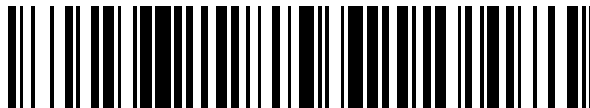


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 976**

51 Int. Cl.:

| | |
|-------------------|-----------|
| A61K 8/64 | (2006.01) |
| A61Q 11/00 | (2006.01) |
| A61K 8/73 | (2006.01) |
| A61K 38/17 | (2006.01) |
| A61K 6/00 | (2006.01) |
| A61K 6/027 | (2006.01) |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2015 PCT/EP2015/000079**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15106970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2015 E 15702962 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 3094308**

54 Título: **Procedimiento para producir EMD de estabilidad aumentada**

30 Prioridad:

17.01.2014 SE 1450046
08.05.2014 SE 1450546

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2019

73 Titular/es:

STRAUMANN HOLDING AG (100.0%)
Peter Merian Weg 12
4002 Basel, CH

72 Inventor/es:

APICELLA, ALESSANDRA y
HEUNEMANN, PEGGY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 976 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 producir EMD de estabilidad aumentada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) purificadas, que es estable al calor. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir formulaciones estables de proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD), en donde dichas proteínas y/o derivados se solubilizan en una formulación de pH bajo antes de ser sometidas a una etapa de tratamiento con calor.

10 Antecedentes de la invención

Las proteínas de la matriz del esmalte, presentes en la matriz del esmalte, son muy bien conocidas como precursores del esmalte. Antes de la formación del cemento dental, las proteínas de la matriz del esmalte se depositan en la superficie de la raíz en el extremo apical de la raíz del diente en desarrollo. Hay evidencias de que la matriz del esmalte depositada es el factor iniciador para la formación del cemento dental. De nuevo, la formación del cemento dental en 15 sí está asociada con el desarrollo del ligamento periodontal y el hueso alveolar. Las proteínas de la matriz del esmalte pueden promover por lo tanto la regeneración periodontal imitando el desarrollo de la unión natural en el diente (Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarstrøm L. Emdogain - periodontal regeneration based on biomimicry. Clin Oral Invest 4:120-125 (2000)).

20 Las proteínas de la matriz del esmalte aisladas pueden inducir no solo uno sino una cascada orquestada de factores, encontrados naturalmente en tejidos que se desarrollan adyacentes a la matriz del esmalte. Imitan el entorno natural de un tejido en desarrollo, y por tanto imitan una estimulación natural para la regeneración de tejidos, diferenciación celular y/o maduración.

25 El derivado de la matriz del esmalte (EMD), en la forma de un extracto ácido purificado de proteínas de la matriz del esmalte del cerdo, se ha empleado previamente con éxito para restaurar el ligamento periodontal funcional, el cemento dental y el hueso alveolar en pacientes con una pérdida grave de la unión del diente (Hammarstrøm et al, 1997, Journal of Clinical Periodontology 24, 658-668).

30 Además, en estudios sobre células del ligamento periodontal (PDL) cultivadas, se mostró que la velocidad de unión, el crecimiento y el metabolismo de estas células fueron aumentados significativamente cuando estuvo presente EMD en los cultivos. También, las células expuestas al EMD mostraron una señalización de cAMP intracelular aumentada y una producción autocrina de factores de crecimiento, cuando se compararon con los controles. Las células epiteliales, por otra parte, aunque aumentan la señalización de cAMP y la secreción de factores de crecimiento cuando estuvo presente EMD, fueron inhibidas tanto en proliferación como crecimiento (Lyngstadaas et al., 2001, Journal of Clinical Periodontology 28, 181-188).

35 Se ha descrito previamente en la bibliografía de patentes que las proteínas de la matriz del esmalte y los derivados de la matriz del esmalte (EMD) pueden inducir la formación de tejido duro (es decir, formación del esmalte, patente de EE.UU. N° 4.672.032 (Slavkin)), promocionar la unión entre tejidos duros (patentes europeas EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086), promover la curación de heridas abiertas, tales como de la piel y la mucosa, tener un efecto beneficioso sobre el tratamiento de infecciones y enfermedades inflamatorias (patentes europeas EP-1059934 y EP-01201915.4), reparar tejido mineralizado y no mineralizado, tal como hueso, cartílago, dientes, tejido blando y mucosa, tratar una afección que implica inflamación o infección (solicitud de patente internacional WO 06/64381), inducir la regeneración de la dentina (solicitud de patente internacional WO 01/97834), promover la aceptación de un injerto (solicitud de patente internacional WO 00/53197), inducir apoptosis en el tratamiento de neoplasmas (solicitud de patente internacional WO 00/53196), regular el desequilibrio en una respuesta inmunitaria a una infección o inflamación sistémica (solicitud de patente internacional WO 03/024479), y facilitar el llenado de la cavidad de una herida y/o defecto de tejido después de una operación y/o trauma, tal como una cirugía citorréductiva (solicitud de patente internacional WO 02/080994).

45 El EMD está compuesto de varias proteínas, tales como melogeninas, enamulina, proteína del penacho, proteasas y albúmina. Las amelogeninas, un constituyente mayoritario del EMD, al menos hasta 60%-90%, tal como 70-90%, son una familia de proteínas hidrófobas derivables de un único gen por corte y empalme alternativo y procesamiento postsecretor controlado. Están altamente conservadas a través de la evolución de los vertebrados, y demuestran un alto nivel global de homología de secuencias entre todos los vertebrados superiores examinados (80%). De hecho, las secuencias de transcripción de genes de amelogenina porcina y humana difieren solo en 4% de las bases. Por tanto, las proteínas de la matriz del esmalte y/o las proteínas EMD, aunque de origen porcino, se consideran "propias" cuando se encuentran en el cuerpo humano y pueden promover la regeneración dental en los seres humanos sin desencadenar respuestas alérgicas u otras reacciones indeseables. La Proteína Derivada de la Matriz del Esmalte (EMD) es el precursor del esmalte más conocido. Su disolución acuosa espesada con PGA se comercializa bajo el nombre registrado Straumann® Emdogain®.

El EMD es el componente activo del gel Straumann® Emdogain®, usado en terapia regenerativa para pacientes que padecen enfermedad periodontal. En esta formulación, el alginato de propilenglicol (PGA) actúa como vehículo para la liberación del EMD sobre el tejido afectado. Una vez que se ha aplicado Emdogain®, es decir, en condiciones de pH aproximadamente neutro, el EMD, que está cerca de su punto isoelectrico (pH 6,8), precipita y forma una capa compacta que promueve la proliferación celular y la extensión de ligamentos, dando como resultado un recrecimiento de tejido relativamente rápido. Los individuos tratados con Emdogain® han experimentado un llenado óseo significativo, y se ha mostrado que la regancia de unión clínica continúa durante más que un año después del tratamiento. Sin embargo, es importante que el EMD permanezca estable o muestre una evolución predecible en propiedades durante el almacenamiento, si se ha de evitar su precipitación antes de la aplicación.

Para mantener el EMD en disolución acuosa, la disolución debe tener un pH muy por debajo del punto isoelectrico (IEP) de la proteína. Para el EMD, el IEP es pH 6,5, por tanto, se prefiere más que el pH de la disolución sea aproximadamente 5,0. En general, la durabilidad de la disolución es determinada por el valor de pH al que el EMD es capaz de precipitar aún sobre la superficie del diente. Se considera que la precipitación ocurre en condiciones fisiológicas, es decir, un pH cerca del IEP. Sin embargo, para una aplicación fácil, la disolución se espesa mediante PGA. El pH y la capacidad amortiguadora tanto del entorno de la raíz del diente como de la mezcla EMD-PGA influyen en el comportamiento de precipitación de las proteínas EMD.

Químicamente, el PGA es un éster de ácido alginico, que deriva de kelp (alga marina). Algunos de los grupos carboxilo están esterificados con propilenglicol, algunos están neutralizados con un álcali apropiado, y algunos permanecen libres. El PGA en sí es ácido, y por tanto el pH de la disolución de EMD disminuye después de disolverse el PGA en la disolución de EMD. Lo que es más, en condiciones ácidas, el pH sigue disminuyendo con el tiempo, debido a la degradación natural del PGA. Por tanto, debido a las propiedades intrínsecas del PGA añadido, es necesario empezar con un pH relativamente alto en la disolución para permitir una vida útil del producto más larga.

Los alginatos de propilenglicol muestran aproximadamente 40% de pérdida en viscosidad después de un año a 25°C, y también se vuelven menos soluble. El alginato de amonio es generalmente menos estable que cualquiera de los anteriores. El ácido alginico es el menos estable de los productos, y cualquier material de cadena larga se degrada a cadenas más cortas en pocos meses a temperaturas ambientales. Sin embargo, los alginatos que comprenden material de cadena corta son estables, y un ácido alginico con un grado de polimerización (DP) de aproximadamente 40 unidades de ácido urónico por cadena mostrará un cambio muy pequeño a lo largo de un año a una temperatura de 20°C. Sin embargo, el uso principal del ácido alginico, como disgregante en comprimidos farmacéuticos, depende de su capacidad de hincharse cuando se humedece, y esto no es afectado por los cambios en el DP. Por lo tanto los alginatos comerciales deben almacenarse a un pH neutro en un lugar fresco, es decir, a temperaturas de 25°C o más bajas, ya que las temperaturas elevadas y un pH ácido pueden causar una despolimerización significativa, afectando a las propiedades comercialmente útiles, tales como la viscosidad y la resistencia del gel. Dichos alginatos contienen habitualmente 10-13% de humedad, y la velocidad de despolimerización aumenta según es aumentada la proporción de humedad, por tanto el área de almacenamiento debe estar seca.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas EMD se han formulado antes en una disolución acuosa con PGA, en donde la degradación del PGA proporciona productos ácidos, que a su vez disminuyen el pH con el tiempo. A temperaturas elevadas, la degradación se acelera. Para evitar la acidificación acelerada del producto, y por tanto limitar este efecto, los productos tienen que ser transportados y almacenados a temperaturas bajas, es decir, a un intervalo de temperaturas de 2 a 8°C.

Lo que es más, en la formulación Straumann Emdogain® disponible en el mercado, la proteína de la matriz del esmalte (EMD) se calienta después de su aislamiento durante 3 horas a aproximadamente 80°C a fin de inactivar proteasas residuales. Se ha encontrado recientemente que este necesario tratamiento con calor es un factor clave en causar una degradación y desnaturalización irreversibles del EMD en sí, contribuyendo a su vez a una vida útil más corta y/o menos actividad de la formulación.

Dado su relativamente alto contenido de amelogenina, se espera que el autoensamblaje del EMD implique estructuras jerárquicas basadas en aglomerados esféricos a nanoescala, denominados en lo que sigue "nanoesferas". Sin embargo, generalmente tales estructuras son solo marginalmente estables, y por tanto son sensibles a tensiones ambientales, tales como cambios en la temperatura o el pH. Estos pueden dar como resultado un despliegue irreversible, conduciendo a su vez a un aumento de la solubilidad en proteínas que son generalmente más estables en su estado plegado nativo. En cualquier caso, las proteínas ya no podrán llevar a cabo sus funciones, y eventualmente pueden precipitar pronto. Lo que es más, a veces, también puede ocurrir una agregación entre especies desplegadas parcialmente, conduciendo a una eficacia limitada del producto. Se sabe que el contacto hidrófobo es responsable en gran medida de las interacciones intermoleculares y la agregación en las proteínas, pero los residuos cargados también pueden jugar un papel importante. Por lo tanto, la interacción de estos últimos con aminoácidos cargados positivamente puede proporcionar un medio para limitar el despliegue y/o la precipitación temprana. Claramente, cualquier supresor de la agregación tal no debe interferir con las conformaciones de las proteínas y las propiedades regenerativas del EMD. Además, la elección del aditivo debe ser compatible con los requisitos clínicos de las aplicaciones dentales.

60 Descripción de la invención

5 Como se demuestra claramente en la sección experimental, se investigó la estabilidad del EMD en un entorno acuoso usando variaciones de pH y tensión térmica para acelerar la agregación y el despliegue de las proteínas (Casal HL, Köhler U, Mantsch HH. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein structure and Molecular Enzymology* 1998; 957(1):11-20.). Después los resultados se compararon adicionalmente con los resultados obtenidos en presencia de arginina a fin de evaluar la eficacia del pH o bien de la arginina en limitar las interacciones intermoleculares del EMD y por tanto el grado de desnaturalización, agregación, precipitación, despliegue y/o repliegue. Finalmente, se evaluó la influencia de la arginina sobre la cinética de precipitación del EMD y EMD/PGA usando el método de turbidez de flujo detenido (SF). Los hallazgos proporcionan una nueva y sorprendente visión en el proceso de despliegue/repliegue del EMD y evidencias de que el uso de un pH bajo, y/o arginina, como aditivo estabilizante, para productos a base de EMD tiene el potencial de extender significativamente su vida útil efectiva.

La presente invención, por tanto, describe por primera vez un procedimiento para producir una formulación de EMD con estabilidad mejorada y por tanto una capacidad regenerativa prolongada de la formulación de EMD durante el almacenamiento.

15 La presente invención describe por primera vez un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado, que se caracteriza por una vida útil y/o durabilidad de al menos 12 meses a 2°C-RT, tal como de al menos 12 meses a RT.

20 El procedimiento para producir dicha formulación que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado comprende típicamente las siguientes etapas:

- a. aislar proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) de unos dientes de mamíferos en desarrollo,
- b. disolver dichas proteínas aisladas en un vehículo farmacéutico adecuado,
- 25 c. disminuir el pH de dicha formulación inicialmente hasta por debajo de o como máximo pH 4, y
- d. calentar dicha formulación hasta entre 20-100°C durante al menos 10 minutos.

En una realización, el pH de la formulación se disminuye en la etapa c. hasta por debajo de pH 4, 3,9, 3,8, 3,7, 3,6, o por debajo de 3,5, o hasta 4 como máximo, tal como hasta 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2, 4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 o 4.

30 El pH de la formulación puede ser disminuido alternativamente en la etapa c. hasta entre pH4-pH2, tal como hasta entre pH4-pH3,5, o tal como hasta entre pH3,5-pH 2.

La formulación de la etapa c. se calienta en la etapa d. hasta 20-100°C, tal como hasta 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100°C durante al menos 10 minutos. En una realización, la formulación de la etapa c. se calienta en la etapa d. hasta al menos 80°C durante al menos 1-3 horas, tal como hasta al menos 80°C durante al menos 3 horas, o hasta al menos 50°C durante al menos 1 hora, o hasta al menos 20°C durante al menos 1 hora.

La etapa d. puede repetirse una o varias veces, si fuera necesario, para conseguir el resultado deseado de inactivar proteasas inherentes y/o contaminantes residuales en la formulación.

40 Como se demuestra claramente en la sección experimental, (véase la Fig 2A), después de un tratamiento con calor y una incubación durante 12 h a 25 °C, el EMD mostró cambios conformacionales significativos de las hélices α , mientras que las láminas β nativas no fueron afectadas en gran medida por el tratamiento con calor, es decir, se pudo observar una agregación sustancial del EMD.

45 La adición de arginina a pH 2 condujo a hallazgos que indicaban que las conformaciones asociadas con las hélices α permanecieron estables incluso después del tratamiento con calor. Además, las láminas β permanecieron sin cambios después del tratamiento con calor, lo que sugiere que había tenido lugar un cambio conformacional limitado de la superficie expuesta. Por lo tanto se infiere que la arginina se une a sitios de agregación externos de las proteínas EMD, que pueden incluir vueltas β . Además, al neutralizar los sitios de unión del EMD, se espera que la arginina promueva una compacidad de la estructura de la proteína, vista también en un aumento del tamaño de las nanoesferas. Tomados conjuntamente, estos resultados implican que la arginina estabiliza la estructura del EMD a pH 2 con respecto al tratamiento con calor.

50 La distribución de tamaños de partícula del EMD a pH 2 en ausencia de arginina (véase la Fig 2C) demostró que un tratamiento con calor hasta 70 °C y un enfriamiento hasta 20 °C conducen a cambios conformacionales (véanse también las micrografías TEM en la Fig 3A-B). Son visibles en la Fig 3A nanofilamentos y nanoesferas de aproximadamente 70 nm o menos de diámetro, típicos de la amelogenina en su estado nativo (7), pero, como se ve en la Fig 3B, estos se agregaron parcialmente después del tratamiento con calor. La agregación después del

tratamiento con calor estuvo ausente en presencia de arginina a pH 2. Dado que la desnaturalización del EMD no ocurrió en presencia de arginina, se concluye que estuvo ausente un despliegue inducido por calor a pH 2. Por tanto, la estructura de nanoesferas del EMD permaneció sustancialmente intacta (Fig 3C-D).

5 No obstante, el EMD solubilizado en pH bajo, tal como en pH 2, medido a 20 y 90 °C, y a 20 °C después del tratamiento con calor sugiere que la agregación inducida por la temperatura fue revertida en gran medida al enfriar (experimentos no mostrados).

Como se muestra en la Fig 4A, el tratamiento con calor de formulaciones de EMD con pH 5 dio como resultado una organización molecular del EMD significativamente modificada.

10 Como puede verse en la Fig 4C, el tratamiento con calor de formulaciones con EMD a pH 5 condujo a una agregación aumentada (véase también la Fig 5A-B). Estaban presentes inicialmente nanofilamentos y nanoesferas aisladas (Fig 5A), pero se observó una aglomeración extensa después del tratamiento con calor (Fig 5B). Se supuso que las nanoesferas, cuyas dimensiones en el EMD preparado fueron consistentes de nuevo con las típicas de la amelogenina, se agregan durante el tratamiento con calor. Como se ve a partir de la Fig 4D, la arginina limita esta agregación.

15 Por tanto, como se observa a pH 2, el tratamiento con calor de las formulaciones de EMD a pH 5 puede dar como resultado una desagregación parcial de las nanoesferas. Esto se reflejó en la Fig 5C-D, lo que sugiere que los nanofilamentos presentes inicialmente en los especímenes se han roto hasta nanoesferas e incluso fragmentos más pequeños después del tratamiento con calor.

