de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la presente invención comprende la  
 15 secuencia Glu-X2-Glu-X2-Glu, en la que X2 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano (SEQ ID NO: 4) o Asp-X2-Asp-X2-Asp, en la que X2 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano (SEQ ID NO: 5). En otra realización preferida, el péptido de autoensamblaje para usar en el procedimiento de la presente invención comprende o consiste en la secuencia Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln, (P11- 4 SEQ ID NO: 1) o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma. Se prefiere además que el péptido para usar en el procedimiento de la presente invención sea P11-4 modificado, tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la misma.

20 **[0031]** Para los péptidos a los que se hace referencia en este documento como P11-4, el cambio de la forma monomérica a la forma ensamblada multimérica está controlado por el pH. Si el pH está por debajo de pH 7,5, el péptido se ensambla. Si el pH es mayor, el estado del péptido es monomérico.

25 **[0032]** La secuencia del péptido que tiene al menos un 80% o más de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 o 2 comprende preferiblemente ácido glutámico o ácido aspártico en las posiciones que corresponden a los aminoácidos 5, 7 y 9 de la SEQ ID NO: 1 o 2. Específicamente, la secuencia de péptido que tiene al menos un 80% o más  
 30 identidad de secuencia con SEQ ID NO: 1 comprende preferiblemente ácido glutámico en las posiciones que corresponden a los aminoácidos 5, 7 y 9 de la SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, las posiciones de los aminoácidos restantes son aminoácidos con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Preferiblemente, las posiciones de los aminoácidos restantes no son aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas, es decir, aminoácidos que estarían cargados positivamente a un pH aproximadamente neutro.

35 **[0033]** En una realización, los péptidos de la invención comprenden o consisten en secuencias que difieren de las representadas en las SEQ ID NOs: 1 y 2 por la sustitución de 1, 2 o 3 aminoácidos. Generalmente, cada uno de los residuos de aminoácidos dentro de la secuencia peptídica de SEQ ID NOs: 1 y 2 puede estar sustituido por otro residuo, siempre que el péptido resultante sea aún capaz de experimentar un autoensamblaje a un valor pH por debajo de 7,5. Se prefiere que las sustituciones sean sustituciones conservativas, es decir, sustituciones de uno o más residuos de aminoácido por un aminoácido de una polaridad similar, que actúa como un equivalente  
 40 funcional. Preferiblemente, el residuo de aminoácido utilizado como sustituto se selecciona del mismo grupo de aminoácidos que el residuo de aminoácido que debe ser sustituido. Por ejemplo, un resto hidrófobo puede ser sustituido por otro residuo hidrófobo, o un residuo polar puede ser sustituido por otro residuo polar que tiene la misma carga. Los aminoácidos funcionalmente homólogos que se pueden usar para una sustitución conservativa comprenden, por ejemplo, aminoácidos no polares, tales como glicina, valina, alanina, isoleucina, leucina, metionina,  
 45 prolina, fenilalanina y triptófano. Los ejemplos de aminoácidos polares sin carga comprenden serina, treonina, glutamina, asparagina, tirosina y cisteína. Ejemplos de aminoácidos cargados polares (básicos) comprenden histidina, arginina y lisina. Ejemplos de aminoácidos (ácidos) cargados polares comprenden ácido aspártico y ácido glutámico.

50 **[0034]** Además, los péptidos de la invención se pueden modificar estructuralmente en una o más posiciones de aminoácidos, por ejemplo mediante la introducción de uno o más aminoácidos modificados. Según la presente invención, estos aminoácidos modificados pueden ser aminoácidos que han sido cambiados por ejemplo, mediante biotinylación, fosforilación, glicosilación, acetilación, ramificación y/o ciclación. Además, los péptidos de la invención pueden contener adicional o alternativamente otras modificaciones, tales como grupos de bloqueo terminal, formilo,  
 55 hidroxilo de ácido gamma-carboxiglutámico, metilo, fosforilo, ácido pirrolidona carboxílico y/o sulfato. En una realización preferida, los péptidos de la presente invención se acetilan en su extremo N-terminal y/o amidan, por ejemplo, con un grupo NH<sub>2</sub>, en su extremo C-terminal. Una realización particularmente preferida es un péptido P11-4 que está acetilado en N-terminal y amidado en C-terminal con un grupo NH<sub>2</sub>, tal como se representa en la siguiente secuencia: CH<sub>3</sub>CO-QQRFWEFEQQ-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 2) y en la figura 1.

60 **[0035]** Es conocido para el experto que la concentración de péptido puede influir en el ensamblaje de péptidos, es decir, una concentración particularmente alta de péptido puede desencadenar el ensamblaje antes de tiempo. Además, una concentración de péptido excepcionalmente baja puede impedir el ensamblaje de los péptidos de la invención, es decir, incluso bajo condiciones de pH bajo como están presentes en las lesiones dentales y la cavidad oral. Por lo tanto, la concentración de péptido en la solución de la etapa a) será de entre 0,1 y 100 mg/ml, entre 0,5 y 50 mg/ml, entre 1 y 40 mg/ml, entre 1 y 30 mg/ml, o entre 1 y 20 mg/ml, o entre 1 y 10 mg/ml. En una  
 65

realización particularmente preferida, la concentración de péptido en la solución de la etapa a) será de entre 1 y 10 mg/ml. En una realización preferida adicional, la concentración de péptido en la solución de la etapa a) será de aproximadamente 2 mg/ml.

