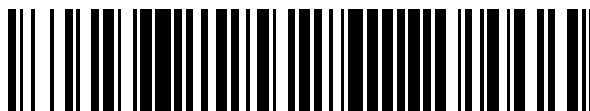


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 277**

51 Int. Cl.:

A61K 6/033 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61K 8/21 (2006.01)

A61K 8/24 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007** **E 13192021 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 2705826**

54 Título: **Composición de fluoruro y métodos para mineralización dental**

30 Prioridad:

09.02.2006 AU 2006900634
30.06.2006 AU 2006903531

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2020

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (100.0%)
The University of Melbourne
Victoria 3010, AU

72 Inventor/es:

REYNOLDS, ERIC CHARLES

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 277 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

Composición de fluoruro y métodos para mineralización dental

La presente invención se refiere a una composición para mineralizar una superficie dental, en particular esmalte dental. También se proporcionan métodos para mineralizar lesiones hipomineralizadas (que incluyen lesiones subsuperficiales) en el esmalte dental provocadas por la caries dental, la corrosión dental, la erosión y la fluorosis.

Antecedentes

La caries dental se inicia por la desmineralización del tejido duro de los dientes, habitualmente debido a ácidos orgánicos producidos a partir de la fermentación del azúcar de la dieta por las bacterias odontopatógenas de la placa dental. La caries dental sigue siendo un importante problema sanitario. Además, las superficies restauradas del diente pueden ser susceptibles a otras caries dentales alrededor de los márgenes de la restauración. Aunque la prevalencia de la caries dental ha disminuido mediante el uso de fluoruro en la mayoría de los países desarrollados, la enfermedad sigue siendo un importante problema sanitario. La erosión o corrosión dental es la pérdida de minerales del diente debido a los ácidos de la dieta o regurgitados. La hipersensibilidad dental es debida a la exposición de los túbulos de dentina por la pérdida de la capa mineralizada protectora, el cemento. Un cálculo dental es la acumulación no deseada de minerales de fosfato de calcio sobre la superficie del diente. Por tanto, todos estos trastornos, caries dental, corrosión dental, hipersensibilidad dental y cálculos dentales son desequilibrios en el nivel de los fosfatos de calcio.

Los dentífricos y enjuagues bucales que contienen fluoruro han demostrado disminuir significativamente la experiencia de caries en ensayos clínicos controlados aleatorizados (Biesbrock *et al.*, 1998; Biesbrock *et al.*, 2001; Curnow *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2002; Biesbrock *et al.*, 2003). La eficacia de estos productos para el cuidado oral en la reducción de la actividad de caries se ha atribuido a su capacidad para incorporar iones fluoruro en la placa, puesto que varios investigadores han sugerido que existe una relación inversa entre los niveles de fluoruro en la placa y la incidencia de la caries (Duckworth *et al.*, 1992, Duckworth y Stewart, 1994, Hartshorne *et al.*, 1994; Skold-Larsson *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2004).

Los iones fluoruro en la placa inmediatamente estimulan la formación de fluorhidroxiapatito en presencia de los iones calcio y fosfato producidos durante la desmineralización del esmalte dental por los ácidos orgánicos bacterianos de la placa (ten Cate, 1999). Ahora se cree que este es el mecanismo principal de la acción de iones fluoruro para prevenir la desmineralización del esmalte (ten Cate, 1999; Lynch *et al.*, 2004). Sin embargo, los iones fluoruro también pueden estimular la remineralización del esmalte previamente desmineralizado, si están disponibles los suficientes iones fosfato y calcio de la placa o salivares cuando se aplica el fluoruro. Por cada dos iones fluoruro, son necesarios diez iones calcio y seis iones fosfato para formar una unidad de celdilla de fluorapatito. Por tanto, tras la aplicación tópica de los iones fluoruro, la disponibilidad de los iones de calcio y fosfato puede limitar la tasa neta en la que se produce la remineralización del esmalte. Unas condiciones xerostómicas (boca seca) pueden exacerbar mucho esto. Además, puesto que los tratamientos con fluoruro pueden conducir a fluorosis, en particular en niños, sería ventajoso producir composiciones de tratamiento dental que tengan la mayor eficacia para la cantidad de fluoruro presente, para reducir la cantidad global de fluoruro necesaria para lograr el efecto de mineralización.

El documento WO 98/40406, a nombre de The University of Melbourne (cuyo contenido se incorpora totalmente en la presente como referencia) describe complejos de caseína fosfopéptido-fosfato de calcio amorfo ("casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate complexes", CPP-ACP) y complejos de fosfato de fluoruro de calcio amorfo estabilizados por CPP ("CPP-stabilised amorphous calcium fluoride phosphate complexes", CPP-ACFP) que se han producido a un pH alcalino. Se ha demostrado que CPP-ACP (disponible en el mercado como Recaldent™) remineraliza lesiones subsuperficiales del esmalte *in vitro* e *in situ* (Reynolds, 1998; Shen *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2003).

Los CPP que son activos para formar los complejos lo son tanto si forman parte de una proteína de caseína de longitud completa como si no forman parte de esta. Se han especificado ejemplos de principios activos (CPP) que pueden aislarse después de la digestión triptica de la caseína de longitud completa en la patente de EE. UU. n.º 5.015.628 e incluyen los péptidos Bos α_{s1} -caseína X-5P (f59-79) [1], Bos β -caseína X-4P (f1-25) [2], Bos α_{s2} -caseína X-4P (f46-70) [3] y Bos α_{s2} -caseína X-4P (f1-21) [4] como sigue:

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

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

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

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

Las solicitudes de patente internacional n.ºs WO 03/059303 y WO 03/059304, a nombre de Procter & Gamble Company, identifican las dificultades de mantener unos niveles de iones fluoruro mensurables en composiciones orales que contienen complejos CPP-ACP y fluoruro, y proponen incluir componentes adicionales para mantener unos niveles de fluoruro mensurables.

- 5 El documento US2005/037948 A1 describe una composición líquida, tal como un enjuague bucal o colutorio que comprende ACP o ACFP pero no está presente el ion fluoruro en la disolución.

Sería útil aumentar la actividad de remineralización de los complejos CPP-ACP o composiciones de fluoruro para tratar mejor trastornos tales como la caries dental.

- 10 Por consiguiente, un objeto de la presente invención es solucionar, o al menos aliviar, una o más de las dificultades y/o deficiencias relacionadas con la técnica anterior.

Sumario de la invención

- 15 En un aspecto, la presente invención proporciona un colutorio, un enjuague bucal, u otras composiciones líquidas orales que comprenden un fosfato de calcio amorfo (ACP, por sus siglas en inglés) estabilizado por fosfopéptidos o fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP, por sus siglas en inglés), y estabilizado por fosfopéptidos, iones fluoruro libres, en la que la formulación no contiene un quelante de calcio ni un tampón fosfato y en la que dicho fosfopéptido es un fosfopéptido de caseína.

En una realización preferida, dichos iones fluoruro se seleccionan del grupo que consiste en fluoruro de sodio; fluoruro estano; fluoruro de amina y combinaciones de los mismos.