20 En contraste, a pH 10, las conformaciones de las proteínas están fuertemente modificadas con respecto a las conformaciones nativas vistas a pH más bajo (Fig 6A). Además, la combinación de pH alto y cargas iónicas estabiliza la estructura secundaria durante el tratamiento con calor en ausencia de arginina. En presencia de arginina, por el contrario, los espectros obtenidos antes y después del tratamiento con calor ya no se superponen; la proporción de espirales aleatorias se reduce, y los picos correspondientes a las estructuras de vueltas β son distinguibles de nuevo (Fig 6B).

25 La Fig 7 confirma que la morfología del EMD a pH alto es muy diferente a la observada a pH más bajo, caracterizándose por extensos aglomerados amorfos similares a geles.

El vehículo farmacéutico adecuado es típicamente un amortiguador universal, tal como un amortiguador de Britton-Robinson, un amortiguador de Carmody, un amortiguador acético (ácido acético/acetato de sodio), un amortiguador salino, un amortiguador cítrico (ácido cítrico/citrato de sodio y/o HCl/citrato de sodio), o un amortiguador de sodio físico.

30 El vehículo farmacéutico adecuado también puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido acético acuoso, ácido cítrico o H₂O.

En una realización, se usa ácido acético a pH 2-pH 8, tal como a pH 5.

En particular, en el ensayo experimental, se usa un amortiguador de Britton-Robinson.

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado, en donde las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) comprenden al menos 60-100% de amelogenina, tal como al menos 60-70, 60-80, 70-90, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 97%, tal como al menos 99% de amelogenina, que tiene un peso molecular medio seleccionado del grupo que consiste en entre 18-25 kDa, tal como entre 20-24 kDa, entre 20-22 kDa, y 20 kDa.

40 La presente invención se refiere además a un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado, que comprende además mezclar la formulación de la etapa d. con un modificador de la viscosidad adecuado.

45 En una realización, dicho procedimiento comprende además ajustar el pH de la formulación de la etapa d. hasta al menos pH5 antes de mezclar dicha formulación con un modificador de la viscosidad adecuado, tal como PGA. Dicho PGA puede ser PGA esterilizado por haces de electrones. Preferiblemente, dicho PGA es alginato de propilenglicol (PGA) esterilizado con un peso molecular medio ponderal por encima de 130 kDa.

50 En una realización alternativa, dicho procedimiento comprende además ajustar el pH de la formulación de la etapa d. hasta pH5 como máximo antes de mezclar dicha formulación con un modificador de la viscosidad adecuado. El pH de dicha formulación se ajusta típicamente a entre pH 2-pH 5, tal como entre pH 2,5-pH 4,5, o a entre pH2-pH4, tal como a pH 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,3 o 4,5.

En dicha realización alternativa, el modificador de la viscosidad se selecciona del grupo que consiste en ácido hialurónico. El ácido hialurónico puede ser esterilizado por haces de electrones.

En aún otra realización alternativa, el procedimiento de la presente invención comprende ajustar el pH de la formulación de la etapa d. hasta pH 5 como máximo sin mezclar dicha formulación con ningún modificador de la viscosidad adecuado. El pH de dicha formulación se ajusta típicamente a entre pH 2-pH 5, tal como entre pH 2,5-pH 4,5, o a entre pH 2-pH 4, tal como a pH 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,3, 3,5, 3,8, 4,0, 4,3 o 4,5.

- 5 La presente invención también se refiere a una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento según la presente invención.

La presente invención se refiere por tanto a una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado, que se caracteriza por una vida útil y/o durabilidad de al menos 12 meses a 2°C-RT, tal como de al menos 12 meses a RT, y que se produce por un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 10 a. aislar proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) de unos dientes de mamíferos en desarrollo,
- b. disolver dichas proteínas aisladas en un vehículo farmacéutico adecuado,
- 15 c. disminuir el pH de dicha formulación inicialmente hasta por debajo de o como máximo pH 4, y
- d. calentar dicha formulación hasta entre 20-100°C durante al menos 10 minutos.

Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención comprende típicamente proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) a una concentración de entre 5-35 mg/ml de la formulación, tal como al menos 5, 10, 15, 20, 25, 29, 30, 31, 32 o 35 mg/ml de la formulación.

En otra realización, una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) a una concentración de entre 100 µ-5 mg/ml de la formulación, tal como al menos 100, 150, 250, 500 µg/ml de la formulación, o tal como al menos 1, 2, 3, 4 o 5 mg/ml de la formulación.

Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención puede comprender además arginina. En una realización, dicha arginina tiene una concentración de 1-500 mM cuando se añade a la formulación, tal como al menos 1, 10, 100, 250, 300, 400 o 500 mM. En otra realización, dicha arginina tiene una concentración de 1, 10, 100, 250, 300, 400, 450 o 500 mM. Por regla general, la concentración de arginina en la formulación es 500 mM como máximo.

La arginina es el aminoácido existente en la naturaleza más común. Su estructura, su capacidad para formar enlaces de H y su distribución de carga en condiciones fisiológicas son tales que la arginina se une fácilmente a grupos cargados negativamente, y también puede interactuar fuertemente con entornos polares, tales como agua. De hecho la arginina ha demostrado ser eficaz como aditivo para la prevención de la agregación de proteínas, y también se sabe que tiene un efecto relativamente menor sobre la estabilidad de la estructura nativa en muchos casos, con lo que puede considerarse que es un reactivo no desnaturizante.

La presente invención investigó la estabilidad del EMD en un entorno acuoso usando variaciones del pH y tensión térmica para acelerar la agregación y despliegue de las proteínas. Después se compararon los resultados con los resultados obtenidos en presencia de pH bajo y/o arginina a fin de evaluar su eficacia en limitar interacciones intermoleculares del EMD y por tanto el grado de desnaturización, agregación, precipitación, despliegue y/o repliegue. Finalmente, se evaluó la influencia del pH bajo y la arginina sobre la cinética de precipitación del EMD y EMD/PGA usando el método de la turbidez de flujo detenido (SF).

45 Los hallazgos que condujeron a la presente invención proporcionan una nueva y sorprendente visión en el proceso de despliegue/repliegue del EMD, y evidencias de que el uso de un pH bajo y/o arginina como aditivo estabilizante para productos a base de EMD tiene el potencial de extender significativamente su vida útil efectiva.

Usando diversas técnicas analíticas, la presente invención demuestra por primera vez que la adición de arginina a EMD acuoso puede limitar la desnaturización del EMD a pH ácido, además, también evidencia que la adición de arginina a EMD acuoso puede revertir la agregación a gran escala a pH alto. La investigación de la cinética de liberación del EMD posterior a un aumento por etapas en el pH hasta pH 7, que es cercano al punto isoeléctrico del EMD, también mostró que la arginina no tiene una influencia adversa sobre las velocidades de precipitación desde una disolución acuosa o bien desde un vehículo de gel de PGA. De hecho, la respuesta en sistemas con un pH inicial de 5 fue similar con arginina a la de a pH 2, con y sin arginina, reflejando de nuevo el efecto estabilizante de la arginina sobre el EMD. Los resultados mostrados en el experimento 1 indican por lo tanto que la arginina tiene el potencial de

mejorar significativamente la vida de almacenamiento de geles a base de EMD/PGA usados en terapia regenerativa, sin comprometer la liberación del EMD en el sitio de aplicación.

5 La presente invención se refiere además a una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención que comprende además un cerámico óseo y/o un injerto óseo adecuados.

La presente invención se refiere además a una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención para uso en medicina.

10 En particular, una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento de la presente invención está destinado al uso en la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento de heridas y/o en el tratamiento de enfermedades periimplantarias y/o periodontitis o para inducir la formación de tejido mineralizado.

15 También se concibe en la presente invención un método para la curación de heridas y/o para el tratamiento de enfermedades periimplantarias y/o periodontitis o para inducir la formación de tejido mineralizado, en donde un paciente necesitado de ello se trata con o se le administra una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado que es producido por un procedimiento de la presente invención.

20 Se describe un kit que comprende una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 18-28, y al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en gránulos, hueso, cerámicos, andamios, un injerto óseo, material de hueso natural, un bloque óseo, dientes artificiales, y un implante.

Definiciones

25 "Tejidos blandos", (es decir, tejidos no mineralizados), puede usarse en el presente contexto de manera intercambiable con tejido gingival, y pueden definirse como tejidos que contienen colágeno o epitelio, incluyendo piel y mucosa, músculo, vasos sanguíneos y linfáticos, tejidos nerviosos, glándulas, tendones, ojos y cartílagos. En general, la formulación de la presente invención puede usarse para promover la curación de una herida no solo en piel y mucosa, sino en cualquier tejido gingival de un paciente necesitado de ello.

30 La expresión "formación de tejido duro" en "tejido mineralizado" puede resumirse como la producción por células de una matriz orgánica capaz de aceptar mineral, con los prerrequisitos de actividad de la enzima fosfatasa alcalina y una buena irrigación sanguínea. En general, la formulación de la presente invención puede usarse para promover la formación de tejido duro en un paciente necesitado de ello.

Sustancias activas del esmalte

35 Como se emplea en la presente memoria, "matriz del esmalte" significa un precursor del esmalte, y puede obtenerse de cualquier fuente natural relevante, es decir, un mamífero en el que los dientes estén en desarrollo. Una fuente adecuada son dientes en desarrollo de animales sacrificados tales como, p.ej., terneros, cerdos o corderos. Otra fuente es p.ej. piel de pescado. En el presente contexto, la expresión "una sustancia activa del esmalte" se usa para abarcar proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) sin distinguir su fuente.

40 La matriz del esmalte puede prepararse a partir de dientes en desarrollo como se describió previamente (patentes europeas EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086). La matriz del esmalte se retira por raspado y las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) se preparan, p.ej., por extracción con una disolución acuosa tal como un amortiguador, un ácido o base diluidos o una mezcla de agua/disolvente, seguido de exclusión de tamaños, desalinización u otras etapas de purificación, seguido alternativamente de liofilización. Las enzimas pueden ser desactivadas alternativamente por tratamiento con calor o disolventes, en cuyo caso los derivados pueden almacenarse en forma líquida sin liofilización.

45 Como fuente alternativa de las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) también se pueden usar rutas de síntesis aplicables generalmente, bien conocidas por un experto en la técnica, o usar células eucarióticas y/o procarióticas cultivadas modificadas por técnicas de ADN. Las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) pueden ser por tanto de origen recombinante, y
50 alternativamente modificarse genéticamente y/o químicamente (véase, p.ej., Sambrook, J. et al.: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

55 En el presente contexto, las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) incluyen una o varias proteínas de la matriz del esmalte o partes o fragmentos de tales proteínas, producidas naturalmente por corte y empalme alterno o procesamiento, o por escisión enzimática o bien química de una proteína de longitud natural, o por síntesis de polipéptidos *in vitro* o *in vivo* (p.ej., métodos de ADN recombinante y/o cultivo de

células diploides). Las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) también incluyen polipéptidos o proteínas relacionados con la matriz del esmalte. Los polipéptidos o proteínas pueden unirse a una molécula portadora biodegradable adecuada, tales como ácidos poliamínicos o polisacáridos, o combinaciones de los mismos. Además, la expresión proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) también abarca sustancias análogas sintéticas.

Las proteínas son macromoléculas biológicas constituidas por residuos de aminoácidos enlazados entre sí por enlaces peptídicos. Las proteínas, como polímeros lineales de aminoácidos, también se llaman polipéptidos. Por regla general, las proteínas tienen 50-800 residuos de aminoácidos, y por tanto tienen pesos moleculares en el intervalo de aproximadamente 6.000 a aproximadamente varios cientos de miles de Dalton o más. Las proteínas pequeñas se llaman péptidos, oligopéptidos o polipéptidos. En el contexto de la presente invención, un "fragmento de polipéptido" para uso de acuerdo con la presente invención se refiere a un polipéptido que puede ser, pero no se limita a, de 1-50 aminoácidos de longitud, tal como 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos. Tales polipéptidos también pueden ser más largos que 50 aminoácidos.

Las proteínas de la matriz del esmalte son proteínas que normalmente están presentes en la matriz del esmalte, es decir, el precursor del esmalte (Ten Cate: Oral Histology, 1994; Robinson: Eur. J. Oral Science, Jan. 1998, 106 Suppl. 1:282-91), o proteínas que pueden obtenerse por escisión de tales proteínas. En general, tales proteínas tienen un peso molecular por debajo de 120.000 Dalton, e incluyen amelogeninas, no amelogeninas, no amelogeninas ricas en prolina y tuftelinas.

Los ejemplos de proteínas para el uso según la invención son amelogeninas, no amelogeninas ricas en prolina, tuftelina, proteínas del penacho, proteínas del suero, proteínas salivares, ameloblastina, sheathlina y derivados de las mismas, y mezclas de las mismas. Además, se encuentran otras proteínas para el uso según la invención en el producto comercializado EMDOGAIN® (BIORA AB, Suecia).

EMDOGAIN® (BIORA AB, S-205 12 Malmö, Suecia) contiene 30 mg de proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD), calentadas durante 3 horas a aproximadamente 80 °C a fin de inactivar proteasas residuales, y 1 ml de Disolución de Vehículo (Alginato de Propilenglicol), que se mezclan antes de la aplicación, a menos que la proteína y el vehículo estén ensayados por separado. La relación de pesos es aproximadamente 80/8/12 entre los picos de proteína principales a 20, 14 y 5 kDa, respectivamente.

En general, las proteínas mayoritarias de una matriz de esmalte se conocen como amelogeninas. Son sustancias notablemente hidrófobas que en condiciones fisiológicas forman agregados. Pueden llevar o ser portadoras de otras proteínas o péptidos.

No obstante, a la luz del hecho bien conocido de que la amelogenina es una proteína evolucionaria muy conservativa, y está documentado que la homología entre las especies es alta, se concibe en la actualidad que podrían encontrarse secuencias análogas en las proteínas de la matriz del esmalte de la rata, el ser humano o el ratón, p.ej. en la amelogenina, que ejerzan efectos biológicos similares, p.ej. posean actividad osteogénica. Por consiguiente la presente invención también abarca secuencias análogas a la amelogenina porcina, que son al menos 80-95% idénticas a la amelogenina humana, tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% idénticas, y que muestran actividad biológica idéntica.

En la presente invención, las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) pueden estar aisladas de tejido mamífero, ser fragmentos de polipéptidos recombinantes purificados, o fragmentos de polipéptidos que están fabricados sintéticamente. Como se sabe bien en la técnica, un polipéptido producido de manera recombinante diferirá ligeramente de la proteína modelo endógena, especialmente cuando es producido en un sistema procariótico. La presente invención abarca fragmentos de polipéptidos producidos de manera recombinante, que son al menos 95% idénticos a la amelogenina humana endógena, tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% idénticos, y que muestran actividad biológica análoga.

Un polipéptido fabricado sintéticamente, por otra parte, como se sabe bien en la técnica, puede diseñarse por supuesto para portar una diversidad de permutaciones químicas que no obstaculizarán y/o afectarán a su actividad biológica original, p.ej. su actividad antiinflamatoria o proangiogénica. Por consiguiente, la presente invención abarca también fragmentos de polipéptidos permutados sintéticamente que son al menos 80-95% idénticos a la amelogenina humana, un homólogo, análogo o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% idénticos, y que muestran actividad biológica análoga.

Adicionalmente, se considera que cualquier variante conservativa de la secuencia de un fragmento de polipéptido que sea al menos 80-95% idéntica a la amelogenina humana, tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5% idéntica, y que muestre actividad biológica análoga, está, en virtud de su relación funcional con dichas secuencias, dentro del alcance de la presente invención.

Una variante conservativa de una secuencia se define en el presente contexto como una secuencia de aminoácidos que se conserva al menos tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%, cuando se comparan variantes de la misma secuencia de aminoácidos entre especies diferentes. El grado de conservación de una variante puede calcularse, como se conoce en el campo, según su derivación de PAM (véase Dayhoff, Schwartz, y Orcutt (1978) Atlas Protein Seq. Struc. 5:345-352), o en base a comparaciones de Bloques de secuencias derivadas de la base de datos de Bloques descrita por Henikoff y Henikoff (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(22):10915-9.

Las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que pueden mezclarse con vehículos o diluyentes adecuados, que no interferirán con su propósito pretendido y se contemplarán aún como sustancialmente aisladas.

En la presente invención, es muy adecuado un programa de algoritmos locales para determinar la identidad. Los programas de algoritmos locales (tales como Smith-Waterman) comparan una subsecuencia en una secuencia con una subsecuencia en una segunda secuencia, y encuentran la combinación de subsecuencias y la alineación de esas subsecuencias que da la puntuación de similitud global más alta. Los espacios internos, si se permiten, están penalizados. Los algoritmos locales funcionan bien para comparar dos proteínas multidominio, que tienen un único dominio o solo un sitio de unión en común.

Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG (Devereux, J et al (1994)) BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S.F. et al (1990)). El programa BLASTX está disponible públicamente en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S.F. et al (1990)). Cada programa de análisis de secuencias tiene una matriz de puntuación por defecto y penalidades de espacios por defecto. En general, se esperaría que un biólogo molecular usara los ajustes por defecto establecidos por el programa informático usado.

Las proteínas de una matriz de esmalte pueden ser divididas típicamente en una parte de peso molecular alto y una parte de peso molecular bajo, fracción que contiene proteínas extraíbles en ácido acético denominadas generalmente amelogeninas (consúltense las patentes europeas EP-B-0 337 967 y EP-B-0 263 086).

En general, la matriz del esmalte, los derivados de la matriz del esmalte y las proteínas de la matriz del esmalte son sustancias hidrófobas, es decir, menos solubles en agua, especialmente a temperaturas aumentadas. En general, estas proteínas son solubles a valores de pH no fisiológicos y a una temperatura baja, tal como aproximadamente 4-20°C, típicamente alrededor de 4-8°C, mientras que se agregarán y precipitarán a la temperatura corporal (35-37°C) y pH neutro (aproximadamente a pH 7).