5 **[0036]** La solución mencionada en la etapa a) del procedimiento anterior, que contiene dicho uno o más péptidos de autoensamblaje, tiene un pH que está de 0,1 a 1,5, preferiblemente de 0,1 a 1,0, de 0,1 a 0,5, de 0,2 a 0,4, y más preferiblemente aproximadamente 0,3 unidades por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, lo que significa que el pH de la solución que contiene péptido es ligeramente más alto que el pH en el que se inicia el ensamblaje de una solución de monómeros de dicho péptido. En una realización preferida, la solución mencionada en la etapa a) tiene un pH que está de 0,3 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje. En una realización particularmente preferida, la solución comprende el péptido P11-4 (SEQ ID NO: 1) o P11-4 modificado, tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y la solución tiene un pH de aproximadamente 7,8 o superior en la etapa a) del procedimiento anterior. La solución es preferiblemente una solución acuosa. Sin embargo, la solución también puede contener cantidades de otros disolventes, tales como un disolvente orgánico o inorgánico, es decir, un alcohol, éter, cetona.

10 **[0037]** Mantener la solución en la etapa a) a un pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, tal como se describe anteriormente, es óptimo para que los péptidos de autoensamblaje permanezcan en su forma monomérica, una vez que se han separado el uno del otro mediante un aumento inicial en el pH. Este pH está ligeramente por encima del pH en el que comienza el autoensamblaje del péptido. La solución de la etapa a) contiene preferiblemente uno o más tampones para mantener el pH de la solución de la etapa a) en el intervalo deseado. En una realización preferida, la solución de la etapa a) se tampona a un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH mayor que el pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje. El tampón que proporciona el pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje es un tampón esencialmente no volátil, de modo que el tampón se mantendrá en la composición durante y después de la liofilización. Preferiblemente, la solución contiene un tampón para proporcionar un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima de pH 7,5.

20 **[0038]** Los tampones adecuados incluyen TAPS (ácido {[tris(hidroxiometil)metil]amino}propanosulfónico), Bicina (N, N-bis(2-hidroxiethyl)glicina), Tris (Tris(hidroxiometil)aminometano), Tricina (N-tris(hidroxiometil)metilglicina), TAPSO (ácido 3-[N-Tris(hidroxiometil)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), HEPES (ácido 4-2-hidroxiethyl-1-piperazinetanosulfónico), TES (ácido 2-[[tris(hidroxiometil)metil]amino]etanosulfónico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico)), cacodilato (ácido dimetilarsínico), SSC (solución salina de citrato de sodio), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), y otros tampones que mantienen un intervalo de pH esencialmente neutro. Los tampones de ácido, tales como ácido cítrico, ácido fosfórico y otros también pueden usarse conjuntamente con cualquiera de los tampones anteriores y/o un tampón alcalino, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, fosfato de sodio dibásico y tribásico, fosfato de potasio dibásico y tribásico, tripolifosfato de sodio, Tris, trietanolamina, poli-etilenimina, para obtener el pH deseado, que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje y para proporcionar capacidad de tamponado. En una realización preferida, el tampón para proporcionar un pH específico que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, tal como pH 7,5, es Tris.

30 **[0039]** El tampón utilizado para preparar la solución de la etapa a) tendrá una concentración que es suficiente para proporcionar un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje. Al mismo tiempo, la concentración del tampón será tan baja como sea posible, de modo que se proporciona una fuerza iónica baja después de la liofilización. En una realización preferida, la concentración del tampón en la solución de la etapa a) es de menos de 200 mM, menos de 150 mM, menos de 100 mM, menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 30 mM, menos de 20 mM o menos de 10 mM. En una realización preferida adicional, el tampón es TRIS en una concentración de menos de 200 mM, menos de 150 mM, menos de 100 mM, menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 30 mM, menos de 20 mM o menos de 10 mM. En una realización preferida, el tampón es Tris en una concentración de aproximadamente 4 mM.

45 **[0040]** La solución de la etapa a) puede comprender además componentes adicionales, tales como, por ejemplo, una sal, tal como, por ejemplo, NaCl. Como es conocido por la persona experta, el estado de ensamblaje de los péptidos está influenciado también por la fuerza iónica en la solución. La fuerza iónica de una solución es función de la concentración de todos los iones presentes en la solución. De este modo, incluso a un pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, es decir, cuando el péptido es sustancialmente monomérico en solución, una fuerza iónica particularmente alta podría ser capaz de desencadenar el ensamblaje del péptido. Sin embargo, el ensamblaje de los péptidos de la presente invención ventajosamente no se desencadena cuando la fuerza iónica está en el intervalo fisiológico, es decir que corresponde a o está por debajo de la fuerza iónica correspondiente a NaCl 150 mM. La persona experta sabrá cómo determinar y medir la fuerza iónica de una solución. La fuerza iónica I se calcula generalmente según la fórmula  $I = 1/2 \sum z_i^2 b_i$ , en la que z es el factor de valencia y  $b_i$  es la molalidad [mol/kg {H<sub>2</sub>O}] de la concentración de ion  $i^{\circ}$ . La suma,  $\Sigma$ , se toma sobre todos los iones en la solución. Por ejemplo, la fuerza iónica de una solución de NaCl 150 mM es aproximadamente 0,15. Esta es también aproximadamente la fuerza iónica de la sangre. La fuerza iónica de la saliva presente en la cavidad oral es

generalmente mucho menor, tal como por ejemplo aproximadamente 0,04. De este modo, en una realización preferida, la fuerza iónica de la solución de la etapa a) es de menos de 0,15, menos de 0,1, menos de 0,05, o menos de 0,025. En una realización preferida, la fuerza iónica de la solución de la etapa a) es de menos de 0,15. En una realización preferida adicional, la solución es de menos de 0,1.