- 20 Preferiblemente, dicho fosfopéptido de caseína, incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de:

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

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

- 25 [3] Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰. α_{s2}(46-70)

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

- 30 En esta composición líquida oral, los iones fluoruro pueden estar presentes en una cantidad de 200 ppm a 3000 ppm, preferiblemente en una cantidad de 400 ppm a 1500 ppm.

En esta composición líquida oral, el fosfato de calcio amorfo (ACP) estabilizado por fosfopéptidos y/o el fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP) estabilizado por fosfopéptidos pueden estar presentes del 0,01 al 50% en peso, preferiblemente del 1,0 al 50% en peso, más preferiblemente al 2% en peso.

Dicha composición líquida oral puede ser un restaurador dental.

- 35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición líquida oral tal como se definió anteriormente, para su uso en la mineralización dental de una superficie o subsuperficie dental, preferiblemente para uso en animales domésticos, animales de compañía o animales del zoológico.

- 40 La presente solicitud también describe otras composiciones para la mineralización dental que incluyen fosfato de calcio amorfo (ACP, por sus siglas en inglés) estabilizado y una fuente de iones fluoruro. En estas composiciones, el ACP también puede contener algunos iones fluoruro, y estos iones fluoruro pueden ser parte de un complejo de fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP) estabilizado.

- 45 Estas composiciones pueden incluir cualquier composición oral estable, tal como una composición para mantener la salud oral/dental usada por el paciente y/o una composición de tratamiento para su uso por el dentista. Estas composiciones pueden incluir pastas de dientes, geles dentales, polvos dentales, cremas dentales, dentífricos líquidos, colutorios, trociscos, gomas de mascar, cremas de masaje gingival, comprimidos para gárgaras y restauradores dentales.

- 50 Ahora se ha descubierto que la eficacia de remineralización dental de una composición oral que incluye una fuente de iones fluoruro puede ser sustancialmente potenciada por la adición de ACP estabilizado a la composición. Además, la captación de iones fluoruro hacia el interior del esmalte dental desde una composición oral que contiene una fuente de iones fluoruro puede ser potenciada por la inclusión de ACP estabilizado en la composición.

Esta superficie o subsuperficie dental puede ser el esmalte dental.

El ACP puede ser una forma soluble básica de ACP.

5 Los iones fluoruro pueden estar presentes en las composiciones en una cantidad mayor que 1 ppm. La cantidad puede ser mayor que 3 ppm. También puede ser mayor que 10 ppm. Tal como se describe a continuación, la cantidad puede ser de varios cientos o miles de ppm. El contenido en fluoruro generalmente se mide como ppm en las composiciones orales de una manera habitual en la técnica. Cuando el fluoruro se proporciona procedente de una fuente con el ACP estabilizado, los ppm se refieren a la concentración del fluoruro en esa fuente, generalmente una disolución o una suspensión del fluoruro biodisponible.

10 Los iones fluoruro pueden proceder de cualquier fuente adecuada. Una fuente de iones fluoruro puede incluir iones fluoruro libres o sales fluoruro. Los ejemplos de fuentes de iones fluoruro incluyen, pero no se limitan a las siguientes: fluoruro de sodio, monofluorofosfato de sodio, fluoruro estano, silicofluoruro estano y fluoruro de amina. Estos pueden proporcionarse en disolución (generalmente una disolución acuosa) o una suspensión.

15 En la composición líquida oral de la invención, el ACP se estabiliza con fosfopéptidos (PP, por sus siglas en inglés) y el fosfopéptido es un fosfopéptido de caseína. El ACP es así en forma de un complejo de ACP estabilizado por fosfopéptidos de caseína.

20 También se describe un método para mineralizar la superficie o subsuperficie de un diente que comprende aplicar un complejo de ACP y una fuente de iones fluoruro a una superficie o subsuperficie de un diente. La superficie o subsuperficie del diente puede ser el esmalte dental. La superficie del diente puede ser el esmalte de un diente que contiene una lesión seleccionada del grupo que consiste en uno o más de una lesión de caries, una lesión provocada por la erosión del diente, una lesión de punto blanco o una lesión fluorótica.

La superficie dental puede necesitar dicho tratamiento. La descripción también incluye un método para tratar un sujeto que padece caries dental, hipersensibilidad dentinal, fluorosis o cálculos dentales.

25 De modo sorprendente, se ha descubierto que la inclusión de ACP estabilizado en una composición oral que incluye una fuente de iones fluoruro (por ejemplo, la composición líquida oral de la invención), aumenta el grado en que se produce la remineralización a través del cuerpo de la lesión del esmalte, cubriendo la superficie y subsuperficie de la lesión, cuando se compara con la composición oral sin el ACP estabilizado.

Por consiguiente, se describe un método para remineralizar una superficie o subsuperficie de una lesión del esmalte que incluye poner en contacto una lesión del esmalte subsuperficial con una composición que incluye ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro, por ejemplo, con la composición líquida oral de la invención.

30 También se describe el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de un medicamento para la mineralización de la superficie o subsuperficie de un diente.

También se describe el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de una composición para aumentar la eficacia de remineralización de una composición oral que contiene una fuente de iones fluoruro, por ejemplo, de una composición líquida oral.

35 También se describe el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de una composición oral, por ejemplo, una composición líquida oral, para aumentar la captación de iones fluoruro hacia el interior de una superficie o subsuperficie dental tras un tratamiento con una composición oral, por ejemplo, una composición líquida oral, que contiene una fuente de iones fluoruro.

40 También se describe el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de una composición, por ejemplo, una composición líquida oral, para remineralizar una lesión subsuperficial del esmalte.

45 Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría o por un modo de acción, se cree que los iones fluoruro interaccionan con el ACP para formar fluorapatito en contacto con la superficie del diente, que es más resistente al ataque de los ácidos que el esmalte de un diente normal. Esto puede producir un esmalte dental con mejores propiedades de resistencia a la caries. Otra parte del mecanismo puede implicar que los iones fluoruro formen un complejo de fosfato de fluoruro de calcio amorfo estabilizado con PP (que puede incluir una mezcla de fosfato de calcio amorfo básico e iones fluoruro, *in situ* durante el uso). El uso del fosfato de fluoruro de calcio amorfo incluye el uso de una mezcla de ACP con fosfato de fluoruro de calcio amorfo.

50 Un "fosfopéptido" o "PP" en el contexto de la descripción de esta invención significa una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido está fosforilado. Preferiblemente, el fosfopéptido incluye uno o más de la secuencia de aminoácidos -A-B-C-, en la que A es un resto fosfoamino, B es cualquier resto aminoácido que incluye un resto fosfoamino, y C se selecciona de un resto glutamilo, aspartilo o fosfoamino. Cualquiera de los restos fosfoamino puede ser independientemente un resto fosfoserilo. De modo deseable, B es, de modo deseable, un resto cuya cadena lateral no es relativamente grande ni hidrófoba. Puede ser Gly, Ala, Val, Met, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Asp, Glu, Asn, Gln o Lys.