En una realización preferida específicamente, una formulación para el uso según la presente invención comprende por tanto proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) que, después de una aplicación *in vivo*, son capaces de formar agregados u oligómeros y precipitar. El tamaño de partícula de dichos agregados propensos a precipitar es menos que 70 nm, típicamente en un intervalo entre 1 nm y 70 nm (nanoesferas de amelogenina), tal como de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 20 nm, tal como entre 1 µm y 20 nm, 1 µm y 10 nm, 5 µm y 10 nm, 10 µm y 1 nm, 100 µm y 10 nm, 100 µm y 1 nm, 1 µm y 1 nm, 1 µm y 5nm, 1 µm y 15 nm.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas según la presente invención comprenden un vehículo farmacéutico adecuado seleccionado del grupo que consiste en un amortiguador universal, tal como un amortiguador de Britton-Robinson, un amortiguador de Carmody, un amortiguador acético (ácido acético/acetato de sodio), un amortiguador salino, un amortiguador cítrico (ácido cítrico/citrato de sodio y/o HCl/citrato de sodio), o un amortiguador de sodio físico, ácido acético acuoso, ácido cítrico y H₂O.

Si se añade arginina a la formulación, se añade al amortiguador y se ajusta el pH antes de mezclar el amortiguador con EMD.

El amortiguador de Britton-Robinson (conocido también como BRB, conocido también como PEM) es un amortiguador de pH "universal" usado para el intervalo pH 2 a pH 12. Por regla general, el pH se ajusta a valores más altos usando NaOH. Los amortiguadores universales consisten en mezclas de ácidos de fuerza decreciente (pK_a creciente), con lo que el cambio en pH es aproximadamente proporcional a la cantidad de álcali añadido. Consiste en una mezcla de H₃BO₃ 0,04 M, H₃PO₄ 0,04 M y CH₃COOH 0,04 M que ha sido valorada hasta el pH deseado con NaOH. Britton y Robinson también propusieron una segunda formulación que daba una respuesta de pH esencialmente lineal al álcali añadido de pH 2,5 a pH 9,2 (y amortigua a pH 12). Esta mezcla consiste en ácido cítrico 0,0286 M, KH₂PO₄ 0,0286 M H₃BO₃ 0,0286 M, veronal 0,0286 M y HCl 0,0286 M valorado con NaOH 0,2 M.

En una realización, se usa ácido cítrico para una formulación con un pH alrededor de 2 y TrisHCl para una formulación con un pH alrededor de 8.

En el contexto de la presente invención, una formulación puede ser una formulación farmacéutica y/o terapéutica y/o cosmética. En la actualidad, una formulación farmacéutica y/o terapéutica también pretende abarcar formulaciones cosméticas, así como formulaciones que pertenecen a la llamada zona gris entre farmacéuticas y cosméticas, es decir, cosmeceúticas.

5 Para la administración a un individuo (tal como un animal o un ser humano), las proteínas de la matriz del esmalte y/o las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) se formulan preferiblemente en una formulación farmacéutica que contiene las proteínas de la matriz del esmalte y/o las proteínas derivadas de la matriz del esmalte, y, opcionalmente, uno o más vehículos farmacéuticos adecuados.

10 Una formulación que comprende las proteínas de la matriz del esmalte y/o las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) según la presente invención, para ser administrada, puede adaptarse para la administración por cualquier vía adecuada, p.ej. por administración sistémica a un paciente mediante un tubo, jeringuilla, pulverizador o dispositivo de drenado.

15 Además, una formulación puede adaptarse para la administración en conexión con cirugía, p.ej. como una administración sistémica por infusión en la sangre, linfa, ascitos o fluidos espinales, o por inhalación. Para la aplicación sistémica, las formulaciones según la invención pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales y excipientes según la invención, incluyendo microesferas y liposomas.

20 La administración de una formulación según la presente invención también puede realizarse por cualquier otra vía de administración convencional, tales como, pero no limitadas a, una vía oral, parenteral, intravenosa, bucal, aural, rectal, vaginal, intraperitoneal, tópica (dérmica) o nasal, o por la administración a una cavidad corporal tal como p.ej. una raíz de un diente o un canal de una raíz de un diente.

Por supuesto, pueden ser relevantes también otras aplicaciones, tales como, p.ej., la aplicación sobre dentaduras postizas, prótesis, implantes, y la aplicación a cavidades corporales tales como la cavidad oral, nasal y vaginal. La mucosa puede seleccionarse de mucosa oral, bucal, nasal, aural, rectal y vaginal. Además, la aplicación puede ser directamente en o sobre una herida u otras lesiones de tejidos blandos.

25 Además, la aplicación dentro del área dental/odontológica es de gran importancia. Son ejemplos relevantes la aplicación a bolsas periodontales (dentales), a encías o a heridas gingivales u otras heridas situadas en la cavidad oral, o en conexión con cirugía oral.

30 Una formulación para uso de acuerdo con la presente invención puede estar, pero no se limita a, en la forma de, p.ej., una formulación fluida, semisólida o sólida tal como, pero no limitada a, líquidos disueltos para transfusiones, tales como suero salino estéril, disolución de Ringer, disoluciones de glucosa, suero salino tamponado con fosfato, sangre, plasma, agua, polvos, microcápsulas, parches bioabsorbibles, pociones, láminas, vendas, apósitos, implantes, píldoras, pulverizadores, jabones, supositorios, vagitorios, pasta de dientes, lociones, enjuague bucal, champú, microesferas, nanopartículas, pulverizadores, aerosoles, dispositivos para inhalación, disoluciones, dispersiones, agentes humectantes, suspensiones, emulsiones, pastas, pomadas, pomadas hidrófilas, cremas, geles, hidrogeles (p.ej. polietilenglicoles), vendajes, dispositivos, plantillas, geles inteligentes, injertos, disoluciones, emulsiones, suspensiones, polvos, películas, espumas, almohadillas, esponjas (p.ej. esponjas de colágeno), sistemas de administración transdérmica, gránulos, granulados, cápsulas, perlas de agarosa o chitosán, comprimidos, microcápsulas, polvos liofilizados, gránulos, granulados o pelets, y mezclas de los mismos.

40 Los agentes de suspensión adecuados son, p.ej., gomas existentes en la naturaleza tales como, p.ej., goma arábica, goma xantana o goma tragacanto; celulosas tales como, p.ej., carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina (p.ej. Avicel® RC 591, metilcelulosa); alginatos y kitosanos tales como, pero no limitados a, alginato de sodio, etc.

45 Una formulación líquida, para el uso de acuerdo con la presente invención, puede ser, p.ej., pero no se limita a, una disolución, dispersión o suspensión para la aplicación sobre una superficie de p.ej. un implante o dispositivo médico, o material para la sustitución de huesos. Una vez aplicada, la formulación puede solidificarse, p.ej. por secado, hasta una formulación sólida o al menos altamente viscosa que no se disuelve en el almacenamiento ni cuando el implante o dispositivo está en uso.

50 Tal formulación se aplica preferiblemente en condiciones estériles y/o esterilizadas después de la aplicación por irradiación o exposición a gas óxido de etileno. Cuando la formulación está en la forma de una formulación líquida, también puede aplicarse poco antes de que el implante o dispositivo médico, o material para la sustitución de huesos, se vaya a introducir en el cuerpo. Como alternativa a aplicar una formulación que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) en el implante o dispositivo médico, o material para la sustitución de huesos, la formulación puede aplicarse sobre una superficie de un tejido que esté en contacto con el implante o dispositivo médico, o material para la sustitución de huesos, tal como un tejido que comprenda una proporción sustancial de células epiteliales como se indicó anteriormente. Además, la formulación puede aplicarse tanto sobre el implante o dispositivo médico, o material para la sustitución de huesos, como sobre un tejido en contacto con los mismos.

Una formulación según la presente invención también puede formularse, además de lo que ya se ha descrito en la presente memoria, según la práctica farmacéutica convencional, véase, p.ej., "Remington's Pharmaceutical Sciences" y "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", editados por Swarbrick, J. & J.C. Boylan, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1988.

5 Un vehículo farmacéutico adecuado es una sustancia que es sustancialmente inocua para el individuo al que la formulación se va a administrar. Tal excipiente cumple normalmente los requisitos dados por las autoridades sanitarias nacionales. Las farmacopeas oficiales, tales como p.ej. la Farmacopea Británica, la Farmacopea de los Estados Unidos de América y la Farmacopea Europea, fijan estándares para vehículos farmacéuticos adecuados.

10 Los vehículos farmacéuticos adecuados pueden incluir disolventes, agentes amortiguadores, conservantes, humectantes, agentes quelantes, antioxidantes, estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes formadores de geles, bases de pomadas, potenciadores de la penetración, perfumes, polvos y agentes protectores de la piel. Sin embargo, debe ponerse énfasis en que la invención no se limita a los mismos.

15 En la presente invención, la formulación que comprende las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) puede ser incorporada en una matriz polimérica para que sea liberada por degradación de la matriz polimérica, por acción enzimática y/o por difusión. Dicha matriz polimérica es adecuada para el crecimiento celular interno, o bien oclusiva de las células. Por tanto, está comprendida en la invención en particular una formulación farmacéutica y/o cosmética de las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD), en una concentración total baja dentro de la formulación, en donde una regulación espacial y/o selectiva de la liberación de dichas proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) permite que se libere un gran porcentaje de las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) en el momento de una actividad celular apropiada.

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica y/o terapéutica para administrar las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) según la presente invención, que comprende una matriz polimérica, adecuada para el crecimiento, crecimiento interno y/o migración celular, o bien que es oclusiva de las células, y una fracción y/o fragmento de polipéptido, en donde dicha matriz se forma por una reacción de adición nucleófila entre un nucleófilo fuerte y un enlace insaturado conjugado, o un grupo insaturado conjugado.

25 En una formulación de pasta de dientes o enjuague bucal u otra formulación para la aplicación a los dientes o las raíces de los dientes, las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) según la presente invención pueden estar presentes en un estado disuelto en un vehículo de pH ligeramente ácido, o bien como una dispersión en un vehículo de pH neutro. Se prevé que las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) según la invención pueden formar una capa protectora sobre la superficie de los dientes, impidiendo de este modo la adhesión de bacterias productoras de caries. En tales preparaciones para el cuidado dental, las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) pueden formularse junto con uno o más compuestos que tengan un efecto preventivo de la caries, notablemente flúor u otro elemento traza tal como vanadio o molibdeno. A pH neutro, se cree que el elemento traza está unido a (p.ej. por enlaces iónicos) o incrustado en las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD), desde las que es liberado para ejercer su efecto preventivo de la caries cuando las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) se disuelven a un pH de aproximadamente 5,5 o menos, p.ej. debido a la producción de ácidos por las bacterias productoras de caries.

30 En una formulación farmacéutica para uso según la invención, las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte según la presente invención están presentes generalmente en una concentración que varía de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 99,9% en peso. La cantidad de formulación aplicada dará como resultado normalmente una cantidad de proteína total por cm^2 de área de pulpa dental correspondiente a de aproximadamente 0,005 mg/mm^2 a aproximadamente 5 mg/mm^2 , tal como de aproximadamente 0,01 mg/mm^2 a aproximadamente 3 mg/mm^2 .

35 En los casos donde las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte según la presente invención se administren en la forma de una formulación líquida, la concentración de las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte según la presente invención en la formulación está en un intervalo que corresponde a de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/ml , p.ej. de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 35 mg/ml , tal como 30 mg/ml . Son deseables en algunos casos, y también pueden obtenerse, concentraciones más altas, tal como una concentración de al menos aproximadamente 100 mg/ml .

Leyendas a las figuras

55 Fig. 1. Absorción UV-Vis de EMD en amortiguador BR a pH2 durante un aumento de temperatura de 20 a 30 °C y a temperaturas más altas. En presencia de arginina (Fig 1(b)). Los resultados obtenidos a pH5 se muestran en las Figs. 1(c) y 1(d).

Fig 2. Espectros FT-IR de segunda derivada de EMD (A) y EMD/arginina (B) a pH 2 y 25 °C, antes (curvas sólidas) y

después (curvas discontinuas) de un tratamiento con calor a 90 °C. Espectros 3D-DLS de EMD (C) y EMD/arginina (D) a pH 2 y 20 °C, antes (azul) y después (rojo) de un tratamiento con calor a 70 °C.

Fig. 3. Micrografías electrónicas de transmisión de EMD y EMD/arginina a pH 2 y 20 °C antes (A-C) y después (B-D) de un tratamiento con calor a 90 °C.

- 5 Fig 4. Espectros FT-IR de segunda derivada de EMD (A) y EMD/arginina (B) a pH 5 y 25 °C, antes (curvas sólidas) y después (curvas discontinuas) de un tratamiento con calor a 90 °C. Espectros 3D-DLS de EMD (C) y EMD/arginina (D) a pH 5 y 20 °C, antes (azul) y después (rojo) de un tratamiento con calor a 70 °C.

Fig. 5. Micrografías electrónicas de transmisión de EMD y EMD/arginina a 20 °C y pH 5 antes (A-C) y después (B-D) de un tratamiento con calor a 90 °C.

- 10 Fig 6. Espectros FT-IR de segunda derivada de EMD (A) y EMD/arginina (B) a pH 10 y 25 °C, antes (curvas sólidas) y después (curvas discontinuas) de un tratamiento con calor a 90 °C. Espectros 3D-DLS de EMD (C) y EMD/arginina (D) a pH 10 y 20 °C, antes (azul) y después (rojo) de un tratamiento con calor a 70 °C.

Fig. 7. Micrografías electrónicas de transmisión de EMD y EMD/arginina a pH 10 y 20 °C antes (A-C) y después (B-D) de un tratamiento con calor a 90 °C.

- 15 Fig. 8. T(t) a partir de medidas de flujo detenido sobre (A) EMD y (B) PGA/EMD en amortiguador BR (pH2 o pH5), con o sin arginina, mezclado con hidróxido de sodio para elevar su pH a 7.

Fig. 9. Tabla 1. Resumen de los parámetros usados para ajustar la ecuación (1) a los datos en la Fig. 8.

- 20 La Fig. 10 muestra la cinética de precipitación transiente desde EMD acuoso y gel Straumann Emdogain™ (EMD/PGA), reflejada por las medidas de flujo detenido de la transmitancia, T, en función del tiempo t, después de elevar el pH de los especímenes a 7, es decir, cerca del punto isoeléctrico del EMD (pH 6,8).

Fig 11 Configuración experimental para las medidas de flujo detenido, que comprende un fotoespectrómetro de flujo detenido BioLogic SFM-400 equipado con cuatro jeringuillas, un mezclador de bolas Berger (BB) y un mezclador de alta densidad (HDS) (29).

Sección experimental

- 25 Los presentes experimentos describen esfuerzos para mejorar la estabilidad y por tanto prolongar la capacidad regenerativa del gel Emdogain™ durante el almacenamiento a pH bajo, mediante el uso de pH bajo y/o arginina como supresor de la agregación. Se analizaron especímenes de EMD con y sin pH bajo y/o arginina por espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, espectroscopía de absorbancia UV-Vis, dispersión de luz dinámica en 3D y microscopía electrónica de transmisión. Los resultados demostraron que la arginina no solo estabiliza la estructura nativa del EMD durante un ciclado térmico a pH bajo, sino también puede inducir el repliegue a pH alto. Además, la fotoespectrometría de flujo detenido indicó que la presencia de arginina no influye en la precipitación del EMD desde la disolución acuosa ni el complejo de gel posteriormente a un aumento por etapas en el pH.

Experimento 1:

Materiales y métodos

- 35 EMD

Se liofilizó una disolución de EMD 2012 (Biora/Straumann) con una concentración de 29 mg/ml en 10 mg/ml de ácido acético acuoso usando un liofilizador Vitris, operando a -8°C. Se pusieron 100 a 150 g de la disolución de EMD en dos matraces cónicos de 250 ml, que se sumergieron en nitrógeno líquido, y se liofilizaron durante 48 h. El material liofilizado se recogió y se homogeneizó mediante una mezcla suave con una espátula, mortero y mano. Después se redisolvió el EMD a temperatura ambiente (RT) en amortiguador de Britton-Robinson (0,1M de H₃BO₃, H₃PO₄, CH₃COOH puros), y se ajustó el pH a 2, 2,5 y 10 a una concentración de EMD de 29 mg/ml. Se añadió arginina con una concentración de 500 mM a disoluciones amortiguadoras antes de la adición del EMD. Se almacenaron los especímenes con y sin arginina a 4 °C durante una noche antes de la caracterización a fin de estabilizarlos.

PGA

- 45 El PGA tenía su origen en FMC BioPolymer, y fue esterilizado por Sterigenics, San Diego, usando un acelerador de electrones de 20 eV (30 kGy por bolsa de 100 g). Fue proporcionado por Biora AB (Straumann AG, Basilea) y se almacenó a 4 °C en un frigorífico antes del uso. Se prepararon complejos hidrocoloides de proteína-vehículo (EMD/PGA) añadiendo EMD acuoso a polvo de PGA (EMD/PGA 1:2). Se agitaron las mezclas con una barra agitadora magnética hasta que el polímero se disolvió totalmente a temperatura ambiente, y posteriormente se almacenaron a 4 °C durante una noche para estabilización. Todos los especímenes se prepararon usando agua milli-Q desionizada doblemente.

Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR) en modo transmisión

Se usó Espectroscopía de infrarrojos en modo transmisión para monitorizar los cambios en la estructura secundaria del EMD después del tratamiento con calor (17). Se incubaron alícuotas de 200 µl de disoluciones de EMD, preparadas con pH diferente, a 25°C durante 1 hora. Después se aumentó la temperatura hasta 90 °C a 2 °C/min y se incubaron las alícuotas a esta temperatura durante 1 hora adicional. Después se enfriaron hasta 25 °C a 2 °C/min y se incubaron durante 12 horas a esta temperatura para mejorar su estabilidad. Se llevaron a cabo medidas de absorbancia de IR antes y después del tratamiento con calor depositando una gota de 10 µl de cada espécimen sobre una ventana IR de CaF₂ pulida y dejándola secar. Después de la adquisición, se usó un análisis derivativo secundario y normalización para resolver la estructura fina de los espectros en la región amida I.