**[0041]** La persona experta es consciente de numerosos procedimientos para determinar la fuerza iónica de una solución. Por ejemplo, la fuerza iónica puede estimarse a partir de la medición de la conductancia eléctrica ( $S = 1/\Omega = A/V$ ) de una solución a través del factor de Russell de la siguiente manera:  $I = 1,6 \times 10^{-5} \times$  conductancia específica [ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ]. Una solución de NaCl 150 mM tiene una conductancia de aproximadamente 80-100 mS/cm. De este modo, de acuerdo con lo anterior y la estimación descrita de la conductancia eléctrica, la solución de la etapa a) tendrá una conductancia eléctrica por debajo de 100 mS/cm, preferiblemente por debajo de 80 mS/cm.

**[0042]** Además, la persona experta es consciente de numerosos procedimientos para determinar el pH en el que un péptido de la presente invención iniciará el autoensamblaje a una fuerza iónica dada. Los procedimientos adecuados se indican por ejemplo, en una publicación de Aggeli et al. (2003, J Am Chem Soc, 125, 9.619 a 9.628).

**[0043]** En la etapa b) del procedimiento anterior, se añade un compuesto básico que aumenta el pH de la solución a 8,0 o superior a la solución. Preferiblemente, dicho pH en la etapa b) se aumenta a pH 8,0 o superior, preferiblemente a 8,0-9,5, más preferiblemente a pH 8,5. El compuesto básico es parcial o completamente volátil, de modo que se elimina durante la liofilización mediante la evaporación junto con el agua. En una realización preferida, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, e incluso más preferiblemente más del 99% de los compuestos volátiles se eliminan en la etapa c). Si permanecen trazas del compuesto en el liofilizado, estas cantidades no serán suficientes para aumentar el pH en más de 0,3 unidades de pH después de la reconstitución del liofilizado en comparación con la misma solución sin ningún compuesto. Los compuestos básicos adecuados para aumentar el pH en la etapa b) del procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), 2-aminoetanol (monoetanolamina), 4-metilmorfolina y piridina. Se prefiere particularmente el uso de amoníaco en la etapa b) del procedimiento de la invención.

**[0044]** La persona experta será capaz de determinar qué concentración del compuesto básico se requiere para aumentar el pH de la solución a 8,0 o superior. El pH se puede determinar después de la adición del compuesto básico mediante procedimientos rutinarios. Por ejemplo, en una estrategia simple, el pH en la solución puede determinarse mediante el uso de un indicador de pH, tal como azul de bromotimol, un medidor de pH o tiras de pH. El compuesto que aumenta el pH se añadirá a la solución hasta que se alcanza un pH de 8,0 o superior. Preferiblemente, se añadirá el compuesto que aumenta el pH hasta alcanzar un pH de al menos 8,0, al menos 8,2, al menos 8,4, al menos 8,6, al menos 8,8, al menos 9,0.

**[0045]** En la etapa b) del procedimiento de la invención, el pH se incrementará hasta que esencialmente todos los péptidos de autoensamblaje se encuentren en forma monomérica. La persona experta será capaz de determinar si esencialmente todos los péptidos de autoensamblaje se encuentran en forma monomérica por medio de experimentación de rutina. Por ejemplo, el estado de ensamblaje de los péptidos en solución se puede determinar por resonancia magnética nuclear (RMN), tal como  $^1\text{H}$ -RMN, por análisis de dicroísmo circular, mediante análisis de dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopia de onda de difusión, procedimientos electroforéticos nativos, espectroscopía infrarroja por transformada de fourier (FTIR), mediciones de la viscosidad (reología), y similares.

**[0046]** Además, el estado de ensamblaje puede también estimarse sobre la base de la viscosidad de la solución resultante debido a que un ensamblaje hasta un grado considerable cambiará la viscosidad de la solución de péptidos. Por ejemplo, en una solución acuosa el péptido P11-4 (SEQ ID NO: 1) está presente como un líquido isotrópico por encima de pH 7,5, como un fluido nemático entre aproximadamente pH 7,5 y aproximadamente pH 5, un floculado entre aproximadamente pH 5 y aproximadamente pH 3 y un gel nemático por debajo de pH 3 (Aggeli et al, 2003, J Am Chem Soc., 125: 9619-9628; figura 3), correspondiente al autoensamblaje del péptido con disminución del pH. La viscosidad de la solución puede estimarse mediante inspección visual de las propiedades de fluidez de la solución. Por ejemplo, aunque un fluido isotrópico puede expulsarse de manera eficaz a través de una aguja, éste no será el caso para las fases más viscosas. Cuando los péptidos de la presente invención son esencialmente monoméricos en solución, es decir, la solución está presente como un fluido isotrópico, entonces la solución tiene una viscosidad relativamente baja, lo que facilita la fácil expulsión de la solución a través de una aguja. Por ejemplo, cuando los péptidos de la presente invención son esencialmente monoméricos en solución, entonces la solución puede ser expulsarse fácilmente a través de una aguja con un diámetro de, por ejemplo, 1,6 mm o 1,1 mm.

**[0047]** Para evitar la degradación y/o precipitación de los péptidos en solución, el pH normalmente no se aumentará hasta un valor más alto que 10,5. Es conocido que las propiedades químicas de un péptido dependen de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, la oxidación reversible de los residuos de cisteína y metionina se puede acelerar a un pH más alto, en el que el tiol se desprotona con más facilidad y forma fácilmente enlaces disulfuro inter-cadena o intra-cadenas. El experto conocerá cadenas laterales de aminoácidos que están afectadas perjudicialmente por un pH básico y será capaz de determinar el pH máximo que mantiene la integridad del péptido de autoensamblaje intacto mediante experimentación de rutina. Por ejemplo, este pH máximo se puede predecir

sobre la base de propiedades conocidas de cada aminoácido presente en el péptido. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos bioquímicos, tales como procedimientos electroforéticos, para determinar la integridad del péptido. Preferiblemente, el pH en la etapa b) será de entre 8,0 y 10,5, más preferiblemente entre 8,0 y 10,0, y lo más preferiblemente entre 8,0 y 9,5 después de la adición del compuesto básico. Además, el pH en la etapa b) puede ser de entre 8,5 y 10,5 o entre 8,5 y 10,0.