En otra realización, al menos dos de los fosfoaminoácidos en la secuencia están preferiblemente contiguos. Preferiblemente, el fosfopéptido incluye la secuencia A-B-C-D-E, en la que A, B, C, D y E son independientemente fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, fosfohistidina, ácido glutámico o ácido aspártico, y al menos dos, preferiblemente tres de A, B, C, D y E son un fosfoaminoácido. En una realización preferida, los restos fosfoaminoácidos son fosfoserina, lo más preferiblemente tres restos fosfoserina contiguos. También se prefiere que D y E sean independientemente ácido glutámico o aspártico.

Se entenderá que el término "comprende" (o sus variantes gramaticales), tal como se emplea en esta memoria descriptiva, es equivalente al término "incluye" y puede utilizarse de modo intercambiable y no debe considerarse que excluya la presencia de otros elementos o características.

El ACP también puede incluir ACFP, o puede incluirse ACFP en las composiciones y métodos descritos en lugar de ACP.

El ACP o ACFP se estabiliza por un fosfopéptido de caseína ("casein phosphopeptide", CPP), que está en forma de caseína intacta o un fragmento de la caseína, y el complejo formado preferiblemente tiene la fórmula $[\text{CPP}(\text{ACP})_n]_m$ o $[(\text{CPP})(\text{ACFP})_n]_m$, en los que n es igual o mayor que 1, por ejemplo 6. El complejo formado puede ser un complejo coloidal, en el que las partículas del núcleo se agregan para formar partículas coloidales grandes (por ejemplo, 100 nm) suspendidas en agua. Por tanto, el PP puede ser una proteína de caseína o un polifosfopéptido.

El PP puede proceder de cualquier fuente; puede estar presente en el contexto de un polipéptido mayor, incluyendo un polipéptido de caseína de longitud completa, o puede aislarse mediante digestión trípica u otra digestión enzimática o química de la caseína u otras proteínas ricas en fosfoaminoácidos, tales como fosfitina, o mediante síntesis química o recombinante, con la condición de que comprenda la secuencia -A-B-C- o A-B-C-D-E, tal como se describió anteriormente. La secuencia que flanquea esta secuencia de núcleo puede ser cualquier secuencia. Sin embargo, se prefieren las secuencias flanqueantes en $\alpha_{s1}(59-79)$ [1], $\beta(1-25)$ [2], $\alpha_{s2}(46-70)$ [3] y $\alpha_{s2}(1-21)$ [4]. Las secuencias flanqueantes pueden modificarse opcionalmente mediante la delección, la adición o la sustitución conservativa de uno o más restos. La composición y la secuencia de aminoácidos de la región flanqueante no son críticas. En la siguiente tabla 1 se muestran ejemplos de sustituciones conservativas.

Tabla 1

Resto original	Ejemplos de sustituciones conservativas	Sustituciones conservativas preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Asn	Gln, Lys, His, Phe	Gln
Gln	Asn	Asn
Gly	Pro	Pro
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe	Leu
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu
Asp	Glu	Glu
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp Phe Thr Ser	Phe

Las secuencias flanqueantes también pueden incluir restos aminoácidos no naturales. Los aminoácidos que se encuentran habitualmente que no son codificados por el código genético incluyen:

- ácido 2-aminoadípico (Aad) para Glu and Asp;
- ácido 2-aminopimélico (Apm) para Glu y Asp;
- ácido 2-aminobutírico (Abu) para Met, Leu, y otros aminoácidos alifáticos;
- ácido 2-aminoheptanoico (Ahe) para Met, Leu y otros aminoácidos alifáticos;
- 5 ácido 2-aminoisobutírico (Aib) par aGly;
- ciclohexilalanina (Cha) para Val, y Leu e Ile;
- homoarginina (Har) para Arg y Lys;
- ácido 2, 3-diaminopropiónico (Dpr) para Lys, Arg e His;
- N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, y Ala;
- 10 N-etilasparigina (EtAsn) para Asn, y Gln;
- hidroxil-lisina (Hyl) para Lys;
- alohidroxil-lisina (AHyl) para Lys;
- 3-(y 4)hidroxiprolina (3Hyp, 4Hyp) para Pro, Ser, y Thr;
- aloisoleucina (Alle) para Ile, Leu, y Val;
- 15 p-amidinofenilalanina para Ala;
- N-metilglicina (MeGly, sarcosina) para Gly, Pro, Ala;
- N-metilisoleucina (Melle) para Ile;
- norvalina (Nva) para Met y otros aminoácidos alifáticos;
- norleucina (Nle) para Met y otros aminoácidos alifáticos;
- 20 ornitina (Orn) para Lys, Arg e His;
- Citrulina (Cit) y sulfóxido de metionina (MSO) para Thr, Asn y Gin;
- N-metilfenilalanina (MePhe), trimetilfenilalanina, halógenos (F, Cl, Br y I) fenilalanina, trifluorilfenilalanina, para Phe.
- El PP puede ser uno o más fosfopéptidos seleccionados del grupo que consiste en α_{s1} (59-79) [1], β (1-25) [2], α_{s2} (46-70) [3] y α_{s2} (1-21) [4].
- 25 Las composiciones descritas y, en particular, la composición líquida oral de la invención, no incluyen un tampón fosfato y/o un quelante de calcio.
- Por tanto, se describe una composición para la mineralización dental que incluye fosfato de calcio amorfo (ACP) estabilizado y una fuente de iones fluoruro, en la que la composición no incluye un tampón fosfato y/o un quelante de calcio.
- 30 El complejo de ACP estabilizado puede ser incorporado en una composición oral que contiene una fuente de iones fluoruro, tal como una composición líquida oral, una pasta de dientes, colutorios o enjuagues bucales u otras formulaciones para la boca para ayudar en la prevención y/o el tratamiento de la caries dental, el deterioro del diente, la erosión dental y/o la fluorosis. En estas composiciones, el complejo de ACP puede comprender 0,01-50% en peso de la composición, preferiblemente 1,0-50%. Para las composiciones orales, se prefiere que la cantidad del
- 35 complejo de ACP administrada sea del 0,01-50% en peso, preferiblemente 1,0%-50% en peso de la composición. La composición oral puede contener aproximadamente 2% de CPP-ACP. Los iones fluoruro pueden estar presentes en la composición oral a una concentración en el intervalo de aproximadamente 200 ppm a 3000 ppm. Los iones fluoruro pueden estar a una concentración en el intervalo de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 1500 ppm. Los iones fluoruro en la composición oral pueden estar a una concentración de aproximadamente 900 ppm.
- 40 Estas composiciones orales pueden prepararse y usarse en diversas formas aplicables a la boca, tales como un enjuague bucal, colutorios, u otra composición líquida oral.
- Las composiciones orales según la invención también pueden incluir ingredientes conocidos adicionales, dependiendo del tipo y la forma de dicha composición oral concreta.

Las composiciones orales de la composición son de carácter líquido, tales como un colutorio o enjuague. En esta preparación, el vehículo generalmente es una mezcla de agua-alcohol que incluye, de modo deseable, un humectante, tal como se describe a continuación. En general, la proporción en peso de agua a alcohol se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1. La cantidad total de la mezcla de agua-alcohol en este tipo de preparaciones generalmente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 70 a aproximadamente 99,9% en peso de la preparación. El alcohol generalmente es etanol o isopropanol. Se prefiere el etanol.