10 Espectroscopía de absorción UV-Vis

Se puso EMD acuoso en una cubeta de cuarzo de 1 mm y se analizó mediante un espectrómetro V-670 Varian a una longitud de onda fija de 280 nm. Este valor corresponde a la absorción del triptófano, un aminoácido presente en el núcleo hidrófobo de las proteínas. Se midió la intensidad de absorción, que refleja la solubilidad del EMC, es decir, la exposición del triptófano al disolvente, a temperaturas entre 20 y 80 °C (Schmid, 2001).

15 Dispersión de luz dinámica

Se usó una tecnología avanzada de dispersión de luz dinámica (DLS) por correlación cruzada 3D modulada para investigar las dimensiones de los agregados de EMD. Las medidas se realizaron usando un aparato de LS Instruments equipado con un láser de He-Ne que emitía un haz de luz polarizada de una longitud de onda de 632,8 nm. Se pusieron los especímenes en tubos de vidrio de 10 mm de diámetro, y las medidas se realizaron a temperaturas de 20 a 70 °C en etapas de 10 °C. La celda de las muestras se mantuvo dentro de +/- 0,1 °C de la temperatura requerida usando un termostato controlado por un programa. Las fluctuaciones de intensidad dispersada se recogieron a un ángulo fijo de 90° promediando 3 ejecuciones de 600 segundos cada una. La función de correlación de tiempo (TCF) de la intensidad dispersada se analizó usando el método CONTIN (Block, I. D. & Scheffold, F. Modulated 3D cross-correlation light scattering: Improving turbid sample characterization. Review of Scientific Instruments, 2010; 81 : 123107-7).

25 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se investigó la morfología del EMD con y sin arginina, en diferentes amortiguadores y a diferentes pH, usando un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) Tecnai Spirit BioTWIN de 80 kV en modo de campo brillante. Se trataron por calor especímenes seleccionados a 90 °C, se enfriaron hasta 25 °C y se incubaron durante 12 h. Los especímenes para el análisis TEM se prepararon usando tinción negativa mediante un método secuencial de dos gotitas como se describe en la bibliografía (http://web.path.ox.ac.uk/~bioimaging/bitm/instructions_and_information/EM/neg_stain.pdf).

Fotoespectrometría de flujo detenido

La cinética de liberación desde EMD acuoso y EMD/PGA, y sus homólogos estabilizados por arginina se investigó por fotoespectrometría de flujo detenido (SF) de cinética rápida, con un dispositivo BioLogic SFM400/S conectado a una unidad espectrométrica MOS-250, que emitía luz a una longitud de onda de 290 nm. Se prepararon especímenes de EMD de 1 mg/ml con y sin arginina en amortiguador de Britton-Robinson a pH 2 y 5. Después se aumentó el pH hasta 7 (es decir, pH fisiológico) por adición de hidróxido de sodio (NaOH) 250 mM a los especímenes inicialmente a pH 2 y NaOH 50 mM a los especímenes inicialmente a pH 5. Se usó en todo el experimento un caudal total de 6 ml/s y un volumen celular de flujo total de aproximadamente 351 µl. En estas condiciones, el uso de una célula de flujo FC-15 para la detección de transmitancia implicó un tiempo muerto de 10 ms. Los especímenes tamponados y las disoluciones de NaOH se almacenaron en jeringuillas de alto rendimiento y se inyectaron volúmenes equivalentes (1:1) por medio de un mezclador de alta densidad en la célula de flujo de observación (1,5 mm de longitud de camino de luz). La transmitancia de los especímenes se midió durante un tiempo de aproximadamente 15 s, y la reproducibilidad se verificó repitiendo las medidas cuatro veces. El método y la configuración experimental se muestran esquemáticamente en la Fig 11 (Barth, I. Grillo, y M. Gradzielski. Dynamics of formation of vesicles studied by highly time-resolved stopped-flow experiments. Tenside Surf. Det., 2010, 47:300-306).

Resultados y discusión

Análisis estructural de disoluciones de EMD con y sin arginina a diferentes pH

Es bien sabido en el campo de la técnica que el EMD es muy soluble a 4°C. Por lo tanto, se disolvió EMD a 4°C y después se analizó a 25 °C (RT), antes y después de un tratamiento térmico a T=80, 70 y 100°C, respectivamente, a fin de investigar su estabilidad alrededor de RT incluso después de una fuerte tensión de temperatura.

Comportamiento de conformación y agregación del EMD

Como se muestra en la Fig. 1(a), la absorción UV-Vis del EMD en amortiguador BR a pH2 aumenta cuando la temperatura se elevó de 20 a 30 °C, indicando una tendencia de las proteínas EMD a desplegarse, exponiendo sus

residuos internos al amortiguador. La tendencia fue revertida a temperaturas más altas, sin embargo, disminuyendo gradualmente la absorción desde su nivel inicial, implicando que el EMD comienza a precipitar desde alrededor de 40 °C. Se observaron dos diferencias principales en presencia de arginina (Fig. 1 (b)): la intensidad de línea de base a 20 °C aumentó, indicando una agregación más extensa a temperaturas bajas que en ausencia de arginina, y la disminución en absorción a temperaturas altas fue menos marcada, sugiriendo una velocidad de precipitación reducida. Los resultados obtenidos a pH5 se muestran en las Figs. 1(c) y 1(d). El comportamiento fue cualitativamente similar al observado a pH2, pero la absorción alcanzó la saturación a 30 °C en este caso, reflejando una tendencia aumentada para que el EMD se solubilice a pH5, incluso en presencia de arginina, aunque se infirió de nuevo que la arginina causa una disminución en las velocidades de precipitación a temperaturas altas.

La Fig 2A muestra los espectros FT-IR de segunda derivada de EMD en amortiguador de Britton-Robinson a pH 2 en el intervalo de longitudes de onda correspondiente a la región amida I. A 25 °C, los espectros para los especímenes de EMD preparados mostraron picos a 1.652 y 1.660 cm^{-1} , que se asignaron a las hélices α . También fueron visibles picos de láminas β nativas a 1.620, 1.633 y 1.643 cm^{-1} , así como un pico de láminas β intermoleculares a 1.698 cm^{-1} (Lambright DG, Balasubramanian S, Boxer SG. Protein relaxation dynamics in human myoglobin. *Chemical Physics*, 1991. 158:249-260). Después de un tratamiento con calor e incubación durante 12 h a 25 °C, la intensidad del pico a 1.660 cm^{-1} disminuyó, y el pico a 1.652 cm^{-1} fue sustituido por un pico a 1.654 cm^{-1} , lo que ha sido relacionado previamente con conformaciones desordenadas (Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002; 35(4):369-430), sugiriendo cambios conformacionales significativos de las hélices α . Aunque el pico de láminas β nativas a 1.633 cm^{-1} no fue afectado en gran medida por el tratamiento con calor, los picos restantes mostraron intensidades y posiciones modificadas. Así, el pico a 1.620 cm^{-1} fue sustituido por un pico más intenso a 1.617 cm^{-1} , el pico de láminas β intermoleculares a 1.698 cm^{-1} fue desplazado a aproximadamente 1.697 cm^{-1} y apareció un pico adicional a 1.688 cm^{-1} . Esto es significativo, en tanto que picos intensos en el intervalo 1.620-1.615 cm^{-1} y en el límite de longitudes de onda altas de la región amida I pueden indicar una exposición de los contactos intermoleculares (Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002; 35(4):369-430). Tres picos adicionales a 1.668, 1.675 y 1.682 cm^{-1} se asignaron a vueltas β , que se considera que son indicadores de la compacidad de las estructuras de las proteínas, y pueden estar asociados con sitios de agregación, porque también aparecen en las superficies externas de las proteínas. Después de un tratamiento con calor, el pico de vueltas β principal a 1.682 cm^{-1} se desplazó a aproximadamente 1.680 cm^{-1} , indicando posiblemente de nuevo agregación (Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002; 35(4):369-430). El tratamiento con calor también dio como resultado un ligero aumento en la intensidad del pico de vueltas β a 1.668 y una disminución más sustancial en la intensidad del pico a 1.675 cm^{-1} .

La adición de arginina a pH 2 condujo a una disminución en la intensidad del pico de las hélices α centrado a alrededor de 1.660 cm^{-1} antes del tratamiento con calor, y una disminución pequeña adicional después del tratamiento con calor, mientras que el pico a 1.652 cm^{-1} estuvo presente tanto antes como después del tratamiento con calor (Fig 2B), indicando que las conformaciones asociadas con las hélices α permanecen estables. Además, el pico de láminas β a aproximadamente 1.620 cm^{-1} permaneció sin cambios después del tratamiento con calor, lo que sugiere que había tenido lugar un cambio conformacional limitado de la superficie expuesta. El pico más intenso en el espectro antes y después del tratamiento con calor fue el pico de vueltas β a aproximadamente 1.681 cm^{-1} . La posición de este pico fue la misma que la observada después del tratamiento con calor en ausencia de arginina, en cuyo caso el desplazamiento desde su valor original de 1.682 cm^{-1} hasta 1.681 cm^{-1} se atribuyó a agregación. Esto sugiere que la interacción proteína-proteína no es impedida por la presencia de arginina, lo que se espera que promueva la compacidad de la estructura de la proteína, explicando la alta intensidad del pico de vueltas β a 1.681 cm^{-1} . Tomados conjuntamente, estos resultados implican que la arginina estabiliza la estructura del EMD a pH 2 con respecto al tratamiento con calor. Sin embargo, no está claro si la arginina impide el despliegue y/o desnaturalización inducidos por calor, o si meramente favorece el repliegue a 25 °C posterior a la desnaturalización a temperaturas altas.

Para investigar esto adicionalmente, se llevaron a cabo in situ, por tanto, experimentos de absorbancia UV-Vis y 3D-DLS.

La distribución de tamaños de partícula del EMD en el amortiguador de Britton Robinson a pH 2 en ausencia de arginina mostró dos picos principales a aproximadamente 8 y 80 nm antes del tratamiento con calor, determinado por DLS (Fig 2C). Después del tratamiento con calor hasta 70 °C y enfriamiento hasta 20 °C la distribución de tamaños se hizo mucho más amplia, con picos que aparecieron a valores más altos. Por tanto, de manera consistente con los resultados de FT-IR, los cambios conformacionales dominaron en este caso, como también reflejan las micrografías TEM en la Fig 3A-B. Son visibles en la Fig 3A nanofilamentos y nanoesferas de aproximadamente 70 nm o menos de diámetro, típicos de la amelogenina en su estado nativo (Fanga PA, Conwayb JF, Margolisc HC, Simmerd JP, Beniasha E. Hierarchical self-assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. *Pnas* 2011; 108(34):14097-14102.), pero, como se ve en la Fig 3B, estos precipitaron parcialmente después del tratamiento con calor. La presencia de arginina a pH 2 confiere compacidad al EMD, como sugiere la Fig 2D, que también fue consistente con los resultados de FT-IR. Dado que FT-IR mostró que no se produjo desnaturalización del EMD en presencia de arginina, se concluye que el despliegue inducido por calor estuvo ausente a pH 2. Por tanto, la estructura de nanoesferas del EMD permaneció sustancialmente intacta (Fig 3C-D).

Además, aunque los cambios conformacionales inducidos por calor asociados con el pico a 330 nm estaban aún

presentes, fueron menos marcados. De hecho, el estado inicial del espécimen se recuperó en gran medida después del enfriamiento posterior e incubación a 20 °C, como refleja la forma de las curvas de absorbancia a longitudes de onda bajas, proporcionando evidencias adicionales de que la arginina limita las redistribuciones estructurales, presumiblemente por unión a las regiones hidrófobas de las proteínas constituyentes del EMD.

5 A pH 5 el espectro de FT-IR del EMD preparado (Fig 2A) mostró un pico de hélices α particularmente fuerte a 1.652 cm^{-1} , mientras que la intensidad del pico de hélices α a 1.660 cm^{-1} fue comparable con la observada a pH 2 (Fig 2A). A números de onda más bajos, se observaron picos característicos de láminas β nativas a 1.633, 1.623 y 1.615 cm^{-1} , estando este último pico ausente a pH 2 (Fig 2A). Los picos de vueltas β también estuvieron presentes a 1.668 y 1.682 cm^{-1} , pero el pico a alrededor de 1.675 cm^{-1} se fusionó con el pico principal a 163 cm^{-1} y fue mucho más débil que a pH 2, sugiriendo una estructura menos compacta. Finalmente, las bajas intensidades de los picos en la región del espectro de números de onda altos a alrededor de 1.688 cm^{-1} y 1.695 cm^{-1} , correspondiente a la banda de láminas β intermoleculares, indicó contactos intermoleculares relativamente débiles. El tratamiento con calor dio como resultado algunos cambios en la intensidad de estos picos, pero ninguna modificación cualitativa importante a la estructura secundaria, con la excepción de los picos de láminas β intermoleculares y nativas a 1.643 cm^{-1} y 1.695 cm^{-1} , respectivamente, que se desplazaron a números de onda más bajos. Por tanto, aunque la organización molecular del EMD fue modificada significativamente aumentando el pH, no sufrió cambios adicionales importantes después del tratamiento con calor.

La consecuencia principal de la adición de arginina a EMD a pH 5 fue un cambio en las conformaciones correspondiente a la región de números de onda altos, es decir, en las bandas de vueltas β y láminas β intermoleculares (Fig 4B). Antes del tratamiento con calor, el pico de vueltas β observado a alrededor de 1.675 cm^{-1} en ausencia de arginina se fusionó con el pico principal centrado en 1.668 cm^{-1} , y el pico de láminas β intermoleculares a 1.695 cm^{-1} aumentó en intensidad. En presencia de arginina, ambos componentes de las vueltas β fueron distinguibles. Sin desear limitar la invención a esta hipótesis particular, este efecto puede atribuirse a la formación de complejos entre la arginina e iones en el amortiguador que excluyen que las proteínas interactúen con el disolvente. Además, la arginina también puede interactuar con los sitios de unión externos del EMD. El tratamiento con calor dio como resultado una modificación de las vueltas β , reflejada por la reaparición de dos picos a 1.668 cm^{-1} y 1.675 cm^{-1} , y los picos de láminas β intermoleculares a números de onda altos disminuyeron en intensidad. Sin embargo, aunque el tratamiento con calor en presencia de arginina afectó a los picos asociados con interacciones intermoleculares, las hélices α nativas (1.652 y 1.660 cm^{-1}) parecieron más estables que en ausencia de arginina, donde los picos correspondientes mostraron cambios en intensidad significativos.

Los resultados de DLS en la Fig 4C mostraron que el máximo de distribución de tamaños de partícula del EMD preparado a pH 5 fue aproximadamente 80 nm. El tratamiento con calor condujo a una agregación aumentada, indicada por el ensanchamiento del pico y un desplazamiento hacia 500 nm, y también por las imágenes TEM (Fig 5A-B). Estuvieron presentes inicialmente nanofilamentos y nanoesferas aisladas (Fig 5A), pero se observó una aglomeración extensa después del tratamiento con calor (Fig 5B). Dado que FT-IR indicó poco despliegue, se supuso que las nanoesferas, cuyas dimensiones en el EMD preparado fueron consistentes de nuevo con las típicas de la amelogenina (Fanga PA, Conwayb JF, Margolisc HC, Simmerd JP, Beniasha E. Hierarchical self-assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. Pnas 2011; 108(34):14097-14102.), se agregaron durante el tratamiento con calor. Como se ve a partir de la Fig 4D, la arginina limitó esta agregación. De hecho, después del tratamiento con calor en presencia de arginina, el pico DLS principal a aproximadamente 100 nm se desplazó a por debajo de 80 nm y disminuyó ligeramente en intensidad, y apareció un pico adicional a aproximadamente 6 nm. Por tanto, como se observó a pH 2, el tratamiento con calor puede haber dado como resultado la precipitación de agregados más grandes. Esto fue reflejado por las imágenes TEM en la Fig 5C-D, lo que sugiere que los nanofilamentos iniciales presentes en los especímenes se han agregado y precipitado bajo el y/o después del tratamiento con calor, con lo que solo aparecieron en las imágenes las nanoesferas.

A pH 10, las conformaciones de las proteínas fueron modificadas fuertemente con respecto a las conformaciones nativas vistas a pH más bajo, como corroboran los espectros FTR (Fig 6A), que indicaron una proporción relativamente alta de estructura espiral aleatoria por ejemplo. Además, la combinación de pH alto y cargas iónicas estabilizó la estructura secundaria durante el tratamiento con calor en ausencia de arginina. En presencia de arginina, por el contrario, los espectros obtenidos antes y después del tratamiento con calor ya no se solaparon, la proporción de espirales aleatorias se redujo, y los picos correspondientes a las estructuras de las vueltas β fueron distinguibles de nuevo (Fig 6B).

Aunque los resultados de DLS (Fig 6C-D) proporcionaron poca visión adicional, las micrografías TEM en la Fig 7 confirmaron que la morfología del EMD es muy diferente de la observada a pH más bajo, caracterizándose por extensos aglomerados amorfos similares a geles.

Cinética de liberación desde disoluciones de EMD y geles de EMD/PGA: el papel de la arginina.