**[0048]** Además, tal como se ha descrito anteriormente para la solución de la etapa a), la fuerza iónica de la solución en la etapa b) no aumentará a más de 0,15 mediante la adición del compuesto básico definido anteriormente para evitar el ensamblaje de los péptidos de la invención. Por lo tanto, la fuerza iónica de la solución de la etapa b) será menor de 0,15, menor de 1,0, menor de 0,05, o menor de 0,025. En una realización preferida, la fuerza iónica de la solución de la etapa b) es menor de 0,15. En una realización preferida adicional, la solución es menor de 0,1. Todos los comentarios realizados anteriormente con respecto a la fuerza iónica de la solución de la etapa a) también se aplican a la solución de la etapa b).

**[0049]** En una realización de la invención, se añade una etapa b1) de filtración entre la etapa b) y la etapa c) del procedimiento anterior para esterilizar la solución de péptido. Se puede utilizar cualquier técnica de filtración conocida en la técnica en el procedimiento de la invención. Como la filtración de soluciones de péptidos es una medida de rutina, la persona experta será capaz de determinar los tipos de filtros necesarios, tamaños de poro y una rutina de filtración eficiente sin actividad inventiva.

**[0050]** En una realización adicional, la solución de péptidos de la etapa b) o b1) se introduce en un recipiente en una etapa b2) de llenado. La etapa b2) de llenado se lleva a cabo preferiblemente entre la etapa b) y la etapa c), o entre la etapa b1) y la etapa c). Se prefiere que un volumen definido de la solución de péptidos se introduzca en un recipiente. El volumen definido es, por ejemplo, entre aproximadamente 5  $\mu\text{l}$  y 1  $\mu\text{l}$ , de entre aproximadamente 5  $\mu\text{l}$  y 500  $\mu\text{l}$ , o entre aproximadamente 10  $\mu\text{l}$  y 250  $\mu\text{l}$ . Por ejemplo el volumen definido es preferiblemente inferior a 1 ml, inferior a 500  $\mu\text{l}$ , inferior a 250  $\mu\text{l}$  o inferior a 50  $\mu\text{l}$ . Sin embargo, el volumen definido por supuesto puede también ser mayor que 1 ml. El llenado puede llevarse a cabo con una pipeta, tubo o una jeringa o similar. La solución de péptidos se puede introducir en el recipiente manualmente, por ejemplo mediante pipeteado de la solución, o automáticamente, por ejemplo, en una instalación de alto rendimiento.

**[0051]** El recipiente puede ser de cualquier naturaleza que sea adecuado para contener una solución líquida de péptidos. Por ejemplo, el recipiente puede ser un vial. Preferiblemente, el vial o recipiente está fabricado de vidrio o de plástico duro. El material del vial o recipiente es preferiblemente químicamente inerte y no reaccionará considerablemente con la solución de péptidos. Se prefiere además que la solución de péptido no se pegue o esencialmente no se pegue a las paredes del recipiente. Por tanto, el material puede tener propiedades electrostáticas que impedirían la adhesión de los péptidos al material.

**[0052]** En una realización preferida, las etapas b1) y b2) se llevan a cabo como una etapa combinada, es decir, el volumen definido de la solución de péptidos se filtra en el recipiente.

**[0053]** El recipiente o vial preferiblemente se cerrarán después de la liofilización en la etapa d). Por ejemplo, el recipiente o vial pueden estar tapados o sellados. Los tapones y sellados adecuados son conocidos en la técnica.

**[0054]** En la etapa c) del procedimiento anterior, se liofilizó la solución. Cualquier proceso de liofilización conocido en la técnica se puede utilizar en el procedimiento de la invención. La liofilización generalmente incluye tres etapas principales: congelación, secado primario y secado secundario. La congelación convierte el agua en hielo o algunos componentes de la composición amorfos en la forma cristalina. El secado primario es la etapa del procedimiento cuando el hielo se elimina del producto congelado por sublimación directa a baja presión y temperatura. El secado secundario es la etapa de proceso cuando se elimina el agua unida de la matriz del producto utilizando la difusión de agua residual a la superficie de evaporación. Se puede utilizar cualquier tipo de liofilizador para la liofilización, por ejemplo, un liofilizador colector, un liofilizador giratorio, un liofilizador con múltiples estantes o un liofilizador estilo bandeja.

**[0055]** La solución que comprende los péptidos de autoensamblaje y se somete a liofilización también pueden contener excipientes, tales como estabilizantes, agentes de carga, y/o tensioactivos que resultan ser útiles para prevenir los péptidos de la degradación durante la liofilización y/o el almacenamiento o soporte de la rehidratación del péptido seco. Por lo tanto, los excipientes adecuados se pueden añadir antes de la etapa c) para prevenir a las proteínas de un estrés de deshidratación durante la liofilización, para mejorar la estabilidad de las proteínas durante la liofilización, para mejorar la estabilidad de la torta (es decir, el liofilizado) y/o para mejorar la estabilidad de los péptidos liofilizados durante el almacenamiento. Preferiblemente, se añaden los excipientes entre la etapa a) y la etapa b). En particular, los excipientes tienen el efecto de que los péptidos conservan esencialmente su estabilidad física y química y su estado monomérico durante la liofilización y/o almacenamiento.

**[0056]** Típicamente, un excipiente adecuado es un azúcar no cargado y/o no reductor, tal como sacarosa, rafinosa, trehalosa, manitol, sorbitol, o derivados de los mismos, tales como dihidrato de trehalosa, o un aminoácido, tal como glicina, arginina y metionina. Otros agentes estabilizantes adecuados incluyen ácido cítrico, bicarbonato de sodio,

EDTA, alcohol bencílico, cloruro de sodio o lactosa. En una realización preferida, el agente de estabilización o de carga añadido es un azúcar no reductor seleccionado del grupo que comprende manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, y glicina, o derivados de los mismos, tales como dihidrato de trehalosa. En una realización particularmente preferida, se añade dihidrato de trehalosa en el procedimiento de la invención antes de la etapa c).