El pH de dichas preparaciones líquidas de la invención en general se encuentra en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, y de forma típica de aproximadamente 5,0 a 7,0. El pH puede controlarse con un ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o una base (por ejemplo, hidróxido de sodio) o puede tamponarse (tal como con citrato, benzoato, carbonato o bicarbonato de sodio, bifosfato de disodio, bifosfato de sodio, etc.).

Se entenderá que, como es habitual, las preparaciones orales generalmente se comercializarán o se distribuirán de otro modo en envases etiquetados de modo adecuado. Así, una botella de enjuague bucal tendrá una etiqueta que lo describa, en sustancia, como un enjuague bucal o colutorio, y contendrá instrucciones para su uso.

Pueden emplearse otros agentes tensioactivos en las composiciones líquidas orales de la presente invención para lograr una mayor acción profiláctica, para ayudar a lograr una dispersión completa y concienzuda del agente activo a través de la cavidad oral, y para hacer que las presentes composiciones sean más cosméticamente aceptables. El material tensioactivo orgánico tiene una naturaleza preferiblemente aniónica, no iónica o anfófica, y preferiblemente no interacciona con el agente activo. Se prefiere emplear como agente tensioactivo un material detergente que imparta a la composición propiedades detergentes y de formación de espuma. Los ejemplos adecuados de tensioactivos aniónicos son sales hidrosolubles de monosulfatos de monoglicéridos de ácidos grasos superiores, tales como la sal de sodio del monoglicérido monosulfatado de ácidos grasos de aceite de coco hidrogenados, sulfatos de alquilo superior, tales como lauril sulfato de sodio, arilsulfonatos de alquilo, tales como bencensulfonato de dodecilo sodio, alquilsulfoacetatos superiores, ésteres de ácidos grasos superiores de sulfonato de 1,2-dihidroxipropano, y las amidas de acilo alifático superior sustancialmente saturadas de compuestos de ácido aminocarboxílico alifático inferior, tales como las que presentan de 12 a 16 carbonos en el ácido graso, radicales de alquilo o acilo y similares. Los ejemplos de las amidas mencionadas en último lugar son N-lauroil sarcosina, y las sales de sodio, potasio y etanolamina de N-lauroil, N-miristoil, o N-palmitoil sarcosina que deben estar sustancialmente exentas de jabón o un material de ácido graso superior similar. El uso de estos compuestos de sarconita en las composiciones líquidas orales de la presente invención les resulta particularmente ventajoso, puesto que estos materiales muestran un efecto marcado prolongado sobre la inhibición de la formación de ácidos en la cavidad oral debida a la degradación de los carbohidratos, además de ejercer cierta reducción en la solubilidad del esmalte dental en disoluciones ácidas. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos hidrosolubles adecuados para su uso son los productos de la condensación del óxido de etileno con diversos compuestos que contienen hidrógeno reactivo que son reactivos con él y que tienen cadenas hidrófobas largas (por ejemplo, cadenas alifáticas de aproximadamente 12 a 20 átomos de carbono), y estos productos de condensación ("etoxámeros") contienen restos polioxietileno hidrófilos, tales como productos de la condensación de poli(óxido de etileno) con ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas grasas, alcoholes polihidroxílicos (por ejemplo, monoestearato de sorbitano) y poli(óxido de propileno) (por ejemplo, materiales Pluronic).

El agente tensioactivo generalmente está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-5% en peso. Merece mencionarse que el agente tensioactivo puede ayudar a disolver el agente activo de la invención y, con ello, disminuir la cantidad necesaria de humectante solubilizante.

Pueden incorporarse diversos otros materiales en las composiciones líquidas orales de la invención, tales como agentes blanqueantes, conservantes, siliconas, compuestos de clorofila y/o material amoniado, tal como urea, fosfato de diamonio y sus mezclas. Estos adyuvantes, cuando están presentes, se incorporan en las preparaciones en cantidades que sustancialmente no afecten de modo adverso a las propiedades y las características deseadas.

También puede emplearse cualquier material aromatizante o edulcorante adecuado. Los ejemplos de constituyentes aromatizantes adecuados son aceites aromatizantes, por ejemplo, aceite de hierbabuena, menta, gualteria, sazafrán, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón y naranja, y salicilato de metilo. Los agentes edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, maltosa, sorbitol, xilitol, ciclamato de sodio, perilartina, AMP (éster metílico de aspartilfenilalanina), sacarina y similares. De modo adecuado, los agentes aromatizantes y edulcorantes pueden estar incluidos cada uno o conjuntamente en aproximadamente 0,1% a 5% de la preparación.

Algunas de las composiciones descritas pueden incorporarse en pastillas para chupar o en gomas de mascar u otros productos, por ejemplo, mediante agitación en una base de goma caliente o revistiendo la superficie externa de una base de goma, cuyos ejemplos son jelutong, látex de goma, resinas de vinilita, etc., de modo deseable con ablandadores o plastificantes convencionales, azúcar u otros edulcorantes, tales como glucosa, sorbitol y similares.

Además, la invención describe composiciones que incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden el complejo de ACP descrito anteriormente y una fuente de iones fluoruro, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden seleccionarse del grupo que consiste en composiciones dentales anticariogénicas y composiciones terapéuticas. Las composiciones dentales o las composiciones terapéuticas

pueden estar en forma de un gel, líquido, sólido, polvo, crema o pastilla para chupar. Las composiciones terapéuticas también pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas. Por ejemplo, puede emplearse una formulación en crema que contenga: agua; glicerol; CPP-ACP; fluoruro de sodio; D-sorbitol; dióxido de silicio; carboximetilcelulosa sodio (CMC-Na); propilenglicol; dióxido de titanio; xilitol; ácido fosfórico; goma de guar; óxido de cinc; sacarina sodio; p-hidroxibenzoato de etilo; óxido de magnesio; p-hidroxibenzoato de butilo y p-hidroxibenzoato de propilo.

La descripción incluye además la composición líquida oral de la invención proporcionada junto con instrucciones para su uso para tratar o prevenir uno cualquiera o más de la caries dental o el deterioro dental, la corrosión dental y la fluorosis.

La presente descripción proporciona un kit de partes que incluye (a) una fuente de iones fluoruro, y (b) un complejo de CPP-ACP en un vehículo farmacéuticamente aceptable. De modo deseable, el kit contiene además instrucciones para su uso para la mineralización de una superficie dental en un paciente que necesita dicho tratamiento. El agente y el complejo pueden estar presentes en cantidades adecuadas para el tratamiento de un paciente. La descripción también proporciona un sistema para mejorar la remineralización que incluye (a) una fuente de iones fluoruro, y (b) un complejo de CPP-ACP en un vehículo farmacéuticamente aceptable para combinarse con la fuente de fluoruro antes de la aplicación a una superficie dental.

La presente descripción proporciona un método (no es parte de la invención) para potenciar el efecto de remineralización de los iones fluoruro en una composición de cuidado oral que incluye la adición de ACP estabilizado a la composición para el cuidado oral, y dicha composición es, por ejemplo, la composición líquida oral de la presente invención. La presente descripción proporciona un método (no es parte de la invención) para mejorar la incorporación de fluoruro en una lesión del esmalte que incluye poner en contacto una lesión en el esmalte dental con una composición que incluye ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro, y dicha composición es, por ejemplo, la composición líquida oral de la presente invención. La presente descripción proporciona el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de un medicamento para la mineralización de una superficie o subsuperficie dental.