La Fig. 8 muestra la cinética de liberación transiente desde EMD acuoso y EMD/PGA, reflejada por las medidas de flujo detenido de la transmitancia, T , en función del tiempo, t , después de elevar el pH de los especímenes a 7, es decir, cerca del punto isoeléctrico del EMD (pH 6,8). Estos resultados mostraron de nuevo que la reducción del pH inicial a 2 o la adición de arginina dan como resultado una estabilización de las conformaciones de EMD nativas. Esto

fue evidente tanto para el EMD como los geles de EMD/PGA, en tanto que los juegos de datos respectivos se superpusieron, indicando una dinámica de liberación similar, con la excepción de los especímenes preparados sin arginina a pH5 (Fig 8A-B), que mostraron una turbidez significativamente mayor (es decir, T más baja) a un t dado, y por tanto una mayor tendencia a formar precipitados grandes. Se desprende que la complejación con PGA no modificó la respuesta intrínseca del EMD. Una comparación de la Fig 8A y la Fig 8B sugiere no obstante que el PGA limita la precipitación del EMD, siendo T aproximadamente 10% mayor para los geles de EMD/PGA que para el EMD en el t más largo, debido presumiblemente a un confinamiento físico del EMD por la matriz de PGA. Esto implica que solo es posible una precipitación total del EMD si el PGA es disuelto al menos parcialmente por el medio disolvente. El efecto del PGA podría ser demostrado adicionalmente ajustando los datos para T(t) usando una función de decaimiento exponencial de segundo orden:

$$T(t) = A_0 + A_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad \dots \text{Eq. (1).T}$$

La Eq. 1 describe dos etapas en la formación de precipitados de proteínas, un proceso rápido con una amplitud A_1 y una constante de decaimiento τ_1 , y un proceso lento dependiente de la gravedad con una amplitud A_2 y una constante de decaimiento τ_2 . Como se muestra en la Tabla 1, las constantes de decaimiento para el proceso lento fueron significativamente mayores para EMD/PGA que para EMD.

Estos resultados indican que la adición de arginina no tiene una influencia adversa sobre la precipitación en condiciones representativas para su aplicación en procedimientos quirúrgicos, y confirman el efecto estabilizante de las moléculas de arginina sobre el EMD con respecto a la agregación a pH 5 en presencia de PGA. Además, el PGA no tiene tal efecto estabilizante, con lo que las velocidades de liberación efectiva más lentas desde los geles de EMD/PGA pueden atribuirse a un atrapamiento físico del EMD en la red de hidrogel del PGA, retrasando la aglomeración a gran escala durante las etapas de precipitación tardías.

Cinética de precipitación desde disoluciones de EMD y geles de EMD/PGA: el papel de la arginina.

La Fig. 10 muestra la cinética de precipitación transiente desde EMD acuoso y gel Straumann Emdogain™ (EMD/PGA), reflejada por las medidas de flujo detenido de la transmitancia, T, en función del tiempo, t, después de elevar el pH de los especímenes a 7, es decir, cerca del punto isoeléctrico del EMD (pH 6,8). Estos resultados mostraron de nuevo que la reducción del pH inicial a 2 o la adición de arginina dan como resultado una estabilización de las conformaciones del EMD. Esto fue evidente tanto para el EMD como los geles de EMD/PGA, en tanto que los juegos de datos respectivos se superpusieron, indicando una dinámica de liberación similar, con la excepción de los especímenes preparados sin arginina a pH5 (Fig 10(a)-(b) y Tabla 1), que mostraron una turbidez significativamente mayor (es decir, T más baja) a un t dado, y por tanto una mayor tendencia a formar precipitados grandes. Se desprende que la formación de complejos con PGA no modificó la respuesta intrínseca del EMD en condiciones representativas de su aplicación a tejido periodontal dañado.

Conclusiones

Se ha mostrado usando diversas técnicas analíticas que la adición de arginina a EMD acuoso limita la desnaturalización del EMD a pH ácido, y también hay evidencias de que puede revertir el despliegue a gran escala a pH alto. La investigación de la cinética de liberación del EMD posterior a un aumento por etapas en pH hasta pH 7, que es cercano al punto isoeléctrico del EMD, también mostró que la arginina no tiene una influencia adversa sobre las velocidades de precipitación desde una disolución acuosa o bien un vehículo de gel de PGA. De hecho, la respuesta en sistemas con un pH inicial de 5 fue similar con arginina a la de a pH 2 tanto con como sin arginina, reflejando de nuevo el efecto estabilizante de la arginina sobre el EMD. Estos resultados indican por lo tanto que la arginina, cuyo uso en productos para el tratamiento dental ya está validado (Sakamoto R, Nishikori S, Shiraki K. High temperature increases the refolding yield of reduced lysozyme: implication for the productive process for folding. Biotechnol. Prog 2004; 20:1128-1133.15. Petrou I, Heu R, Stranick M, Lavander S, Zaidel L, Cummins D et al. A breakthrough therapy for dentin hypersensitivity: how dental products containing 8% arginine and calcium carbonate work to deliver effective relief of sensitive teeth. The Journal of Clinical Dentistry 2009; 20 (1): 23-31.), tiene el potencial de mejorar significativamente la vida de almacenamiento de geles a base de EMD/PGA usados en terapia regenerativa, sin comprometer la liberación del EMD en el sitio de aplicación.

REFERENCIAS

1. Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarström L. Emdogain – periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Invest* 4:120-125 (2000).
2. Hammarström et al., 1997, *Journal of Clinical Periodontology* 24, 658-668
3. Lyngstadaas et al., 2001, *Journal of Clinical Periodontology* 28, 181-188
4. US Patent No. 4,672,032
5. EP-B-0 337 967
6. EP-B-0 263 086
7. EP-1059934
8. EP- 01201915.4
9. WO 01/97834
10. WO 00/53197
11. WO 00/53196
12. WO 03/024479
13. WO 02/080994
14. Casal HL, Köhler U, Mantsch HH. Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B : an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein structure and Molecular Enzymology* 1998 ; 957(1) : 11-20.
15. Lambricht DG, Balasubramanian S, Boxer SG. Protein relaxation dynamics in human myoglobin. *Chemical Physics*, 1991. 158:249-260.
16. Sambrook, J. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
17. Ten Cate: *Oral Histology*, 1994; Robinson: *Eur. J. Oral Science*, Jan. 1998, 106 Suppl. 1:282-91.
18. Dayhoff, Schwartz, and Orcutt (1978) *Atlas Protein Seq. Struc.* 5:345–352.
19. Henikoff and Henikoff (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22):10915-9.
20. Devereux, J et al (1994).
21. Altschul, S.F. et al (1990).
22. Remington's *Pharmaceutical Sciences*
23. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*", edited by Swarbrick, J. & J. C. Boylan, Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.
24. KONG J, YU S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007; 39 (8): 549–559.

25. Herberhold H, Marchal S, Lange R, Scheyhing CH, Vogeland RF, Winter R.
Characterization of the Pressure-induced Intermediate and Unfolded State of Red-shifted Green Fluorescent Protein—A Static and Kinetic FTIR, UV/VIS and Fluorescence Spectroscopy Study. *J. Mol. Biol.* 2003; 330: 1153–1164.
26. Block, I. D. & Scheffold, F. Modulated 3D cross-correlation light scattering: Improving turbid sample characterization. *Review of Scientific Instruments*, 2010; 81 : 123107-7.
27. TEM
28. http://web.path.ox.ac.uk/~bioimaging/bitm/instructions_and_information/EM/neg_stain.pdf.
29. Barth, I. Grillo, and M. Gradzielski. Dynamics of formation of vesicles studied by highly time-resolved stopped-flow experiments. *Tenside Surf. Det.*, 2010, 47:300–306.
30. Barth A, Zscherp C. What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2002 ; 35(4):369–430.
31. Fanga PA, Conwayb JF, Margolisc HC, Simmerd JP, Beniasha E. Hierarchical self- assembly of amelogenin and the regulation of biomineralization at the nanoscale. *Pnas* 2011 ; 108(34) :14097-14102.
32. Schneider, CP, Shukla, D, Trout BL, Arginine and Hofmeister series, the role of ion-ion interactions in protein aggregation suppressoinp, *J. Phys.Chem.B* 2011, 115, 7447-7458.
33. Sakamoto R, Nishikori S, Shiraki K. High temperature increases the refolding yield of reduced lysozyme: implication for the productive process for folding. *Biotechnol. Prog* 2004; 20:1128-1133.15.
34. Petrou I, Heu R, Stranick M, Lavander S, Zaidel L, Cummins D et al. A breakthrough therapy for dentin hypersensitivity: how dental products containing 8% arginine and calcium carbonate work to deliver effective relief of sensitive teeth. *The journal of Clinical Dentistry* 2009; 20 (1): 23-31.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a. aislar proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) de unos dientes de mamíferos en desarrollo,
- b. disolver dichas proteínas aisladas en un vehículo farmacéutico adecuado,
- c. disminuir el pH de dicha formulación inicialmente hasta por debajo de pH 4, y
- d. calentar dicha formulación hasta entre 40-100°C durante al menos 10 minutos.
- 10 2. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 1, en donde el pH de dicha formulación es disminuido en la etapa c. hasta por debajo de 3,5, tal como hasta 3,5 como máximo, tal como hasta 2.
- 15 3. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 1 o 2, en donde la formulación en la etapa c. es calentada en la etapa d. hasta al menos 50 °C durante al menos 1 hora, tal como calentada hasta al menos 80°C durante al menos 3 horas.
- 20 4. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 1 o 2, en donde el vehículo farmacéutico adecuado se selecciona del grupo que consiste en un amortiguador universal, ácido acético acuoso, ácido cítrico y H₂O.
- 25 5. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) comprenden al menos 60-70% de amelogénina, que tiene un peso molecular medio seleccionado del grupo que consiste en entre 18 y 25 kDa, entre 20 y 24 kDa, entre 20 y 22 kDa, y 20 kDa.
- 30 6. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además mezclar la formulación de la etapa d. con un modificador de la viscosidad adecuado.
- 35 7. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 6, que comprende además ajustar el pH de la formulación de la etapa d. hasta al menos pH5 antes de mezclar dicha formulación con un modificador de la viscosidad adecuado.
- 40 8. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, en donde el modificador de la viscosidad es PGA.
- 45 9. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 7, en donde el PGA es PGA esterilizado por haces de electrones y en donde la formulación tiene un pH de al menos pH5.
- 50 10. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, en donde el PGA es alginato de propilenglicol (PGA) esterilizado, con un peso molecular medio ponderal por encima de 130 kDa.
11. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según las reivindicaciones 1-9, que comprende además ajustar el pH de la formulación de la etapa d. hasta pH 5 como máximo, tal como hasta entre pH 2 y pH 5, tal como entre pH 2,5 y pH 4,5, o tal como hasta pH 2,5.
12. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de la reivindicación 11, en donde dicha formulación se mezcla con un modificador de la

viscosidad adecuado.

- 5 13. Un procedimiento para producir una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en donde el modificador de la viscosidad es ácido hialurónico, tal como ácido hialurónico esterilizado por haces de electrones.
14. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado producido por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que se caracteriza por una vida útil y/o durabilidad de al menos 12 meses a 2°C-RT.
- 10 15. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética que comprende proteínas de la matriz del esmalte y/o proteínas derivadas de la matriz del esmalte (EMD) y un vehículo farmacéutico adecuado según la reivindicación 14, que comprende además arginina.
16. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según la reivindicación 15, en donde dicha arginina tiene una concentración de 500 mM como máximo.
- 15 17. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, que comprende además un cerámico óseo adecuado y/o un injerto óseo.
18. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, para uso en medicina.
- 20 19. Una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, para uso en el tratamiento de heridas y/o en el tratamiento de enfermedades periimplantarias y/o periodontitis.
20. Un kit que comprende una formulación farmacéutica, dental y/o cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, y al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en gránulos, cerámicos óseos, andamios, un injerto óseo, material de hueso natural, un bloque óseo, dientes artificiales y un implante.

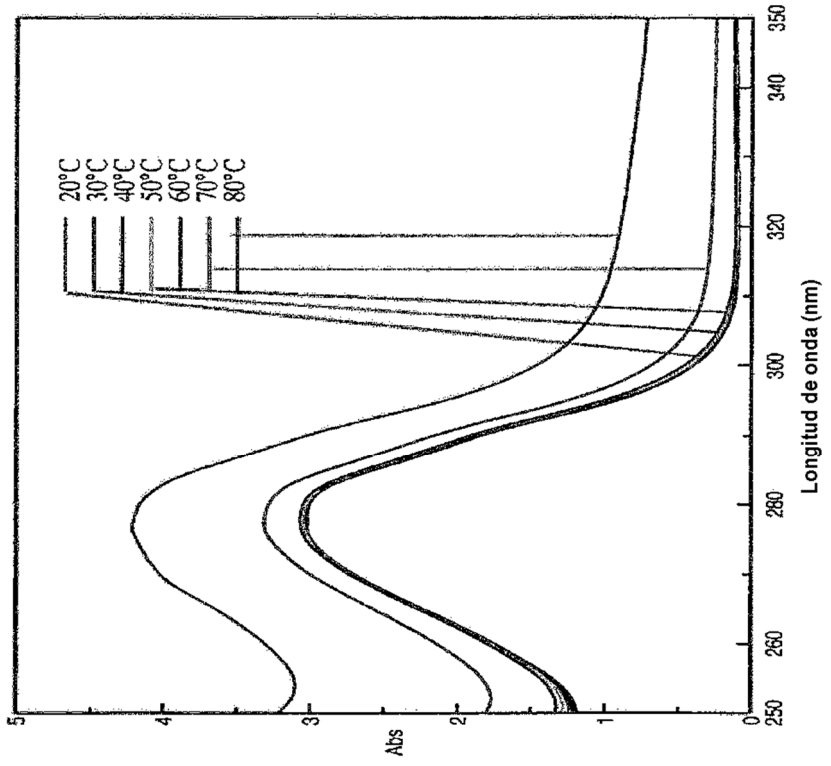
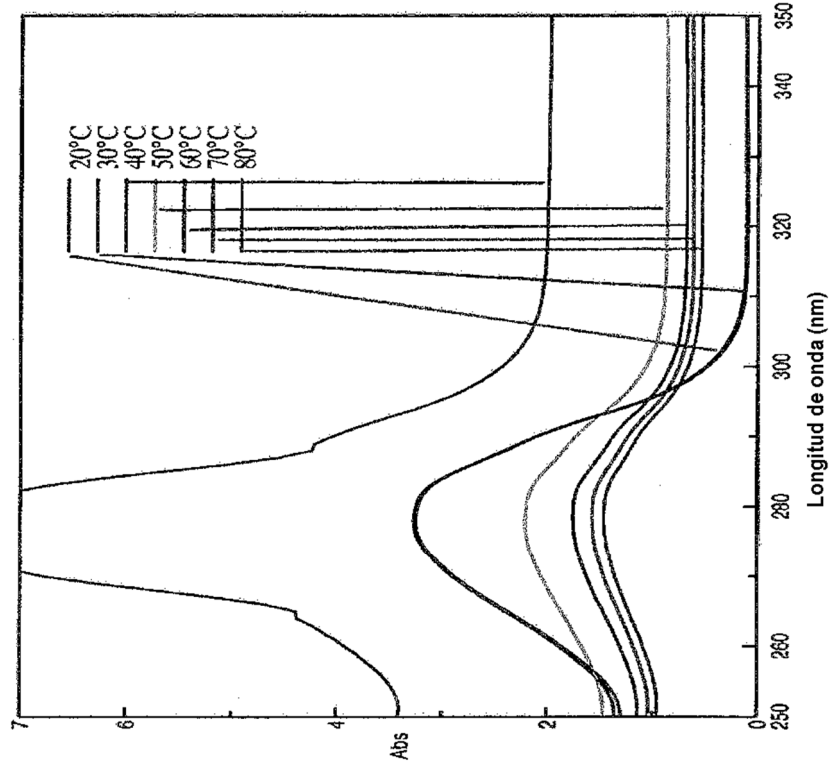


Fig.1 A/B

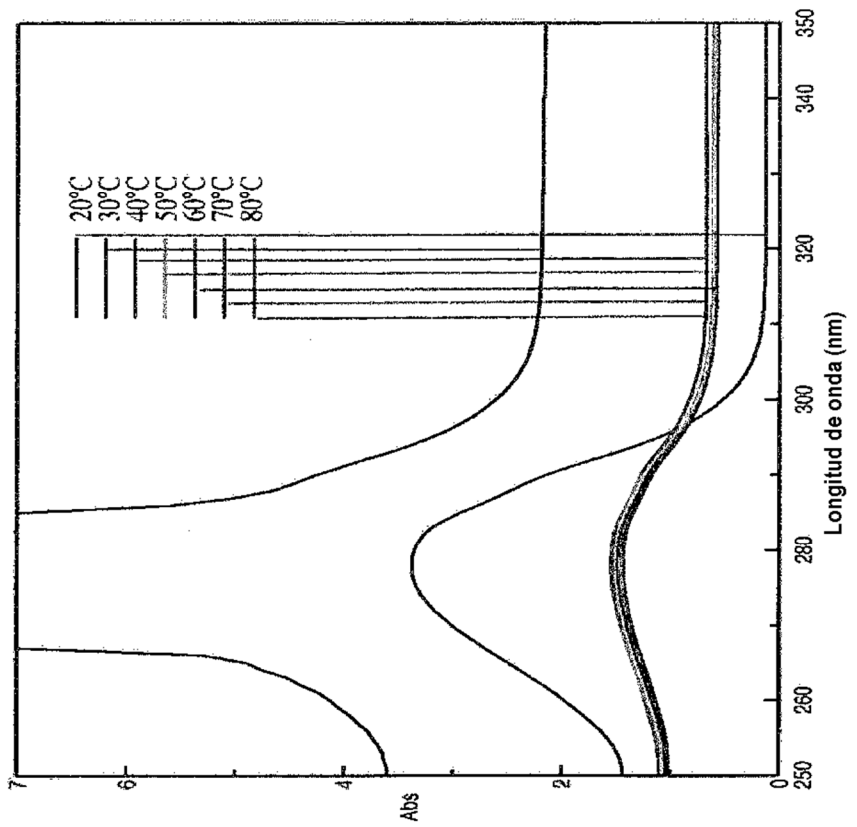
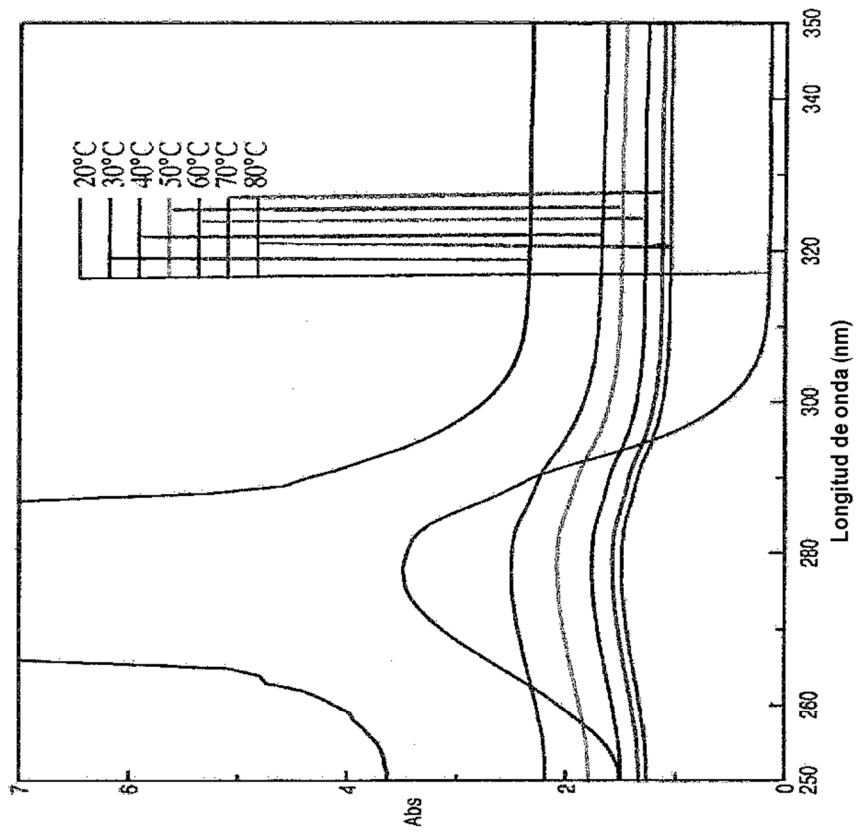