**[0057]** La cantidad de estabilizantes y/o agentes de carga en la solución preliofilizada dependerá de los péptidos específicos y de los componentes utilizados en la composición para liofilizar. Las cantidades típicas que deben utilizarse, por ejemplo, para un azúcar no reductor incluyen 0,1-5%, preferiblemente 1-4%, más preferiblemente 2-3% de cualquiera de las soluciones de las etapas a), b) o d). Las cantidades adecuadas para ser utilizadas, por ejemplo para un azúcar no reductor, tal como dihidrato de trehalosa, incluyen aproximadamente de 1 a 30 mg/ml, aproximadamente de 5 a 20 mg/ml, tal como aproximadamente 10 mg/ml.

**[0058]** La composición obtenida de la etapa c) es un liofilizado que es adecuado para el transporte y el almacenamiento, ya que es altamente estable en que los péptidos están protegidos de la degradación o un autoensamblaje no deseado. De este modo, en una realización del procedimiento de la invención, el liofilizado se disuelve en una solución acuosa para obtener una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje que comprende el péptido en su estado monomérico. Por ejemplo, al utilizar el liofilizado para tratar una lesión de caries, por ejemplo, un dentista, se añade una solución acuosa, tal como agua, a los liofilizados para obtener una solución final que tiene un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje que comprende el péptido en su estado monomérico. El liofilizado se disuelve preferiblemente en agua pura, más preferiblemente, en agua desionizada. Sin embargo, el liofilizado se puede disolver en cualquier tipo de solución acuosa siempre que la solución resultante tenga un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje que comprende el péptido en su estado monomérico. En una realización preferida, la solución acuosa, tal como agua, tendrá una fuerza iónica correspondiente a una conductancia eléctrica de menos de 5 mS/cm a 25°C. En el caso de estar presente un tampón no volátil en la solución de la etapa a), aún está presente en el liofilizado.

**[0059]** El liofilizado preferiblemente se disuelve en un volumen suficiente para dar lugar a una concentración de péptido de entre 0,1 y 100 mg/ml, entre 0,5 y 50 mg/ml, entre 1 y 40 mg/ml, entre 1 y 30 mg/ml, entre 1 y 20 mg/ml, o entre 1 y 10 mg/ml. En una realización particularmente preferida, el liofilizado preferiblemente se disuelve en un volumen suficiente para dar lugar a una concentración de péptido de entre 1 y 10 mg/ml. En una realización preferida adicional, el liofilizado preferiblemente se disuelve en un volumen suficiente para dar lugar a una concentración de péptido de aproximadamente 2 mg/ml.

**[0060]** Además, tal como se ha descrito anteriormente para la solución de la etapa a), la fuerza iónica de la solución de la etapa d) será menor de 0,15, menor de 0,1, menor de 0,05, o menor de 0,025. En una realización preferida, la fuerza iónica de la solución de la etapa d) es menor de 0,15. En una realización preferida adicional, la solución es menor de 0,1. Todos los comentarios realizados anteriormente con respecto a la fuerza iónica de la solución de la etapa a) también se aplican a la solución de la etapa d).

**[0061]** Se prefiere que el liofilizado se disuelva inmediatamente antes de la aplicación al diente con el fin de minimizar el tiempo en el que los péptidos están en solución. En particular, se prefiere que el liofilizado se disuelva dentro de 1 hora antes de su uso, preferiblemente aproximadamente 45 minutos antes de su uso, aproximadamente 45 minutos antes de su uso, aproximadamente 45 minutos antes de su uso, aproximadamente 30 minutos antes de su uso, aproximadamente 25 minutos antes de su uso, aproximadamente 20 minutos antes de su uso, aproximadamente 15 minutos antes de su uso, aproximadamente 10 minutos antes de su uso, e incluso más preferiblemente aproximadamente 5 minutos o menos antes de su uso.

**[0062]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición para el tratamiento de una lesión de caries y/o una composición para la remineralización de la superficie del diente y/o una lesión de caries. La composición es preferiblemente una composición en forma liofilizada para la reconstitución que comprende uno de los péptidos descritos anteriormente que experimentan un autoensamblaje a un valor pH por debajo de 7,5, en el que mediante la reconstitución del liofilizado, se obtiene una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, en el que el péptido está presente predominantemente en una forma monomérica. Como se describió anteriormente, el péptido comprende preferiblemente la secuencia X1-X2-X1-X2-X1, en la que X1 es un aminoácido con una cadena lateral ácida y X2 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Se prefiere además que el péptido comprenda la secuencia Glu-X2-Glu-X2-Glu o Asp-X2-Asp-X2-Asp, en las que X2 es un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba seleccionada del grupo que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano. Por ejemplo, las composiciones pueden comprender un péptido que comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con las mismas.

**[0063]** En una realización preferida, al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos

90%, de los péptidos están presentes en forma monomérica.

**[0064]** La composición de la presente invención se obtiene preferiblemente mediante el procedimiento descrito anteriormente. En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el liofilizado obtenido en la etapa c) del procedimiento de la invención o la solución reconstituida obtenida en la etapa d) de dicho procedimiento.