La presente descripción proporciona el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la caries dental. Se describe un método para tratar y/o prevenir la erosión dental que comprende poner en contacto una lesión en el esmalte dental provocada por la erosión con una composición que incluye ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro, siendo dicha composición, por ejemplo, la composición líquida oral de la invención. Se describe el uso de ACP estabilizado y una fuente de iones fluoruro para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la erosión dental. Se entenderá claramente que, aunque esta memoria descriptiva se refiere específicamente a aplicaciones en seres humanos, la invención también es útil para objetivos veterinarios. Así, en todos los aspectos, la invención es útil para animales domésticos, tales como ganado bovino, ovejas, caballos y aves de corral; para animales de compañía, tales como gatos y perros; y para animales de zoológico.

La invención a continuación se describirá más a fondo remitiéndose a los siguientes ejemplos no limitantes y figuras.

En las figuras, la figura 1 muestra microrradiografías representativas de lesiones subsuperficiales del esmalte después de una remineralización *in situ* y exposición a ácidos (EA) *in vitro*.

Ejemplo 1

Se realizó un estudio de fluoruro de placa como un diseño cruzado de tres vías doble ciego aleatorizado que implica tres colutorios codificados. Los tres colutorios fueron (i) CPP-ACP al 2% en p/v (Recaldent™) suministrado por Recaldent Pty Ltd (Melbourne, Australia) y 450 ppm de F en forma de NaF en agua desionizada, (ii) 450 ppm de F en forma de NaF en agua desionizada, (iii) un enjuague de control placebo en forma de agua desionizada. El colutorio de CPP-ACP se ajustó a pH 7,0 con HCl 1 M. A los sujetos se les suministraron los enjuagues codificados en tubos de plástico opacos y emplearon 15 ml de cada enjuague durante 60 s tres veces diarias, después del desayuno, después de la comida y por la noche antes de dormir, durante cuatro días, y elaboraron un diario del uso del enjuague. En el quinto día, el enjuague se empleó después del desayuno y se recolectó la placa supragingival 2-3 hr después. Los sujetos no llevaron a cabo procedimientos de higiene oral mientras emplearon los enjuagues. Cada sujeto cambió a utilizar cada uno de los otros colutorios con un periodo de descanso de cuatro semanas entre tratamientos. La placa supragingival se recolectó empleando una cureta Gracey 7/8 sobre las superficies bucal y lingual de todos los dientes. La placa se recogió hacia un tubo de microcentrífuga tarado que se volvió a pesar y después se conservó a -70 °C. Después de descongelar las muestras de placa, estas se centrifugaron durante 5 min a 20.000 g, se secaron en un evaporador rotatorio Jouan RC10.10 y después se volvieron a pesar para determinar los pesos secos. Después las muestras secas se extrajeron con 200 µl de HCl 1 M mezclando en un mezclador de vórtice durante 1 min y después se trataron en agua helada en un baño ultrasónico Branson 12 (Consolidated Ultrasonic, Melbourne, Australia) durante 8 h. Después de una centrifugación (20.000 g, 5 min) se determinaron las concentraciones de ion fluoruro en el sobrenadante según se ha descrito previamente (Silva y Reynolds, 1996). Los niveles de fluoruro en la placa se analizaron estadísticamente utilizando un ensayo de Friedman no paramétrico con ensayos de rangos señalados de Wilcoxon (Norusis, 1993).

- 5 Ambos enjuagues de fluoruro produjeron un aumento en los niveles de fluoruro en la placa, y el enjuague de 450 ppm de fluoruro casi dobló el nivel de fluoruro obtenido con el enjuague de control placebo (tabla 2). La adición de CPP-ACP al 2% al enjuague de 450 ppm de fluoruro aumentó significativamente la incorporación de iones fluoruro en la placa, en donde el nivel de fluoruro en la placa fue más del doble que el obtenido con el enjuague de fluoruro. No se observaron diferencias significativas en los pesos secos de la placa para los tres enjuagados, aunque el peso seco de la placa obtenida con el enjuague de CPP-ACP al 2% más 450 ppm de fluoruro mostró una tendencia a ser mayor que el obtenido con los otros dos enjuagues.

Tabla 2

Niveles de fluoruro en la placa supragingival después de un tratamiento con diversos colutorios

Colutorio	Nivel de fluoruro en la placa (nmol/mg de peso seco)	Peso seco de la placa (mg)
Control placebo	7,4 ± 4,7 ^{a,b}	4,3 ± 2,5 ^a
Fluoruro (450 ppm)	14,4 ± 6,7 ^{a,b}	3,9 ± 1,9 ^a
CPP-ACP al 2% más 450 ppm de F	33,0 ± 17,6 ^{a,b}	5,0 ± 2,1 ^a

^a Promedio ± DE (n = 14).^b Significativamente diferente de todos los valores en la misma columna (P < 0,001).

10 Ejemplo 2

- Se llevó a cabo un estudio de remineralización como un estudio de remineralización cruzado de 5 vías doble ciego aleatorizado con cinco suspensiones de pasta de dientes utilizando un modelo *in situ* previamente descrito (Shen *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2003). Se prepararon aparatos palatales que contenían seis mitades de planchas de esmalte humano con lesiones desmineralizadas subsuperficiales como se describe en Shen *et al.* (2001). Se prepararon pastas de dientes como productos codificados, y la base del producto consistió en sorbitol, sílice, lauril sulfato de sodio, aroma, carboximetilcelulosa sodio, dióxido de titanio, goma de xantano, sacarina sodio y agua. El pH de la formulación se ajustó a 7,0 con ácido fosfórico. Se prepararon cinco formulaciones de pasta de dientes: (i) placebo, (ii) 1100 ppm de fluoruro como fluoruro de sodio, (iii) 2800 ppm de fluoruro como fluoruro de sodio, (iv) CPPACP al 2%, y (v) CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de fluoruro como fluoruro de sodio. Se prepararon suspensiones de pasta de dientes añadiendo 1 g de pasta a 4 ml de agua desionizada y mezclando en vórtice durante 60 s. Los sujetos se enjuagaron con las suspensiones durante 60 s cuatro veces diarias durante 14 días en los siguientes momentos: 10:00 am, 11:30 am, 2:00 pm y 3:30 pm. Los sujetos elaboraron un diario del uso de la suspensión de la pasta de dientes y se les dijo que no comieran, bebieran ni realizaran procedimientos de higiene oral mientras llevaran puesto el aparato. Cuando los aparatos no estaban en la boca, se conservaban en una bolsa de plástico húmeda sellada a temperatura ambiente. Se dijo a los sujetos que enjuagasen sus aparatos empleando agua desionizada. Después de completar cada tratamiento se retiraron las mitades de planchas de esmalte de los aparatos y se prepararon para el ataque con ácidos.