Fig.1 C/D

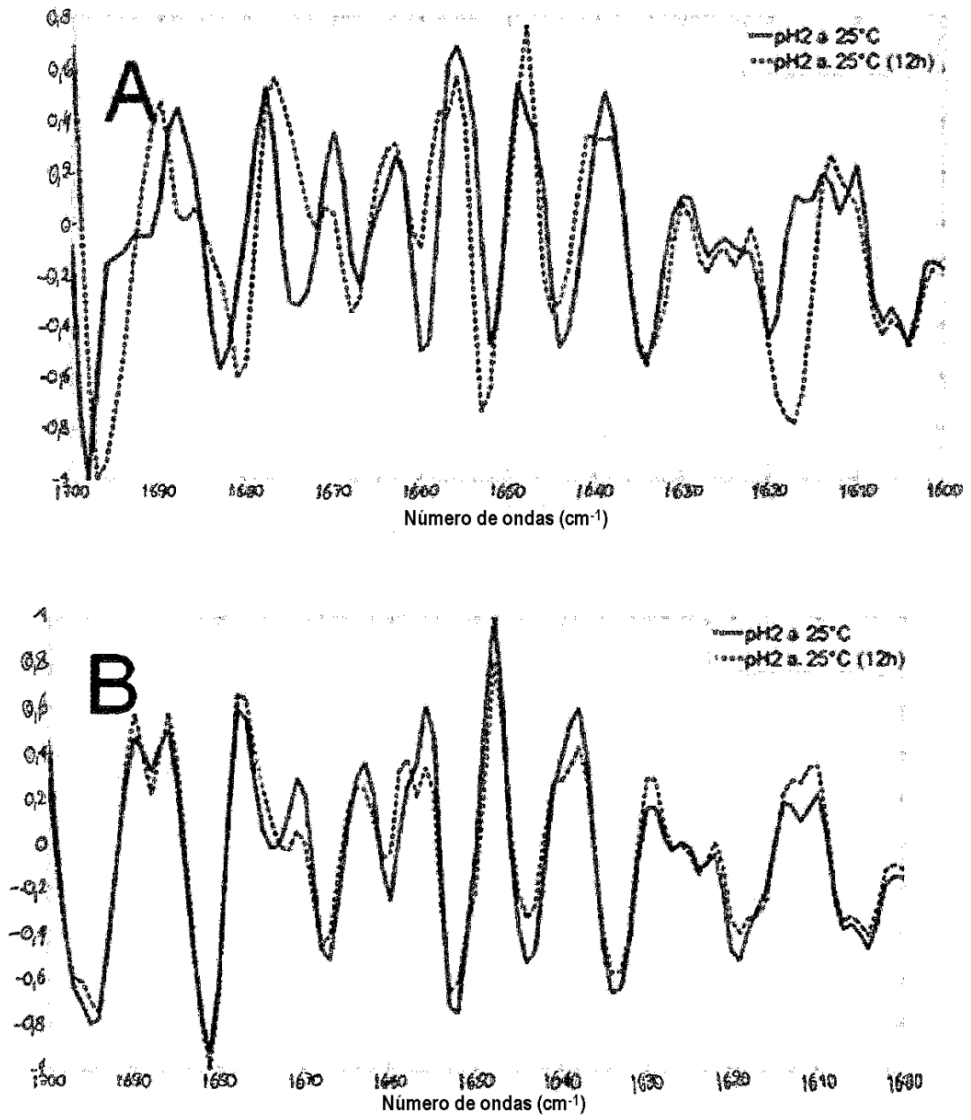


Fig.2 A/B

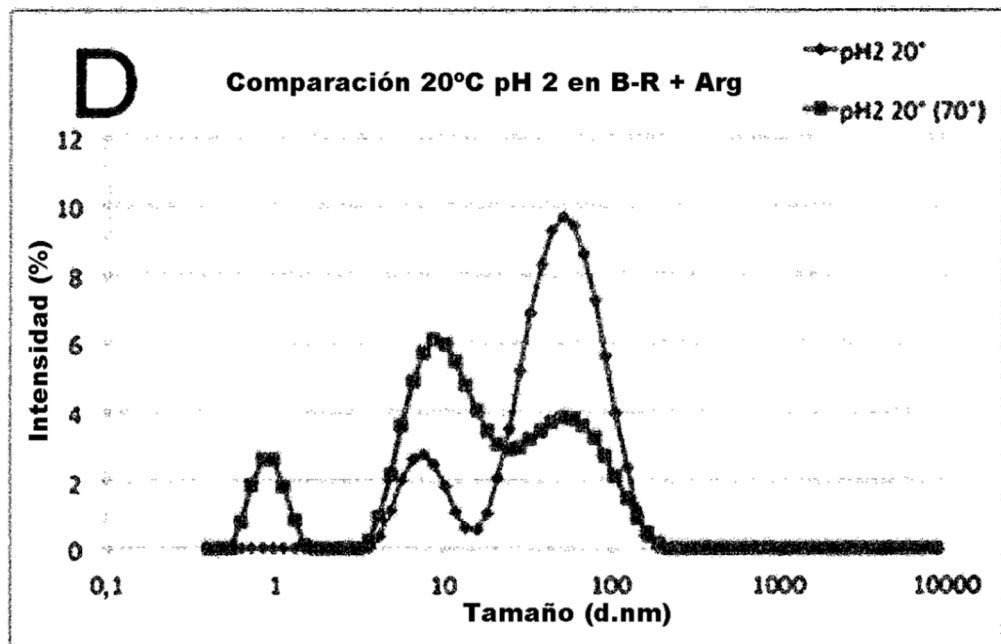
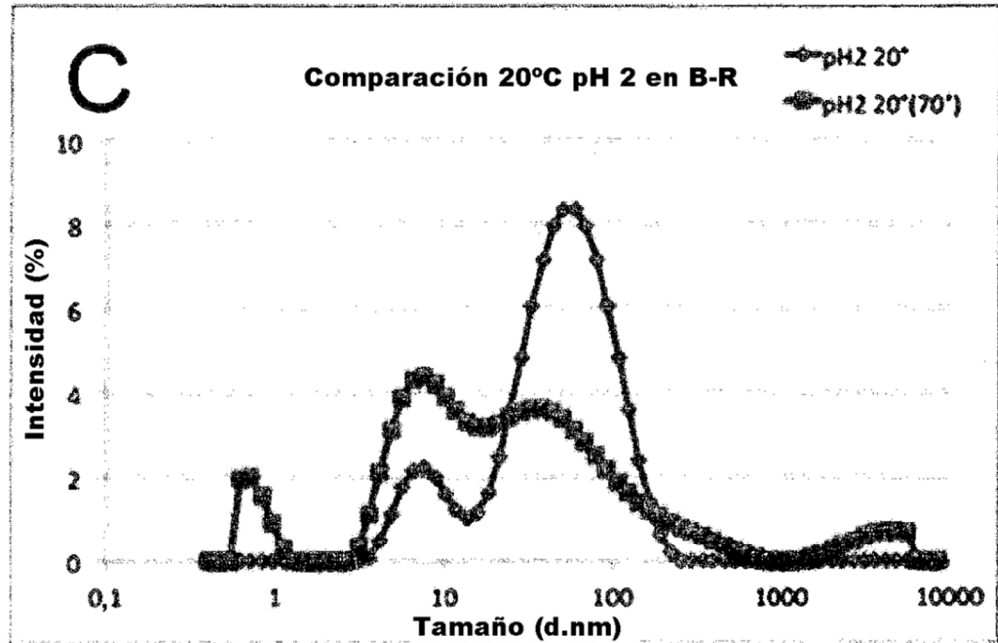


Fig.2C/D

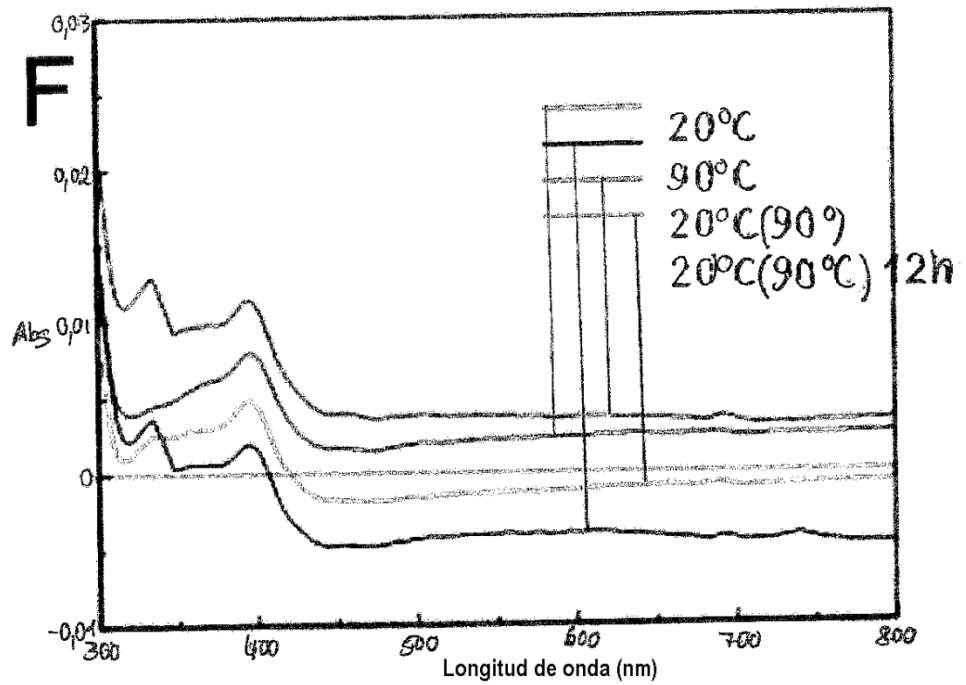
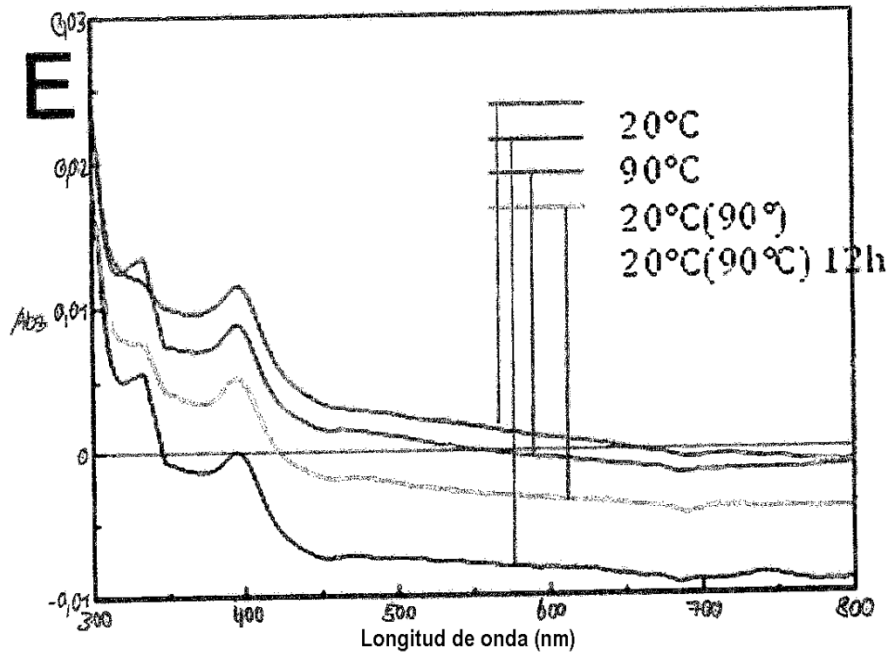


Fig.2E/F

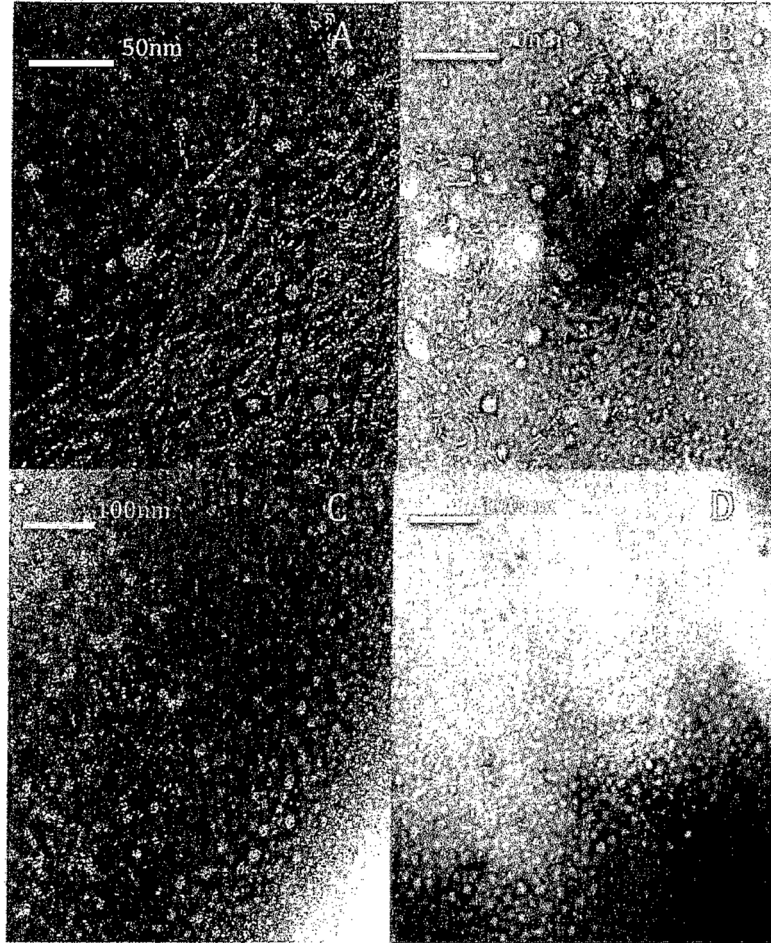


Fig.3

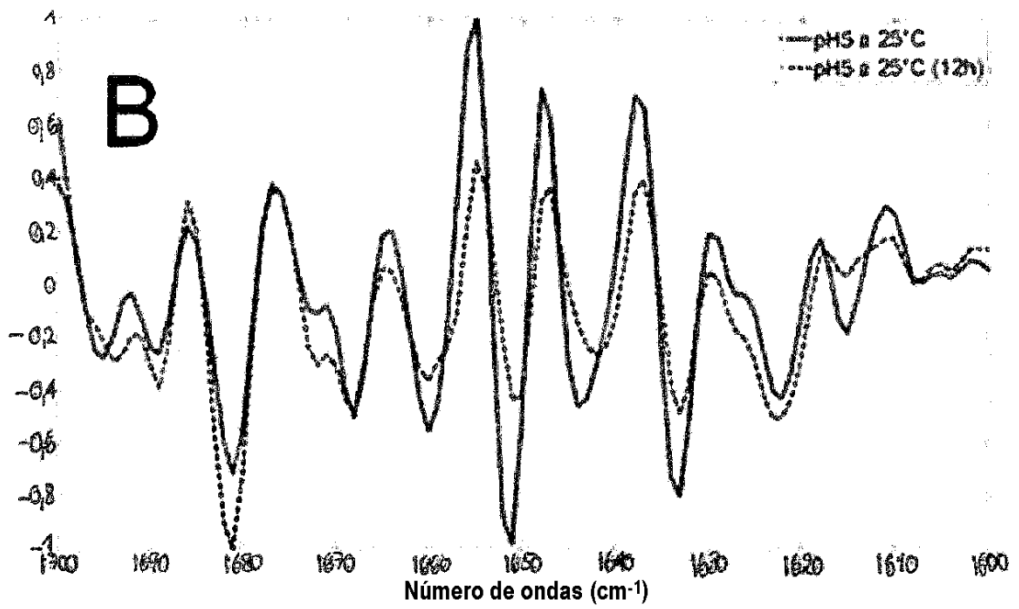
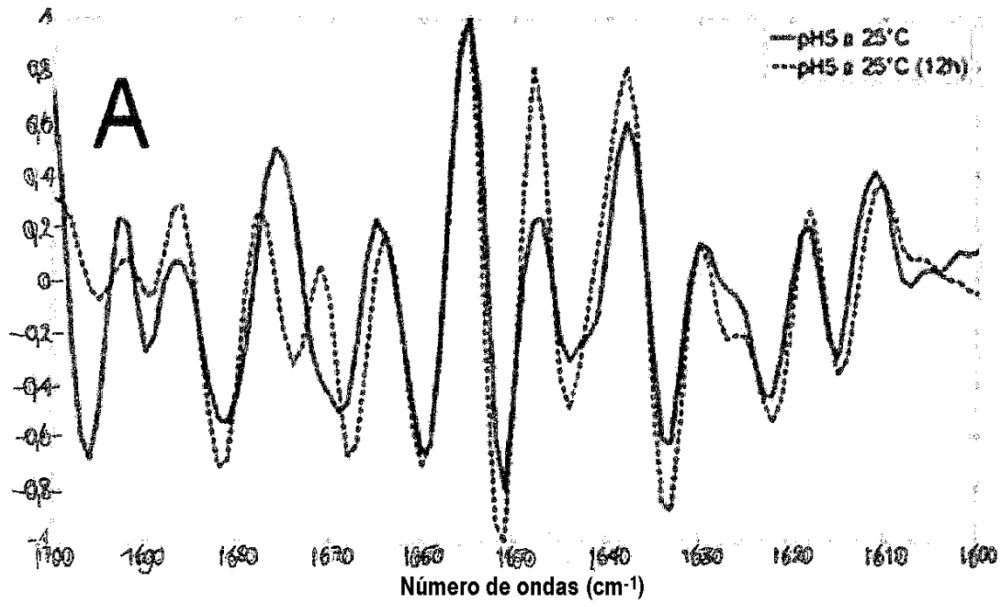