**[0065]** La composición se puede mezclar con compuestos adicionales que ayudan en la administración de los péptidos monoméricos en el sitio de tratamiento, es decir, la lesión o cavidad dental. Por ejemplo, la solución reconstituida obtenida en la etapa d) se puede mezclar con un vehículo, tal como un hidrogel. En el contexto de la presente invención, un hidrogel se refiere a una red de polímeros interconectados de forma covalente o no covalentemente que son insolubles en agua, pero absorben agua y experimentan un hinchamiento que conduce a un aumento de volumen considerable. Preferiblemente, el aumento de volumen al hincharse es del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más. Los hidrogeles preferidos comprenden o consisten en ácido hialurónico o poliuretano. Los hidrogeles para su uso en aplicaciones farmacéuticas son conocidos habitualmente y se pueden adquirir de diferentes fabricantes.

**[0066]** La presente descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de una lesión de caries, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie, en el que una composición de la presente invención se administra a un paciente en necesidad del mismo. Todavía en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para remineralizar una superficie del diente y/o una lesión de caries, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie, en el que una composición de la presente invención se administra a un paciente en necesidad del mismo.

**[0067]** Por lo tanto, las composiciones anteriormente descritas se pueden utilizar en un procedimiento de tratamiento de una lesión de caries, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie. En una realización preferida, las composiciones anteriores se utilizan en un procedimiento de remineralización de una superficie del diente y/o una lesión de caries, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie.

**[0068]** Las composiciones de la invención pueden aplicarse al diente que está en necesidad de un tratamiento directamente por el médico o mediante medios que proporcionan cierto aislamiento de las composiciones farmacéuticas del entorno ácido en la lesión oral. Por ejemplo, las composiciones se pueden aplicar con la ayuda de dispositivos de transferencia de fármacos líquidos, tales como los descritos en los documentos WO 2011/104712 A1, WO 2011/104711 A1, WO 2011/058545, WO 2005/105014 A2. Los dispositivos de transferencia de fármacos líquidos pueden comprender, por ejemplo, dispositivos de sellado que separan las composiciones del entorno ácido en la lesión oral. La invención se define en las reivindicaciones.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

##### **[0069]**

La **figura 1** representa las secuencias del péptido de autoensamblaje P11-4 (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de P11-4 que ha sido modificada en N-terminal y C-terminal (SEQ ID NO: 2).

La **figura 2** muestra las composiciones de ejemplo en solución en masa antes de liofilización (A), después del llenado antes de la liofilización (B) y después de la liofilización (C y D). Las composiciones (B) se han teñido con el único fin de la visualización.

La **figura 3** muestra el comportamiento de fase de P11-4 ( $c = 6,3 \text{ mM}$ ) en función del pH (DCI/NaOD): I = gel nemático, II = floculado, III = fluido nemático, IV = fluido isotrópico. O = Cero viscosidad, y  $\bullet = \%$  de lámina  $\beta$  determinada usando espectroscopia FTIR: la línea continua indica la proporción de péptido en fibrillas. Las líneas verticales discontinuas que separan las regiones I, II, y III indican límites aproximados entre los diferentes estados fibrillares macroscópicos, mientras que las regiones de separación III y IV indican una transición de nemático-a isotrópico de primer orden. (Figura replicada con el permiso de Aggeli et al. (2003, J. Am ChemSoc, 125, 9.619-9.628)).

**[0070]** El procedimiento de la invención se ejemplifica con más detalle en los siguientes ejemplos.

#### **EJEMPLOS**

##### **Ejemplo 1: Preparación de las soluciones de péptidos**

**[0071]** El péptido P11-4 modificado con la secuencia representada en SEQ ID NO: 2 se descongeló 24 horas antes de su uso a  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ . Se añade Tris 4 mM al agua de WFI (agua para inyección) bajo agitación durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Se añade dihidrato de trehalosa bajo agitación continua hasta una concentración final de 10 mg/g. Posteriormente, se añade el péptido P11-4 hasta una concentración final de 2 mg/ml y se disuelve con agitación hasta claridad. Esta solución de péptidos inicialmente tiene un pH de aproximadamente 8,2.

**[0072]** El pH de la solución de péptidos se ajusta a  $8,5 \pm 0,4$  con una solución al 1% de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

[0073] La solución de péptido se filtra posteriormente de forma estéril a través de filtros Sartopore. La solución estéril se introduce en viales que se someten a continuación a liofilización en un liofilizador con múltiples estantes. Después de congelar durante 1 a 3 horas a -45°C, los viales se someten a una etapa de secado principal a 30°C durante 10 a 13 h y una etapa de secado posterior a 30°C durante 7 a 10 h. Se suministra aireación con nitrógeno a 200 a 800 mbar. Los viales se cierran a 30°C y 200 mbar y se bloquean para el transporte.

[0074] Los viales son inspeccionados posteriormente visualmente para la integridad de la torta (es decir, el liofilizado).

[0075] Resultados: La solución de péptido estaba en forma de un fluido viscoelástico nemático después de la disolución. Después de ajustar el pH a 8,5, la solución de péptidos aparecía clara y no viscosa como un fluido isotrópico (Figura 2A). Después del llenado de los viales con solución, la solución todavía aparecía clara y no viscosa (Figura 2B: Alícuotas de ejemplo que se tiñeron azul únicamente para la visualización de la solución). La liofilización condujo a una "torta" intacta, es decir, un liofilizado, (Figura 2 C) mostró una buena estabilidad en almacenamiento.

### Ejemplo 2: Preparación de soluciones de péptidos con diferentes concentraciones

[0076] Como se describió anteriormente, se prepararon concentraciones de soluciones de péptidos con tampón diferente (TRIS), péptido (P11-4) y agente de carga (dihidrato de trehalosa). El pH se ajustó como se describe anteriormente.

Ejemplo	Concentración de péptido [mg*ml-1]	Agente de carga [mg*ml-1-1]	Tampón [mM]
1	1	50	4
2	2	25	5
3	4	10	6

[0077] Resultados: Después de llenar los viales con solución, las tres soluciones aparecieron claras y no viscosas. La liofilización condujo a una "torta" intacta, es decir, un liofilizado, que mostró una buena estabilidad en almacenamiento.