- Para el ataque con ácidos de las lesiones remineralizadas, los bloques de esmalte de ensayo se cubrieron con un barniz de uñas resistente a ácidos para dejar expuesta solo la mitad de cada ventana remineralizada (1 x 3 mm²). Las planchas se montaron sobre el extremo de varillas de 3-4 cm de cera dental y se sumergieron en 40 ml de tampón de desmineralización de ácido láctico no agitado/Carbopol (Reynolds, 1997) durante 8 horas a 37 °C. Después de completar este ataque con ácidos, las planchas de esmalte se enjuagaron con agua desionizada y se cortaron a través de la línea media de ambas ventanas para producir dos bloques. Estos dos bloques de esmalte que contenían lesiones remineralizadas y lesiones remineralizadas atacadas con ácido se aparearon con su bloque control que contenía las lesiones desmineralizadas originales y se formaron bloques para cortes, se cortaron y se microrradiografiaron como se ha descrito previamente (Shen *et al.*, 2001). Se escanearon las imágenes de las lesiones y del esmalte en buenas condiciones adyacente y se determinó el porcentaje de perfil mineral de cada lesión como se describe en Iijima *et al.* (2004). La diferencia entre las áreas bajo el perfil densitométrico de la lesión desmineralizada original y el esmalte en buenas condiciones, calculada mediante integración trapezoidal, se representa como ΔZd. La diferencia entre las áreas bajo el perfil densitométrico de la lesión remineralizada y el esmalte en buenas condiciones, calculada mediante integración trapezoidal, se representa como ΔZr. El porcentaje de remineralización (% de R) representa el porcentaje de cambio en los valores de ΔZ, por ejemplo:

$$\%R = \frac{\Delta Zd - \Delta Zr}{\Delta Zd} \times 100 \text{ (Iijima et al., 2004)}.$$

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando un ANOVA de mediciones repetidas con un ensayo de Scheffe post hoc (Norusis, 1993).

- 45 Todas las formulaciones de pasta de dientes repusieron el mineral en las lesiones subsuperficiales del esmalte en el estudio *in situ* (tabla 3). El fluoruro produjo una remineralización de dosis-respuesta, y la formulación de 2800 ppm

repuso significativamente más mineral que la formulación de 1100 ppm, que repuso significativamente más que el control placebo. La pasta de dientes con CPP-ACP al 2% produjo un nivel de remineralización similar a la formulación de 2800 ppm de fluoruro, y la pasta con CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de fluoruro fue la mejor de todas las formulaciones, incluyendo la pasta de 2800 ppm de fluoruro. La microrradiografía de las lesiones después de la remineralización reveló que el ion fluoruro por sí solo tiende a estimular la remineralización de la capa superficial, mientras que CPP-ACP estimula la remineralización, incluso en presencia de fluoruro, a lo largo del cuerpo de la lesión (figura 1).

El ataque con ácidos *in vitro* de las planchas de esmalte remineralizadas *in situ* produjo una pérdida sustancial de mineral de las planchas de esmalte tratadas con placebo. Se perdió una pequeña cantidad de mineral de las lesiones remineralizadas con CPP-ACP al 2% tras el ataque con ácidos. Aunque apareció una tendencia a perder una pequeña cantidad de mineral en el esmalte tratado con las formulaciones de fluoruro, la pérdida no fue estadísticamente significativa. La remineralización residual después del ataque con ácidos fue significativamente mayor para la pasta que contenía CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de fluoruro cuando se compara con la remineralización residual obtenida con todas las otras pastas, incluyendo la pasta que contenía 2800 ppm de fluoruro. La microrradiografía de las lesiones remineralizadas después del ataque con ácidos reveló que el ácido eliminó el mineral predominantemente de la zona por debajo de la zona remineralizada.

Este estudio *in situ* mostró una clara respuesta a la dosis en la mineralización de la lesión subsuperficial del esmalte por el fluoruro, con $8,2 \pm 0,2\%$ de remineralización por la pasta de dientes que contenía 1100 ppm de F- y $15,5 \pm 2,4\%$ por la que contenía 2800 ppm de F-. También reveló que la pasta que contenía CPP-ACP al 2% tuvo una actuación mejor en la remineralización de las lesiones subsuperficiales del esmalte cuando se compara con la pasta que contenía 1100 ppm de F- y no fue significativamente diferente de la pasta que contenía 2800 ppm de F-. La pasta que contenía CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de F- produjo mayor mineralización que la pasta que contenía 2800 ppm de F-. La adición de CPP-ACP al 2% a 1100 ppm de F- aumentó la remineralización de la subsuperficie del esmalte en 156% con relación a la pasta de 1100 ppm de F-.

Los fosfopéptidos de caseína (CPP) han demostrado que no solo estabilizan al fosfato de calcio amorfo (ACP) estabilizado, sino que también transportan y localizan al ACP en la superficie del diente (Reynolds, 1998; Reynolds *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 2003). El CPP-ACP en un colutorio aumenta significativamente el nivel de iones calcio y fosfato inorgánico en la placa supragingival, uniéndose el CPP a la película salivar y a la superficie de las bacterias en la biopelícula de la placa supragingival (Reynolds *et al.*, 2003). Este ensayo clínico demostró que CPP-ACP también puede estimular la captación de iones fluoruro hacia el interior de la placa. Por tanto, el CPP-ACP debe estimular la captación de iones calcio, fosfato y fluoruro hacia el interior de la placa supragingival cuando se añade a una formulación de pasta de dientes que contiene fluoruro. El presente estudio *in situ* demuestra que el CPP-ACP administrado en la formulación de pasta de dientes es muy eficaz en la remineralización de la subsuperficie del esmalte y que el mineral formado es más resistente a ácidos que el apatito del esmalte natural. El esmalte remineralizado por CPP-ACP en presencia de fluoruro muestra mayor resistencia al ataque con ácidos con relación al esmalte natural o al esmalte remineralizado por CPP-ACP. Esto sugiere que CPP-ACP en presencia de iones F- estimula la remineralización con fluorapatito resistente a ácidos. Estos resultados demuestran que la adición de CPP-ACP a una formulación de pasta de dientes potencia significativamente la capacidad del fluoruro para remineralizar las lesiones subsuperficiales del esmalte con fluorapatito resistente a ácidos.

Tabla 3

Porcentaje de remineralización de lesiones subsuperficiales del esmalte por diversas formulaciones de pasta de dientes, seguidas de un ataque con ácidos

	Control placebo	1100 ppm de fluoruro	2800 ppm de fluoruro	CPP-ACP al 2%	CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de fluoruro
Profundidad inicial de la lesión (µm)	105 ± 7 ^a	106 ± 9	102 ± 7	107 ± 8	104 ± 8
ΔZd (% en vol min. µm)	4,489 ± 2,465	3,544 ± 1,432	3,704 ± 1,278	4,287 ± 2,282	4,382 ± 1,714
ΔZd-ΔZr	138 ± 122 ^d	290 ± 136 ^d	576 ± 222	580 ± 311	919 ± 462 ^d
% de R ^b	3,1 ± 1,6 ^e	8,2 ± 2,0 ^e	15,5 ± 2,4	13,5 ± 1,5	21,0 ± 5,9 ^e
% de R ^c AC	-4,1 ± 1,6 ^{f,g}	7,1 ± 1,3 ^f	13,2 ± 1,1 ^f	8,7 ± 1,5 ^{f,g}	17,4 ± 1,2 ^f

^a Promedio ± DE (n = 14).