Fig4 A/B

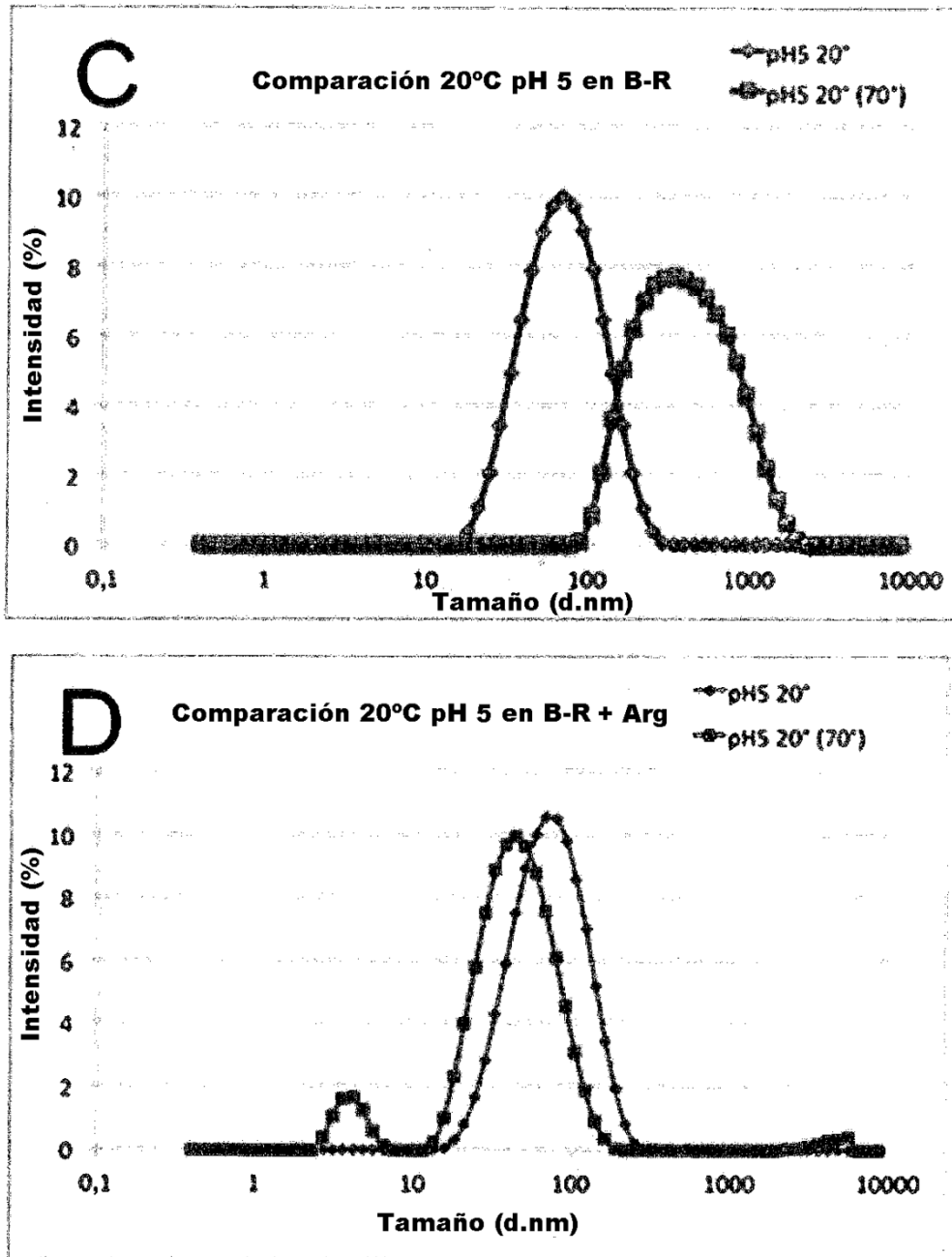


Fig4 C/D

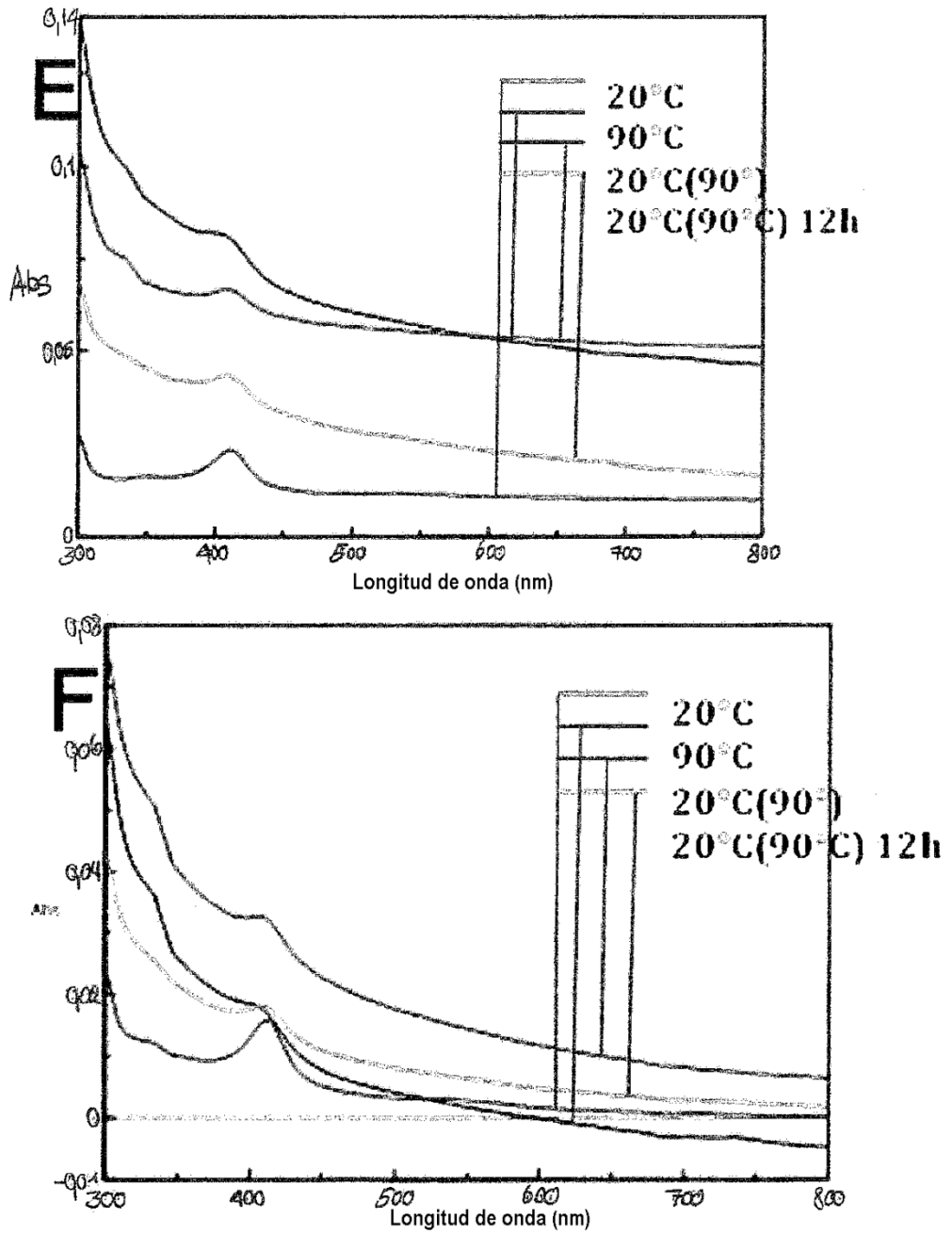


Fig4 E/F

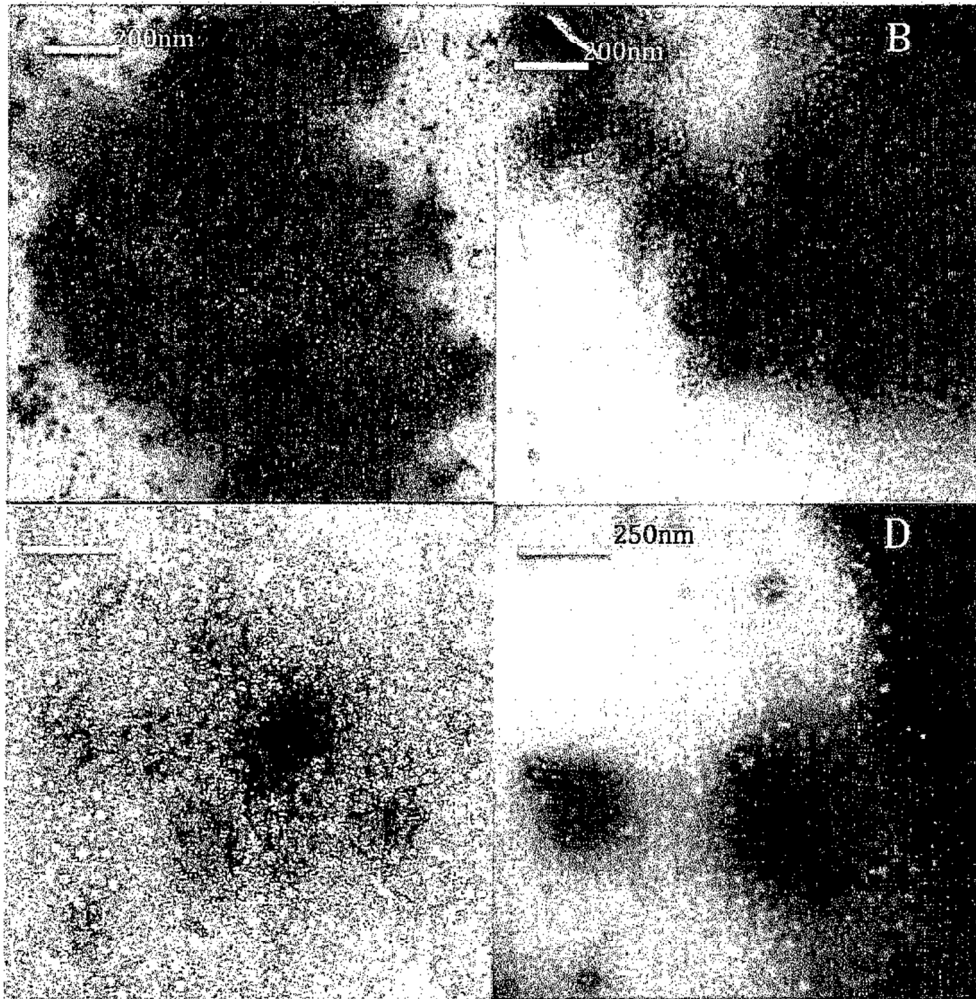


Fig 5

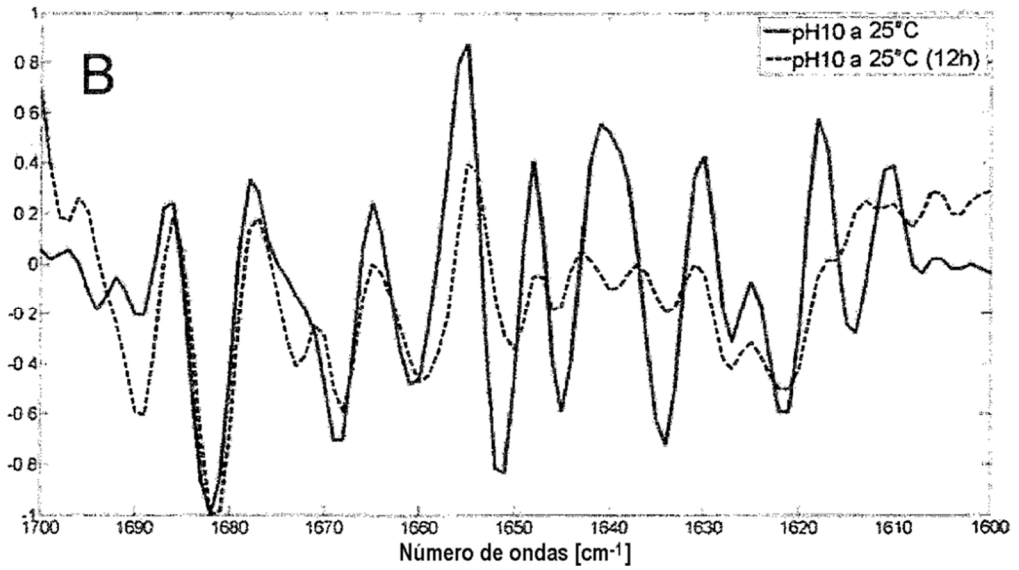
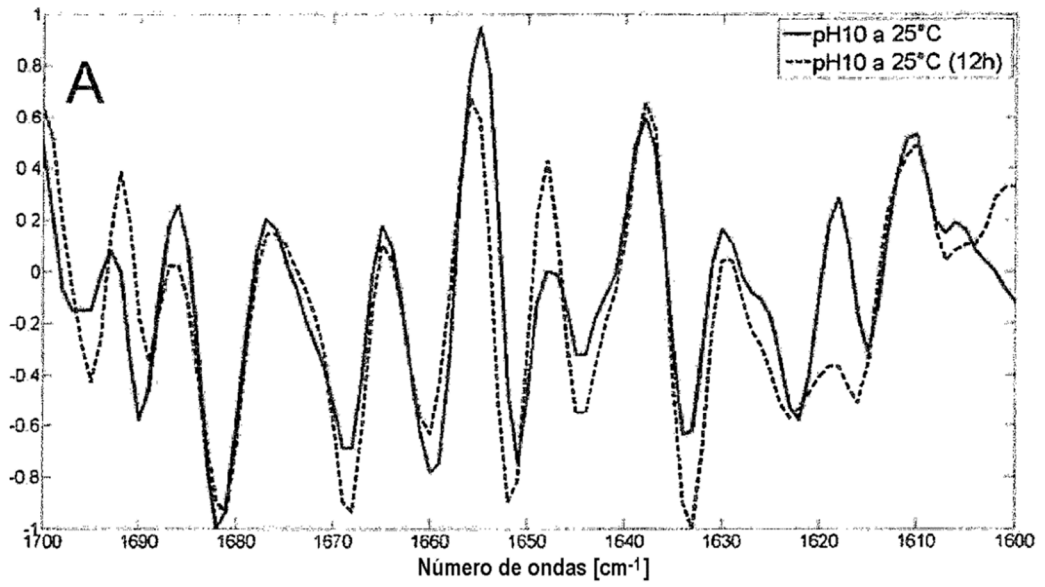