### Ejemplo 3: Viscosidad de la solución de péptidos P11-4

[0078] Para estimar el estado de ensamblaje en una solución de péptidos, se ensayó el paso de la solución de péptidos P11-4 a través de diferentes agujas de llenado.

#### Composición de la solución P11-4 en masa

[0079] Se preparó una solución en masa de P11-4 de la siguiente manera:

Tabla 1: La tabla 1 muestra la composición de la solución.

Sustancias	Peso [g]	Concentración en la solución final [mg/g]
P11-4	0,50	2
Dihidrato de trehalosa	2,5	10
TRIS	0,121	0,484
adición de agua destilada	250	/

[0080] P11-4, dihidrato de trehalosa (Hayashibara Co. Ltd., Lot Nr. 9D081) y TRIS (Carl Roth, A411.1) se disolvieron en aproximadamente 200 g de agua purificada. El pH se ajustó a 8,5 utilizando aproximadamente 0,5 ml de solución de NH3 al 1%. El peso final de la solución en masa se ajustó con agua purificada hasta 250 g.

[0081] A continuación, la solución se filtró usando un filtro de jeringa Acrodisc® de 25 mm (membrana de 0,22 µm Fluorodyne® II) conectado a una bomba peristáltica (520Di, Watson-Marlow Pumps Group, Falmouth, Reino Unido) que libera la solución en masa a una velocidad de bombeo de 10 rpm.

#### Densidad de la solución de péptidos

[0082] Se preparó la solución en masa P11-4 y se determinó la densidad de la solución utilizando un medidor de densidad portátil DMA300 (Anton Paar Germany GmbH, Ostfildern, Alemania). La solución en masa se cargó en el medidor de densidad utilizando una jeringa. La compensación de la temperatura a 25°C se llevó a cabo automáticamente por el medidor de densidad.

**[0083]** Se realizaron las mediciones de densidad de la solución de péptidos. La solución alcanzó una densidad de 1,001 mg/ml a 25°C, n = 2.

5 Viscosidad de la solución de péptidos

**[0084]** La máquina de dosificación EDM 3295 (Bausch + Ströbel Maschinenfabrik GmbH + Co. KG, Ilshofen, Alemania) se ajustó a un peso de llenado de 250 mg. Los viales de relleno de prueba se pesaron vacíos, se llenaron de solución en masa y se pesaron de nuevo después del llenado.

10 **[0085]** La Tabla 2 proporciona los resultados para el relleno de prueba usando la aguja de llenado 443009L (Ø 1,6 mm, longitud de 96 mm; código de material: Al-SI316L).

15 Tabla 2: Evaluación estadística del llenado de prueba usando la aguja de llenado 443009L (Ø 1,6 mm)

Promedio [mg]	248,4
SD [mg]	0,3
SD rel [%]	0,1
2 x SD [mg]	0,7
2 x SD rel. [%]	0,3
Mínimo [mg]	248,0
Máximo [mg]	249,3
n	20

**[0086]** La Tabla 3 proporciona los resultados del llenado de prueba utilizando una aguja de llenado 443008L (Ø 1,1 mm, longitud de 96 mm; código de material: Al-SI316L)

20 Tabla 3: Evaluación estadística del llenado de prueba usando la aguja de llenado 443008L (Ø 1,1 mm)

Promedio [mg]	248,7
SD [mg]	0,3
SD rel [%]	0,1
2 x SD [mg]	0,7
2 x SD rel. [%]	0,3
Mínimo [mg]	248,2
Máximo [mg]	249,2
n	20

25 **[0087]** Las dos agujas de llenado mostraron una precisión de llenado comparable de menos de 1,0 mg, es decir, una pérdida mínima de la sustancia, en un peso de relleno de 250 mg. En consecuencia, la solución de péptido fue capaz de pasar de manera eficiente a través de ambas agujas. Esencialmente no hubo obstrucción de la aguja. La viscosidad de la solución fue lo suficientemente baja para permitir el paso de la aguja. Esto indica que la solución de péptidos está presente como un fluido isotrópico (comparar Aggeli et al, 2003, J Am Chem Soc., 125: 9619-9628 para el comportamiento de fases des péptido P11-4 en función del pH).

30 LISTADO DE SECUENCIAS

**[0088]**

35 <110> Credentis AG

<120> PROCEDIMIENTO QUE PERMITE EL CONTROL DEL ESTADO DE ENSAMBLAJE DE UN AGENTE DE REMINERALIZACIÓN DE LOS DIENTES DE AUTO-ENSAMBLAJE

40 <130> P 87324

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

45 <210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>  
 <223> péptido de autoensamblaje diseñado P11-4  
 <400> 1  
 5 Gln Gln Arg Phe Glu Trp Glu Phe Glu Gln Gln  
 1 5 10  
 <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15 <220>  
 <223> péptido de autoensamblaje diseñado P11-4mod  
 <220>  
 20 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 <220>  
 25 <221> MOD\_RES  
 <222> (11)..(11)  
 <223> AMIDACIÓN  
 <400> 2  
 30 Gln Gln Arg Phe Glu Trp Glu Phe Glu Gln Gln  
 1 5 10  
 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> péptido de autoensamblaje diseñado  
 <220>  
 45 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> aminoácido con cadena lateral ácida  
 <220>  
 50 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 55 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (3)..(3)  
 60 <223> aminoácido con cadena lateral ácida  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 65 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> aminoácido con cadena lateral ácida  
 5  
 <400> 3  
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
 10  
 <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> péptido de autoensamblaje diseñado  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 25 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 30 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano  
 <400> 4  
 35  
 Glu Xaa Glu Xaa Glu  
 1 5  
 40  
 <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 45  
 <220>  
 <223> péptido de autoensamblaje diseñado  
 50  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 55 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> aminoácido con cadena lateral hidrófoba que se selecciona del grupo  
 60 que consiste en alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina,  
 tirosina y triptófano  
 <400> 5  
 65  
 Asp Xaa Asp Xaa Asp  
 1 5