^b % de R = $\Delta Zd - \Delta Zr / \Delta Zd \times 100$ (Shen *et al.*, 2001).

^c R_{AC} = % de R después del ataque con ácidos.

^d Significativamente diferente de todos los valores en la fila (P < 0,01).

^e Significativamente diferente de todos los valores en la fila (P < 0,01).

^f Significativamente diferente de todos los valores en la fila (P < 0,01).

^g Significativamente diferente del valor del % de R en la misma columna (P < 0,01).

Ejemplo 3

Se empleó una espectrometría dispersiva de longitud de onda de microsondas de electrones para medir los niveles de fluoruro en las lesiones remineralizadas como sigue.

Se introdujeron secciones de esmalte en resinas epoxídicas sobre un soporte de especímenes de 2,54 cm (una pulgada). La resina se pulimentó en plano para exponer las secciones de esmalte utilizando un papel abrasivo de grano 2400. Para lograr la homogeneidad óptica se emplearon pastas de pulir de diamante de 3 µm y 1 µm sobre una almohadilla de tejido, realizándose un acabado final con una pasta de óxido de aluminio de 0,25 µm. Todas las muestras y patrones se revistieron con 20 nm de carbono utilizando un Dynavac 300. La sonda de electrones (8900R SuperProbe JEOL, Japón) se hizo funcionar con un voltaje acelerante de 15 kV, una corriente de espécimen de 12 nA, y un ángulo de despegue de 40°. Se emplearon unos tiempos de permanencia de 10 segundos para el pico y de 10 segundos para el fondo por punto. El límite de detección para F fue de 800 ppm. El diámetro del haz empleado durante la recolección de los patrones fue de un punto de 10 µm, mientras que el diámetro para el análisis de las lesiones fue de 2 µm. Se midieron simultáneamente las intensidades de rayos X del calcio, fósforo, fluoruro y cloruro empleando cuatro espectrómetros con cristales de filtro de pentaeritritol, pentaeritritol, sintético revestido con W/Si, pentaeritritol, respectivamente. El patrón se analizó empleando un haz con un diámetro de 10 µm (desenfocado) y 2 µm (enfocado) para calibrar la intensidad de recuento de rayos X. El patrón fue fluorapatito sintético con una proporción de calcio a fósforo de 1,667 y un contenido en fluoruro del 3,70% en peso. Se recolectaron mapas elementales y barridos de líneas cuantitativas para el calcio, fósforo, fluoruro, oxígeno y cloro a través de las lesiones comenzando desde la base de la lesión hasta la capa superficial. Se corrigieron los datos utilizando un procedimiento de corrección de método parabólico Phi(RhoZ) ejecutado en STRATA (Thin Film Analysis Package).

La microrradiografía de las lesiones remineralizadas después del ataque con ácidos reveló que el ácido eliminó el mineral predominantemente de la zona por debajo de la zona remineralizada. El nivel de fluoruro de las lesiones remineralizadas para las pastas de placebo, 1100 ppm de F, y CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de F se determinó empleando una espectrometría dispersiva de longitud de onda de microsondas de electrones (tabla 4). El fluoruro incorporado en la lesión fue significativamente mayor para la pasta de CPP-ACP al 2% más plus 1100 ppm de F cuando se compara con la pasta de 1100 ppm de F (tabla 4). Además, los niveles de fluoruro medidos para la pasta de CPPACP al 2% más 1100 ppm de F eran parecidos a los predichos suponiendo que el mineral remineralizado fuera fluorapatito (tabla 4).

Tabla 4

Niveles de fluoruro previstos y medidos en las lesiones remineralizadas

Pasta de dientes	Nivel de remineralización (% en vol min)	F predicho ^a (% en peso)	F medido ^b (% en peso)
Placebo	1,31	0,05	0,05 ± 0,05 ^c
1100 ppm de F	2,74	0,10	0,23 ± 0,09 ^c
CPP-ACP al 2% más 1100 ppm de F	8,84	0,33	0,30 ± 0,13 ^c

^a Nivel de F predicho basándose en que el mineral remineralizado fuera fluorapatito (3,768% en peso de F).

^b Medido utilizando una espectrometría dispersiva de longitud de onda de microsondas de electrones con una microsonda JEOL 8900 SuperProbe. El nivel promedio del fluoruro medido por barridos de líneas desde la base de la lesión hasta la capa superficial.

^c Significativamente diferente de los otros valores en la misma columna (p < 0,01).

Ejemplo 4

Puede producirse una crema tópica según la presente invención que tenga los siguientes ingredientes:

- Agua
- Glicerol
- 5 Complejos de CPP-ACP
- D-sorbitol
- Carboximetilcelulosa de sodio (CMC-Na)
- Propilenglicol
- Dióxido de silicio
- 10 Dióxido de titanio
- Xilitol
- Ácido fosfórico
- Fluoruro de sodio
- Aroma
- 15 Sacarina sodio
- p-hidroxibenzoato de etilo
- p-hidroxibenzoato de propilo
- p-hidroxibenzoato de butilo

Ejemplo 5

- 20 Puede producirse una formulación de colutorio según la presente invención que tenga la siguiente composición:

- Agua
- Alcohol
- Poloxámero 407
- Lauril sulfato de sodio
- 25 Complejos de CPP-ACP
- Fluoruro de sodio
- Aromas
- Sacarina sodio
- p-hidroxibenzoato de etilo
- 30 p-hidroxibenzoato de propilo
- p-hidroxibenzoato de butilo

Ejemplo 6

Puede producirse una formulación de goma de mascar sin azúcar según la presente invención que tenga la siguiente composición:

- 35 Sorbitol/manitol/xilitol cristalino
- Base de goma
- Carbonato de calcio

Glicerina

Complejos de CPP-ACP

Fluoruro de sodio

Aceite de aroma

5 Agua

Se entenderá que la invención descrita y definida en esta memoria descriptiva se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o que sean evidentes a partir del texto o los dibujos. Todas estas combinaciones diferentes constituyen diversos aspectos alternativos de la invención.

10 Referencias bibliográficas

Biesbrock A.R., Faller R.V., Bartizek R.D., Court L.K., McClanahan S.F. (1998), Reversal of incipient and radiographic caries through the use of sodium and stannous fluoride dentifrices in a clinical trial, *J. Clin. Dent.*, 9:5-10.

15 Biesbrock A.R., Gerlach R.W., Bollmer B.W., Faller R.V., Jacobs S.A., Bartizek R.D. (2001), Relative anti-caries efficacy of 1100, 1700, 2200, and 2800 ppm fluoride ion in a sodium fluoride dentifrice over 1 year, *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 29:382-389.

Biesbrock A.R., Bartizek R.D., Gerlach R.W., Jacobs S.A., Archila L. (2003), Dose response efficacy of sodium fluoride dentifrice at 9 and 21 months with supervised brushing, *Am. J. Dent.*, 16:305-312.