Fig 6 A/B

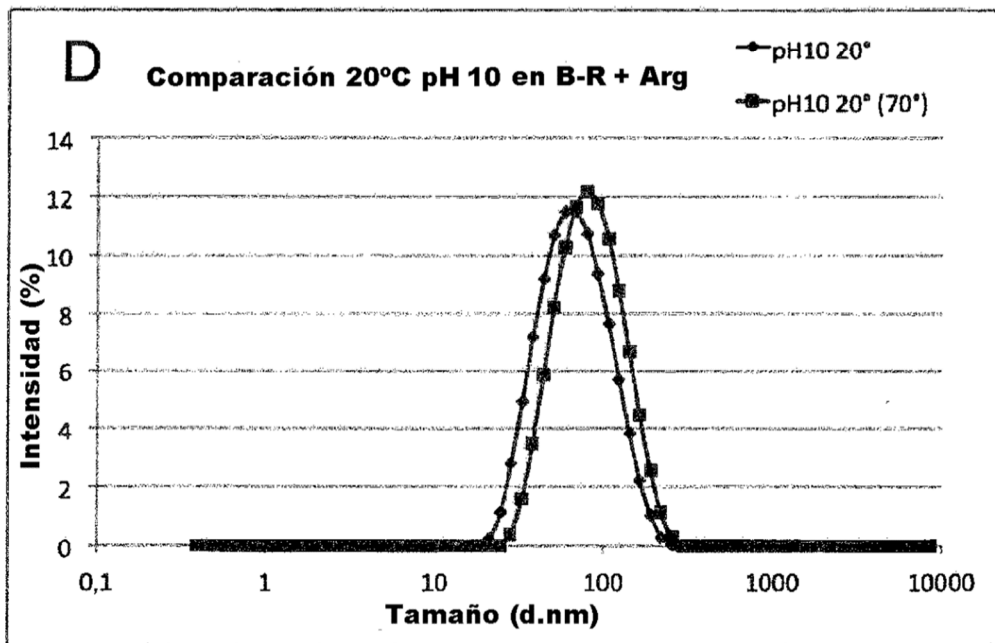
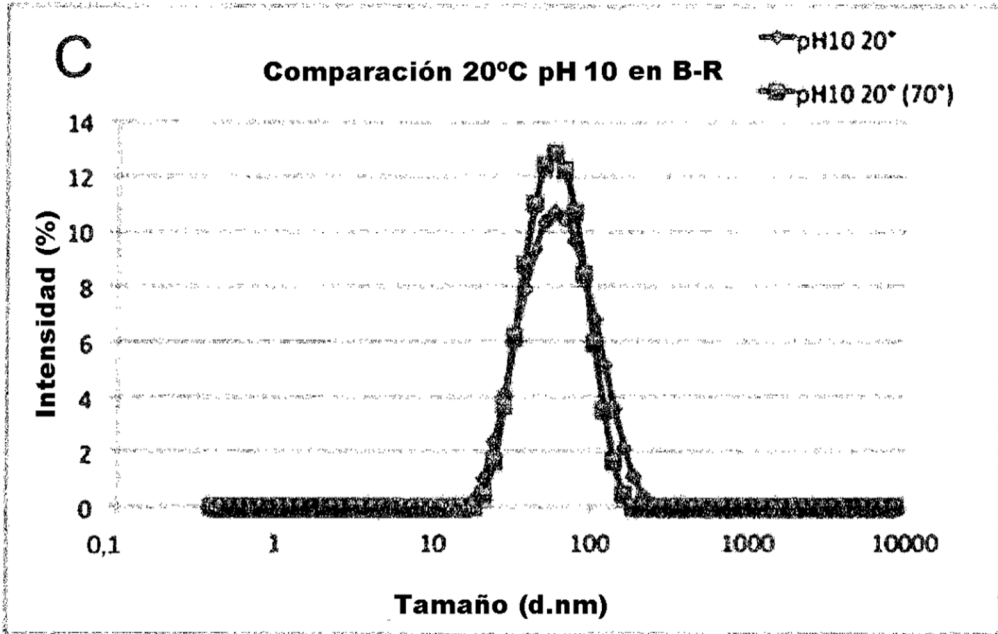


Fig 6 C/D

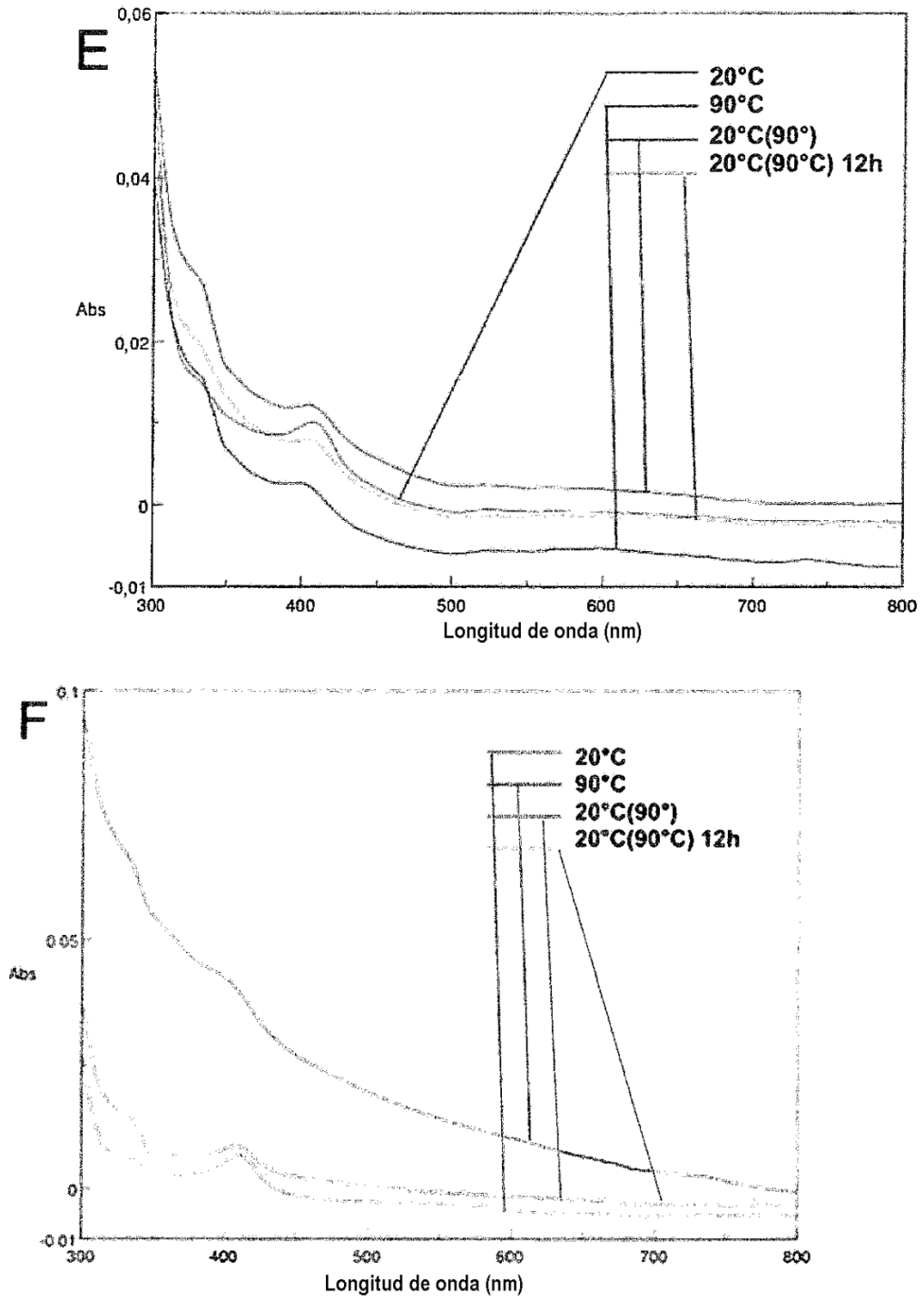


Fig 6 E/F

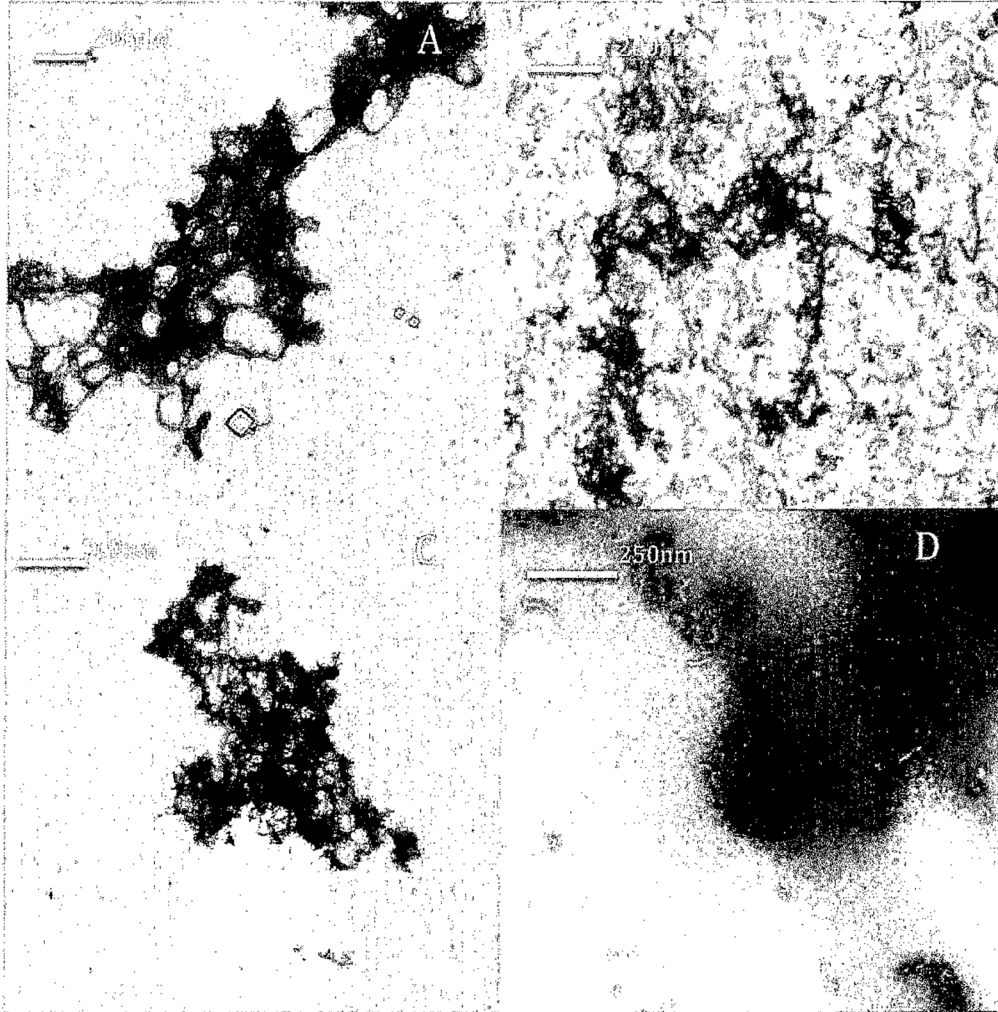


Fig 7

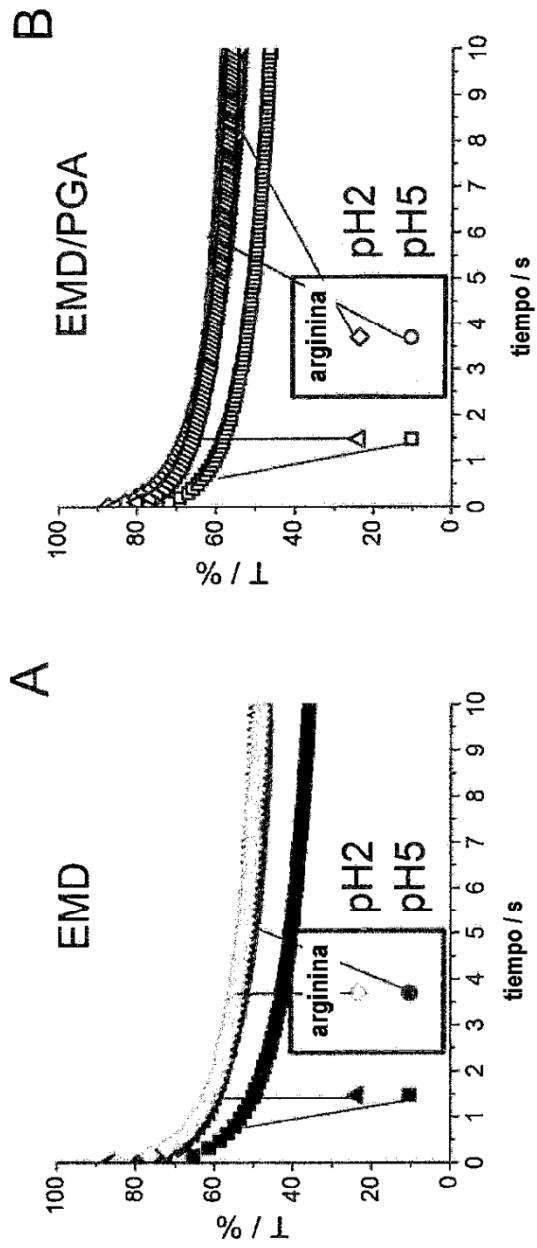


Fig. 8

| | EMD (0,5 mg/mL) | | | | EMD/PGA (0,5/1 mg/mL) | | | |
|----------|------------------|------------------|----------|----------|-----------------------|------------------|----------|----------|
| | EMD+ Arg pH 5 | EMD+ Arg pH 2 | EMD pH 5 | EMD pH 2 | EMD+ Arg pH 5 | EMD+ Arg pH 2 | EMD pH 5 | EMD pH 2 |
| A_0 | 46 | 48 | 35,9 | 48,7 | 56,5 | 59,4 | 46,1 | 55,2 |
| A_1 | 10,3 | 15,2 | " | 16,83 | 9,00 | 10,7 | 11,7 | 12,6 |
| τ_1 | 0,32 | 0,37 | 0,32 | 0,28 | 0,40 | 0,34 | 0,33 | 0,26 |
| A_2 | 21,8 | 20,1 | 22,3 | 18,3 | 14,4 | 16,6 | 18,3 | 17,1 |
| τ_2 | 3,24 | 3,32 | 3,22 | 2,85 | 3,72 | 3,47 | 3,46 | 3,14 |

Fig. 9

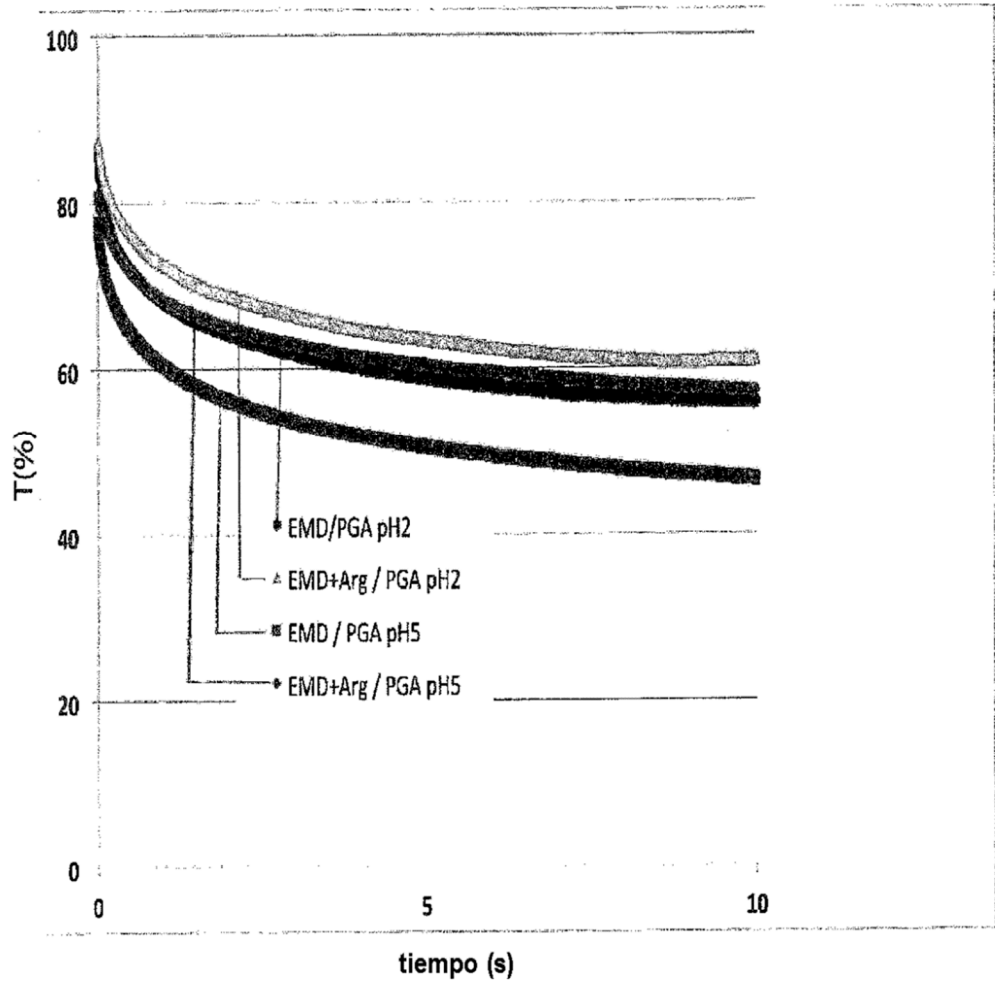


Fig. 10

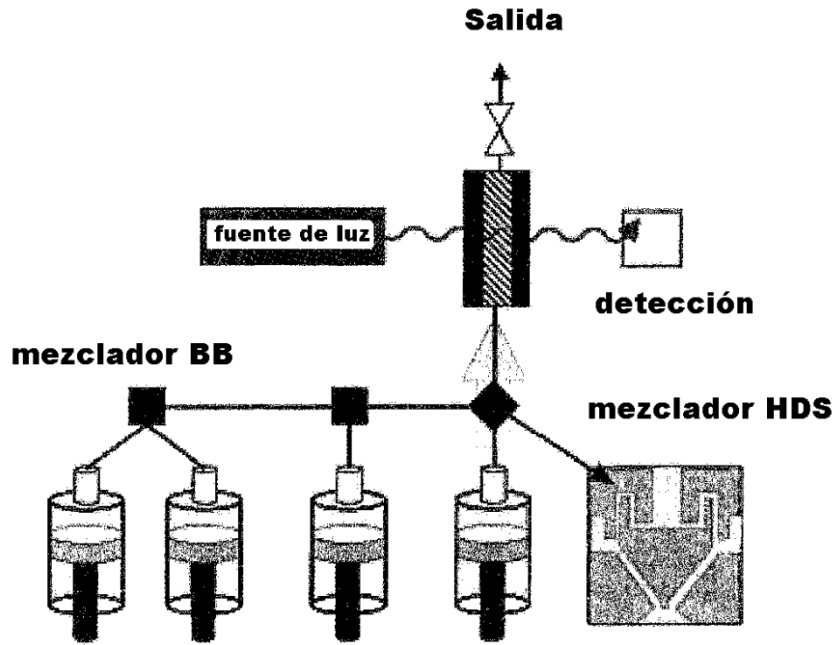


Fig. 11