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una composición adecuada para el tratamiento de una lesión dental, que comprende  
 5 a) proporcionar una solución que comprende un péptido que comienza a experimentar un autoensamblaje a un pH por debajo de 7,5 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, en el que dicha solución comprende un tampón que no es volátil durante la liofilización y que proporciona un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje;  
 b) añadir un compuesto que aumenta el pH de la solución a 8,0 o superior, siendo dicho compuesto suficientemente volátil para ser eliminado durante la liofilización;  
 10 c) liofilizar la solución, en el que el liofilizado es adecuado para disolverse en agua para obtener una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, comprendiendo dicha solución el péptido predominantemente en su estado monomérico; y  
 d) opcionalmente, disolver el liofilizado en agua para obtener una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, comprendiendo dicha  
 15 solución el péptido predominantemente en su estado monomérico.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que dicho pH en la etapa b) se aumenta a pH 8-9, preferiblemente a pH 8,5.
- 20 3. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que se añade un agente estabilizante y/o agente de carga a la solución antes de la etapa c).
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que dicho agente estabilizante o agente de carga es un azúcar no reductor seleccionado del grupo que comprende manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y glicina.
- 25 5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho compuesto en la etapa b) se selecciona del grupo que consiste en amoníaco, 2-aminoetanol, 4-metilmorfolina y piridina.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que más del 90% del compuesto de la etapa b) se elimina de la solución tras la liofilización.
- 30 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición obtenida en la etapa c) o d) se mezcla adicionalmente con un vehículo adecuado para ser aplicado a una superficie del diente, en el que dicho vehículo es preferiblemente un hidrogel.
- 35 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución en la etapa a) comprende TRIS en una concentración de 40 mM o inferior, más preferiblemente TRIS 20 mM o inferior, e incluso más preferiblemente, TRIS 10 mM o inferior.
- 40 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho péptido comprende una secuencia que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia representada en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 45 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho péptido comprende la secuencia representada en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 50 12. Composición adecuada para la disolución en agua para obtener una solución con un pH que está de 0,1 a 0,5 unidades de pH por encima del pH en el que el péptido comienza a experimentar un autoensamblaje, comprendiendo dicha solución el péptido predominantemente en su estado monomérico, que puede obtenerse mediante el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la etapa d) de la reivindicación 1 no se lleva a cabo en dicho procedimiento.
- 55 13. Composición, según la reivindicación 12, en la que al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, del péptido está presente en forma monomérica.
- 60 14. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, para usar en un procedimiento de tratamiento de una lesión dental, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie, o para usar en un procedimiento de remineralización de la superficie de un diente y/o una lesión de caries, preferiblemente una lesión de caries de la subsuperficie.

P <sub>11</sub> -4 (SEQ ID NO:1)	Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln
P <sub>11</sub> -4, <b>modificado</b> (SEQ ID NO:2)	CH <sub>3</sub> CO-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH <sub>2</sub>

Figura 1



Figura 2A



Figura 2B



Figura 2C



Figura 2D

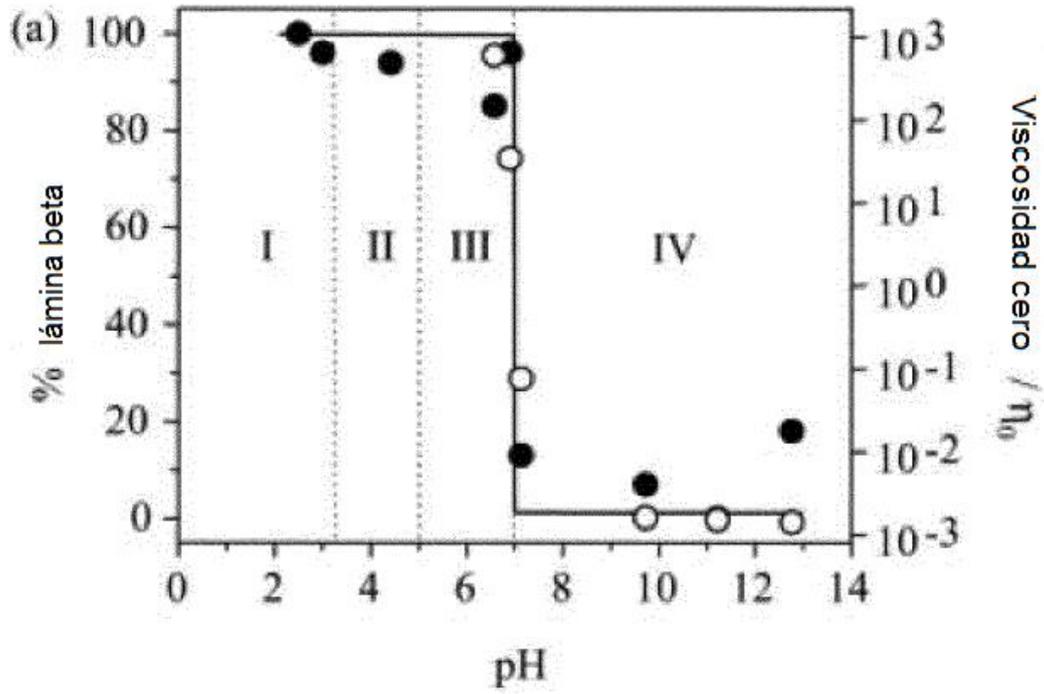


Figura 3