20 Cross K.J., Huq N.L., Palamara J.E., Perich J.W., Reynolds E.C. (2005), Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes, *J. Biol. Chem.*, 280:15362-15369.

Curnow M.M., Pine C.M., Burnside G., Nicholson J.A., Chesters R.K., Huntington E. (2002), A randomised controlled trial of the efficacy of supervised toothbrushing in high-caries-risk children, *Caries Res.*, 36:294-300.

25 Davies G.M., Worthington H.V., Ellwood R.P., Bentley E.M., Blinkhorn A.S., Taylor G.O., *et al.* (2002). A randomised controlled trial of the effectiveness of providing free fluoride toothpaste from the age of 12 months on reducing caries in 5-6 year old children, *Community Dent. Health*, 19:131-136.

Duckworth R.M., Morgan S.N., Gilbert R.J. (1992), Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments, *J. Dent. Res.*, 71, espec. n.º:836-840.

Duckworth R.M., Stewart D. (1994), Effect of mouthwashes of variable NaF concentration but constant NaF content on oral fluoride retention, *Caries Res.*, 28:43-47.

30 Hartshorne J.E., Grobler S.R., Louw A.J., Carstens I.L., Laubscher J.A. (1994), The relationship between plaque index scores, fluoride content of plaque, plaque pH, dental caries experience and fluoride concentration in drinking water in a group of primary school children, *J. Dent. Assoc. S. Afr.*, 49:5-10.

35 Iijima Y., Cai F., Shen P., Walker G., Reynolds C., Reynolds E.C. (2004), Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, *Caries Res.*, 38:551-556.

Lynch R.J., Navada R., Walia R. (2004), Low-levels of fluoride in plaque and saliva and their effects on the demineralisation and remineralisation of enamel; role of fluoride toothpastes, *Int. Dent. J.*, 304-309.

Norusis M. (1993), *SPSS for Windows: Base System User's Guide*, publicación 6.0 Illinois, EE. UU., SPSS INC.

40 Reynolds E.C., Cain C.J., Webber F.L., Black C.L., Riley P.F., Johnson I.H., *et al.* (1995). Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat, *J. Dent. Res.*, 74:1272-1279.

Reynolds E.C. (1997), Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions, *J. Dent. Res.*, 76:1587-1595.

Reynolds E.C. (1998), Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilised by casein phosphopeptides, artículo invitado, *Spec. Care Dentist*, 18:8-16.

45 Reynolds E.C., Black C.L., Cai F., Cross K.J., Eakins D., Huq N.L., *et al.* (1999). Advances in enamel remineralization: casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, *J. Clin. Dent.*, X:86-88.

Reynolds E.C., Cai F., Shen P., Walker G.D. (2003), Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by

various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum, J. Dent. Res., 82:206-211.

Shen P., Cai F., Nowicki A., Vincent J., Reynolds E.C. (2001), Remineralization of enamel subsurface lesions by sugarfree chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate, J. Dent. Res., 80:2066-2070.

- 5 Silva M., Reynolds E.C. (1996), Fluoride content of infant formula in Australia, Aust. Dent. J., 41:37-42.

Skold-Larsson K., Modeer T., Twetman S. (2000), Fluoride concentration in plaque in adolescents after topical application of different fluoride varnishes, Clin. Oral Investig., 4:31-34.

ten Cate J.M. (1999), Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride, Acta Odontol. Scand., 57:325-329.

10 **Listado de secuencias**

<110> The University of Melbourne

<120> COMPOSICIÓN DE FLUORURO Y MÉTODOS PARA MINERALIZACIÓN DENTAL

<130> 70979 D26841

<150> AU 2006900634

- 15 <151> 2006-02-09

<150> AU 2006903531

<151> 2006-06-30

<150> PCT/AU2007/000141

<151> 2007-02-09

- 20 <160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

- 25 <213> Bos sp.

<220>

<221> Fosforilación

<222> (6)..(6)

<220>

- 30 <221> Fosforilación

<222> (8)..(10)

<220>

<221> Fosforilación

<222> (17)..(17)

- 35 <400> 1

Gln	Met	Glu	Ala	Glu	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Glu	Glu	Ile	Val	Pro	Asn
1				5					10					15	

Ser	Val	Glu	Gln	Lys
				20

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

- 40 <213> Bos sp.

<220>

<221> Fosforilación

<222> (15)..(15)

ES 2 755 277 T3

<220>

<221> Fosforilación

<222> (17)..(19)

<400> 2

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu
1 5 10 15

5

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> Bos sp.

10

<220>

<221> Fosforilación

<222> (11)..(13)

<220>

<221> Fosforilación

15

<222> (16)..(16)

<400> 3

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

Ala Glu Val Ala Thr Glu Glu Val Lys
20 25

<210> 4

<211> 21

20

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<221> Fosforilación

<222> (8).. (10)

25

<220>

<221> Fosforilación

<222> (16)..(16)

<400> 4

Lys Asn Thr Met Glu His Val Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Ile Ser
1 5 10 15

Gln Glu Thr Tyr Lys
20

30

REIVINDICACIONES

1. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral que comprende un fosfato de calcio amorfo (ACP) estabilizado por fosfopéptidos y/o fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP) estabilizado por fosfopéptidos, y iones fluoruro libres,
- 5 en los que la composición no contiene un quelante de calcio ni un tampón fosfato y en los que dicho fosfopéptido es un fosfopéptido de caseína.
2. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según la reivindicación 1, en los que iones fluoruro se seleccionan del grupo que consiste en fluoruro de sodio; fluoruro estano; fluoruro de amina y combinaciones de los mismos.
- 10 3. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según la reivindicación 1 o 2, en los que dicho fosfopéptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de:
 - [1] Gln⁵⁹-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys⁷⁹. $\alpha_{s1}(59-79)$
 - 15 [2] Arg¹-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg²⁵. $\beta(1-25)$
 - [3] Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰. $\alpha_{s2}(46-70)$
 - [4] Lys¹-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys²¹. $\alpha_{s2}(1-21)$.
- 20 4. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que los iones fluoruro están en una cantidad de 200 ppm a 3000 ppm, preferiblemente 400 ppm a 1500 ppm.
5. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que el fosfato de calcio amorfo (ACP) estabilizado por fosfopéptidos y/o el fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP) estabilizado por preferiblemente 1,0 al 50% en peso, preferiblemente 2% en peso.
- 25 6. Una composición líquida oral según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es un restaurativo dental.
7. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la mineralización dental de una superficie o subsuperficie.
8. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según la reivindicación 7, en los que la superficie dental o subsuperficie es esmalte dental.
- 30 9. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según la reivindicación 7 u 8, en los que mineralizar una superficie dental o subsuperficie previene o trata la caries dental, la hipersensibilidad dental, la fluorosis, o los cálculos dentales.
10. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en animales domésticos, animales de compañía y animales de zoológico.
- 35 11. Un colutorio, un enjuague bucal, u otra composición líquida oral según la reivindicación 10, en los que el animal se selecciona del grupo que consiste en ganado bovino, ovejas, caballos, aves de corral, gatos y perros.

Figura 2: la estructura compleja cerrada de la CPP-ACP nanocompleja

